



Technische Universität München

Lehrstuhl für Botanik

## Charakterisierung der Glutathiontransferasen aus *Arabidopsis thaliana*

Natalie Agnes Kowalski

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. Wilfried Schwab

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Erwin Grill

2. apl. Prof. Dr. Philippe Schmitt-Kopplin

Die Dissertation wurde am 11.05.2016 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt am 04.10.2016 angenommen.



## Inhaltsverzeichnis

|  |           |
|--|-----------|
| <b>Inhaltsverzeichnis .....</b>                                | <b>I</b>  |
| <b>Abbildungsverzeichnis .....</b>                             | <b>V</b>  |
| <b>Tabellenverzeichnis .....</b>                               | <b>IX</b> |
| <b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>                             | <b>X</b>  |
| <b>Zusammenfassung.....</b>                                    | <b>1</b>  |
| <b>Summary.....</b>  | <b>3</b>  |
| <b>1. Einleitung .....</b>                                     | <b>5</b>  |
| <b>1.1. Herbizide – Nutzen, Funktion, Metabolisierung.....</b> | <b>5</b>  |
| 1.1.1. Herbizidklassen und ihre Wirkmechanismen                | 5         |
| 1.1.2. Pflanzliche Detoxifizierung von Herbiziden              | 10        |
| 1.1.3. Herbizidresistente Unkräuter                            | 15        |
| <b>1.2. Pflanzliche Glutathiontransferasen .....</b>           | <b>18</b> |
| 1.2.1. Klassifizierung und Struktur                            | 18        |
| 1.2.2. Katalysierte Reaktionen                                 | 24        |
| 1.2.3. Expression und Funktion                                 | 27        |
| <b>1.3. Zielsetzung der Arbeit .....</b>                       | <b>32</b> |
| <b>2. Material und Methoden .....</b>                          | <b>34</b> |
| <b>2.1. Geräte .....</b>                                       | <b>34</b> |
| <b>2.2. Chemikalien und Lösungsmittel .....</b>                | <b>35</b> |
| <b>2.3. Primer.....</b>  | <b>35</b> |
| <b>2.4. Stämme und Anzuchtbedingungen .....</b>                | <b>35</b> |
| 2.4.1. <i>Escherichia coli</i>                                 | 35        |
| 2.4.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                         | 35        |
| 2.4.3. <i>Agrobacterium tumefaciens</i>                        | 37        |
| 2.4.4. <i>Arabidopsis thaliana</i>                             | 38        |
| <b>2.5. Methoden.....</b>                                      | <b>39</b> |
| 2.5.1. Isolierung von Nukleinsäuren                            | 39        |
| 2.5.1.1. Isolierung von DNA aus <i>S. cerevisiae</i>           | 39        |
| 2.5.1.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>         | 40        |

|  |    |
|--|----|
| 2.5.1.3. Isolierung von RNA aus <i>A. thaliana</i>                     | 40 |
| 2.5.2. Agrosegelelektrophorese   | 40 |
| 2.5.3. Restriktion von DNA   | 40 |
| 2.5.4. Dephosphorylierung von DNA                                      | 40 |
| 2.5.5. Ligation von DNA  | 41 |
| 2.5.6. DNA-Präparation aus Agarosegelen                                | 41 |
| 2.5.7. cDNA-Synthese   | 41 |
| 2.5.8. Polymerasekettenreaktion  | 41 |
| 2.5.8.1. PCR   | 41 |
| 2.5.8.2. Kolonie-PCR   | 41 |
| 2.5.8.3. PCR mit Blattmaterial   | 42 |
| 2.5.8.4. Quantitative <i>real time</i> -PCR                            | 42 |
| 2.5.8.5. PCR-basierte, gerichtete Mutagenese                           | 43 |
| 2.5.9. Transformation  | 44 |
| 2.5.9.1. Transformation von <i>E. coli</i>                             | 44 |
| 2.5.9.2. Transformation von <i>S. cerevisiae</i>                       | 44 |
| 2.5.9.3. Transformation von <i>A. tumefaciens</i>                      | 45 |
| 2.5.9.4. Transformation von <i>A. thaliana</i>                         | 45 |
| 2.5.10. Generierung von KO-Mutanten in <i>S. cerevisiae</i>            | 46 |
| 2.5.11. Polyacrylamidgelelektrophorese und <i>western blot</i>         | 47 |
| 2.5.11.1. Probenaufbereitung   | 48 |
| 2.5.11.2. SDS-PAGE   | 48 |
| 2.5.11.3. <i>western blot</i>  | 49 |
| 2.5.11.4. Antikörper-Nachweis  | 49 |
| 2.5.12. GST-Extraktion aus <i>S. cerevisiae</i> und Aktivitätsnachweis | 50 |
| 2.5.13. Pestizidumsatz von GSTs in <i>S. cerevisiae</i>                | 50 |
| 2.5.13.1. Heterologe Expression von GSTs in <i>S. cerevisiae</i>       | 51 |
| 2.5.13.2. Belastung  | 51 |
| 2.5.13.3. Ernte  | 51 |
| 2.5.13.4. Metabolitextraktion  | 51 |
| 2.5.14. Pestizidumsatz in <i>A. thaliana</i>                           | 51 |
| 2.5.14.1. Sterilisation von Samen                                      | 52 |
| 2.5.14.2. Belastung und Ernte  | 52 |
| 2.5.14.3. Metabolitextraktion  | 52 |
| 2.5.15. Nicht-enzymatische Generierung von GSH-Konjugaten              | 52 |

|   |           |
|---|-----------|
| 2.5.16. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie  | 53        |
| 2.5.17. Ionenzyklotronresonanz-Fouriertransformations-Massenspektrometrie                                 | 54        |
| 2.5.18. Identifizierung von schwefelhaltigen Massen   | 55        |
| 2.5.19. Identifizierung von GSH-Konjugaten  | 56        |
| 2.5.20. Physiologische Analysen von <i>A. thaliana</i>  | 57        |
| 2.5.20.1. Chlorophyllfluoreszenz-Messungen  | 57        |
| 2.5.20.2. Wurzelwachstum  | 57        |
| <b>2.6. Bioinformatische Programme, Internetressourcen und Datenbanken .....</b>                          | <b>58</b> |
| 2.6.1. Datenbanken für DNA- und Proteinsequenzen und Kristallstrukturen                                   | 58        |
| 2.6.2. Datenbanken für Expressionanalysen   | 58        |
| 2.6.3. T-DNA-Insertionslinien   | 59        |
| 2.6.4. Analyse von DNA- und Proteinsequenzen  | 59        |
| 2.6.5. Primer-Design  | 59        |
| 2.6.6. Darstellung von Stammbäumen  | 59        |
| 2.6.7. Vorhersage und Visualisierung von Protein-3D-Strukturen  | 59        |
| 2.6.8. Annotation und Analyse von MS-Daten  | 60        |
| 2.6.9. Berechnung von monoisotopen Massen   | 60        |
| 2.6.10. Darstellung von Strukturformeln   | 60        |
| <b>3. Ergebnisse .....</b>  | <b>61</b> |
| <b>3.1. Detektion schwefelhaltiger Metabolite in <i>S. cerevisiae</i>.....</b>                            | <b>61</b> |
| 3.1.1. Schwefelfütterung und Markierung schwefelhaltiger Metabolite in Hefe                               | 61        |
| 3.1.2. Detektion von Schwefelmassen in <i>S. cerevisiae</i> mittels ICR-FT/MS                             | 67        |
| 3.1.3. Markierung von GSH-Konjugaten  | 73        |
| <b>3.2. Optimierung der Schwefelmarkierung von GSH-Konjugaten durch Manipulation des Hefegenoms .....</b> | <b>75</b> |
| 3.2.1. Integration von <i>MET15</i> in das Genom von BY4741 und entsprechenden Mutanten                   | 76        |
| 3.2.2. Deletion von <i>TEF4</i> und Genen des GSH-Katabolismus in GST-defizienter <i>S. cerevisiae</i>    | 80        |
| <b>3.3. Identifizierung von GST-Substraten.....</b>   | <b>85</b> |
| 3.3.1. Nachweis von GSH-Konjugaten  | 85        |
| 3.3.2. Identifizierung von GSH-Konjugaten   | 87        |
| <b>3.4. Aktivität von AtGSTs gegenüber Chlorotriazinen .....</b>  | <b>94</b> |
| 3.4.1. Aktivität von AtGSTs gegenüber Chlorotriazinen in Hefe   | 94        |
| 3.4.2. Aktivität coexprimierter AtGSTs in <i>S. cerevisiae</i>  | 102       |
| 3.4.3. An der ATZ-Bindung beteiligte Aminosäuren der GSTU5  | 104       |

|   |            |
|---|------------|
| 3.4.4. Einfluss der GSTU5, GSTU18 und GSTU22 auf den Chlorotriazinumsatz <i>in planta</i>     | 107        |
| <b>3.5. Umsatz von Chloroacetaniliden durch AtGSTs</b> .....                                  | <b>114</b> |
| 3.5.1. Aktivität von AtGSTs gegenüber Chloroacetaniliden in Hefe                              | 116        |
| 3.5.2. Wirkung und Detoxifizierung von Chloroacetaniliden in <i>A. thaliana</i>               | 125        |
| <b>4. Diskussion</b> .....  | <b>127</b> |
| <b>4.1. <i>S. cerevisiae</i> als Modellorganismus für die Analyse pflanzlicher GSTs</b> ..... | <b>127</b> |
| 4.1.1. Nachweis von GSH-Konjugaten mittels stabiler Schwefelisotope                           | 128        |
| 4.1.2. Charakterisierung von pflanzlichen GSTs in Hefe  | 134        |
| <b>4.2. Aktivität von GSTs aus <i>Arabidopsis</i> gegenüber Herbiziden</b> .....              | <b>136</b> |
| 4.2.1. Spezifität gegenüber Chlorotriazinen innerhalb der GST-Familie aus <i>A. thaliana</i>  | 136        |
| 4.2.2. Substratspezifität von <i>Arabidopsis</i> -GSTs gegenüber Chloroacetaniliden           | 143        |
| 4.2.3. GST-vermittelte Herbizidresistenz  | 149        |
| 4.2.4. Endogene Funktionen der GSTs in <i>Arabidopsis</i>                                     | 150        |
| <b>5. Literaturverzeichnis</b> .....  | <b>158</b> |
| <b>6. Anhang</b> .....  | <b>173</b> |
| <b>Danksagung</b> .....   | <b>201</b> |
| <b>Lebenslauf</b> .....   | <b>202</b> |

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1.1 Pestizidverbrauch und Wirkstoffanteile in Deutschland im Jahr 2014.....   | 7  |
| Abbildung 1.2 Substratbindestelle im D1 Protein des PSII. ....  | 8  |
| Abbildung 1.3 Chemische Struktur ausgewählter Herbizide. ....   | 9  |
| Abbildung 1.4 Inhibierung der Aminosäurebiosynthese durch die Herbizide Glyphosat und Glufosinat. ....                                    | 10 |
| Abbildung 1.5 Schematische Darstellung des Herbizidabbaus in der Pflanzenzelle.....   | 12 |
| Abbildung 1.6 Vorkommen und Anzahl von herbizidresistenten Unkrautarten. ....   | 16 |
| Abbildung 1.7 Stammbaum der GST-Familie in <i>A. thaliana</i> . ....  | 19 |
| Abbildung 1.8 Model der GST-Evolution in Pflanzen. ....   | 20 |
| Abbildung 1.9 Vergleich der dreidimensionalen Struktur von pflanzlichen GSTs verschiedener Klassen.....                                   | 21 |
| Abbildung 1.10 Darstellung der GSH-Bindung in GSTs.....   | 23 |
| Abbildung 1.11 Von GSTs katalysierte Reaktionen. ....   | 26 |
| Abbildung 1.12 Stammbaum und Expression der GSTs in Arabidopsis. ....   | 29 |
| Abbildung 1.13 Endogene Substrate für pflanzliche GSTs. ....  | 31 |
| Abbildung 2.1 Schema der Marker-vermittelten Gendeletion und nachfolgendem <i>marker rescue</i> in Hefe. ....                             | 47 |
| Abbildung 3.1 <sup>32</sup> S- und <sup>34</sup> S-Isotope von GSH bei Markierung mit leichtem oder schwerem Schwefel in Hefe. ....       | 62 |
| Abbildung 3.2 Optimierung der ICR-FT/MS-Messung durch Probenverdünnung und Scanzahl. ....   | 63 |
| Abbildung 3.3 Hefewachstum in Minimalmedium mit unterschiedlichen Sulfatkonzentrationen. ....   | 64 |
| Abbildung 3.4 Strukturformeln von GSH, Pantethein, Cystathionin, S-Adenosylhomocystein. ....  | 64 |
| Abbildung 3.5 Peakintensität ausgewählter <sup>34</sup> S-Metabolite mit zunehmender <sup>34</sup> S-Sulfatkonzentration.....             | 65 |
| Abbildung 3.6 Einbau von leichtem und schwerem Schwefel in ausgewählte Metabolite der Hefe abhängig von der Verfügbarkeit im Medium. .... | 67 |
| Abbildung 3.7 Vergleich verschiedener Methoden zum Nachweis von Schwefelmassen in Massenspektren von Hefeextrakten. ....                  | 69 |
| Abbildung 3.8 Identifizierung von schwefelhaltigen Massen mittels HCA. ....   | 70 |
| Abbildung 3.9 Umsatz von ATZ in vereinigten GST-exprimierenden Hefeproben.....  | 75 |
| Abbildung 3.10 Schema der <i>MET15</i> -Insertion in das Genom von BY4741. ....   | 77 |

|  |     |
|--|-----|
| Abbildung 3.11 Markierung von schwefelhaltigen Massen mit leichtem und schwerem $\text{SO}_4^{2-}$ nach Integration des Gens <i>MET15</i> .....            | 78  |
| Abbildung 3.12 Spezifische GSH-Konjugate, die in der Mutante $\Delta cis2\Delta cpc\Delta cpy+MET15$ angereichert waren.....                               | 79  |
| Abbildung 3.13 Wachstum der GST-defizienten und GST- und Katabolismus-defizienten Hefemutanten. ....   | 81  |
| Abbildung 3.14 Aktivität GST- und Katabolismus-defizienter Hefemutanten. ....  | 82  |
| Abbildung 3.15 Massenspektrometrische Analyse der CDNB-GSH-Konjugate und deren Abbauprodukte in verschiedenen Hefemutanten. ....                           | 83  |
| Abbildung 3.16 Massenspektrometrische Analyse der BITC-GSH-Konjugate und deren Abbauprodukte in verschiedenen Hefemutanten. ....                           | 84  |
| Abbildung 3.17 Schematisch dargestellter Ablauf der Identifizierung von GST-Substraten in <i>S. cerevisiae</i> .....                                       | 86  |
| Abbildung 3.18 In <i>S. cerevisiae</i> durch Schwefelmarkierung identifizierte GSH-Konjugate.....  | 88  |
| Abbildung 3.19 Mögliche <i>in vitro</i> generierte GSH-Konjugate. ....   | 91  |
| Abbildung 3.20 Substrate, deren GSH-Konjugate nach Inkubation von Flüssigkulturen von <i>A. thaliana</i> , massenspektrometrisch nachgewiesen wurden. .... | 93  |
| Abbildung 3.21 Allgemeine Struktur und Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Chlorotriazine. ....   | 94  |
| Abbildung 3.22 Wachstum von <i>S. cerevisiae</i> in unterschiedlich konzentriertem Triazin-haltigem Medium. ....   | 95  |
| Abbildung 3.23 Nachweis des ATZ-GSH-Konjugats in GST-exprimierender <i>S. cerevisiae</i> . ....  | 96  |
| Abbildung 3.24 Bestimmung von Belastungsdauer und -konzentration der Chlorotriazine in Hefe. ....  | 97  |
| Abbildung 3.25 Aktivität von, in Hefe exprimierten, AtGSTs gegenüber Chlorotriazinen. ....   | 100 |
| Abbildung 3.26 Anteil der GSTs U5, U18 und U22 an der Gesamtaktivität aller AtGSTs gegenüber Chlorotriazinen.....  | 100 |
| Abbildung 3.27 Vergleich der Aktivität von AtGSTU5 und ZmGSTI.....   | 101 |
| Abbildung 3.28 Proteinnachweis und Aktivität von GSTs gegenüber ATZ in <i>S. cerevisiae</i> . ....   | 102 |
| Abbildung 3.29 Auswirkung der Coexpression von ausgewählten GSTs auf die Aktivität gegenüber ATZ in Hefe. ....   | 103 |
| Abbildung 3.30 Coexpression zweier AtGSTs in <i>S.cerevisiae</i> . ....  | 104 |
| Abbildung 3.31 An der Bindung von ATZ beteiligte Aminosäuren in ZmGSTI und potentielle Aminosäuren in AtGSTU5.....   | 105 |

---

|  |     |
|--|-----|
| Abbildung 3.32 Differentielle Aminosäuren der GSTU5 und GSTU6 und ihre Auswirkung auf die Konjugation von ATZ. ....  | 107 |
| Abbildung 3.33 Einfluss von ATZ auf Keimlinge von <i>A. thaliana</i> . ....  | 108 |
| Abbildung 3.34 Genstruktur und Expression verwendeter KO-Linien. ....  | 109 |
| Abbildung 3.35 GSH-Konjugate ausgewählter Chlorotriazine in Arabidopsis WT und KO-Mutanten. ....   | 110 |
| Abbildung 3.36 Expressionsanalyse und ATZ-Belastung von Überexpressionslinien aktiver GSTs in <i>A. thaliana</i> . ....  | 111 |
| Abbildung 3.37 Wachstum von Col-0 und GST-Überexpressionslinien auf Chlorotriazin-haltigem Medium. ....  | 112 |
| Abbildung 3.38 Messung der maximalen Quantenausbeute des PSII in Col-0 und ausgewählten KO- und OE-Linien in <i>A. thaliana</i> bei Chlorotriazinbelastung. .... | 113 |
| Abbildung 3.39 Wachstum von Col-0 und GST-Überexpressionslinien auf Medium mit PSII-Inhibitoren. ....  | 114 |
| Abbildung 3.40 Struktur ausgewählter Chloroacetanilide. ....   | 115 |
| Abbildung 3.41 Einfluss von Chloroacetaniliden auf das Wachstum von <i>S. cerevisiae</i> . ....  | 117 |
| Abbildung 3.42 GSH-Konjugation von Chloroacetaniliden in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit in <i>S. cerevisiae</i> . ....                                  | 118 |
| Abbildung 3.43 Aktivität von AtGSTs gegenüber sechs Chloroacetaniliden in <i>S. cerevisiae</i> . ....  | 122 |
| Abbildung 3.44 Aktivität von AtGSTs gegenüber PC in <i>S. cerevisiae</i> . ....  | 122 |
| Abbildung 3.45 Relative Aktivität der AtGSTs gegenüber Chloroacetaniliden in <i>S. cerevisiae</i> . ....   | 123 |
| Abbildung 3.46 Aktivität der GSTF11 und GSTF12 gegenüber CDNB und PC in verschiedenen Hefestämmen. ....  | 125 |
| Abbildung 3.47 Einfluss von Chloroacetaniliden auf das Wachstum von Arabidopsis-Keimlingen. ....   | 125 |
| Abbildung 3.48 Wurzelwachstum von <i>A. thaliana</i> auf Chloroacetanilid-haltigem Medium. ....  | 126 |
| Abbildung 4.1 Detoxifizierung von ATZ in <i>Medicago sativa</i> . ....   | 132 |
| Abbildung 4.2 Molekulare Substrukturen, die mit GSH reagieren. ....  | 133 |
| Abbildung 4.3 Dreidimensionale Struktur von pflanzlichen GSTs der Phi- und Tau-Klasse. ....  | 138 |
| Abbildung 4.4 Substrat-bindende <i>H-site</i> in GSTs der Tau-Klasse. ....   | 139 |
| Abbildung 4.5 Vergleich der <i>H-site</i> der aktiven GSTs U5, U18 und U22 mit denen ihrer nächstverwandten GST aus Arabidopsis. ....                            | 140 |
| Abbildung 4.6 Vergleich der Chlorotriazin-aktiven GSTs. ....   | 143 |
| Abbildung 4.7 Oberfläche der Bindetasche von ausgewählten GSTUs. ....  | 144 |

Abbildung 4.8 Alignment des Bereichs um das katalytisch aktive Serin der GSTFs aus Arabidopsis.  
..... 146

Abbildung 4.9 Übersicht der Aktivität der Arabidopsis-GSTs gegenüber verschiedenen Substraten.  
..... 148

Abbildung 4.10 Phylogenetischer Stammbaum von GSTs sechs verschiedener Pflanzenspezies. 151

Abbildung 4.11 Schema der Evolution der Landpflanzen und der Entwicklung von Flavonoiden. 153

Abbildung 4.12 Produkte der enzymatischen und nicht-enzymatischen Lipidperoxidation in  
Pflanzen..... 155

Abbildung 4.13 Mögliche endogene Funktionen der GSTs in Zusammenhang mit ROS. .... 157

Abbildung 6.1 Arabidopsis WT und KO-Linien auf Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen  
ATZ..... 200

Abbildung 6.2 Expression von GSTs in *A. thaliana*. .... 200

**Tabellenverzeichnis**

|   |     |
|---|-----|
| Tabelle 1.1 Ausgewählte Herbizidklassen, eingeteilt nach ihrem Wirkmechanismus und mit Beispielen ihrer Vertreter. ....   | 6   |
| Tabelle 1.2 Charakteristika der pflanzlichen GST-Klassen in <i>A. thaliana</i> . ....   | 24  |
| Tabelle 3.1 Annotierte schwefelhaltige Metabolite, identifiziert in Extrakten aus <i>S. cerevisiae</i> . ....   | 72  |
| Tabelle 3.2 Nachweis von GSH-Konjugaten ausgesuchter Xenobiotika in unterschiedlich schwefelmarkierten Hefeextrakten. ....  | 74  |
| Tabelle 4.1 In Metabolmstudien identifizierte, schwefelhaltige Metabolite in <i>S. cerevisiae</i> . ....  | 129 |
| Tabelle 6.1 In der vorliegenden Arbeit verwendete Primer. ....  | 173 |
| Tabelle 6.2 In dieser Arbeit erzeugte und verwendete <i>E. coli</i> -Stämme. ....   | 176 |
| Tabelle 6.3 <i>S. cerevisiae</i> -Deletionsmutanten. ....   | 177 |
| Tabelle 6.4 GST-exprimierende <i>S. cerevisiae</i> . ....   | 178 |
| Tabelle 6.5 Verwendete Deletions- und Überexpressionlinien von <i>A. thaliana</i> . ....  | 181 |
| Tabelle 6.6 In Hefeextrakten mittels ICR-FT/MS identifizierte schwefelhaltige Massen. ....  | 182 |
| Tabelle 6.7 In der Mutante $\Delta cis2\Delta cpc\Delta cpy + MET15$ angereicherte schwefelhaltige Massen. ....   | 187 |
| Tabelle 6.8 Untersuchte putative GST-Substrate. ....  | 190 |
| Tabelle 6.9 Übersicht der spezifischen schwefelhaltigen Massen in <i>S. cerevisiae</i> , nach Exposition mit verschiedenen Xenobiotika. ....                                      | 194 |
| Tabelle 6.10 Übersicht der spezifischen schwefelhaltigen Massen <i>in vitro</i> , nach Inkubation verschiedener Xenobiotika mit GSH. ....   | 196 |
| Tabelle 6.11 Übersicht der spezifischen schwefelhaltigen Massen in <i>A. thaliana</i> , nach Exposition von Keimlingen in Flüssigkultur gegenüber verschiedenen Xenobiotika. .... | 198 |

## Abkürzungsverzeichnis

|       |  |
|-------|--|
| °C    | Grad Celsius   |
| μ     | mikro  |
| 2,4-D | 2,4-Dichlorphenoxyessigsäure                                 |
| ABA   | Abscisinsäure  |
| ABC   | <i>ATP-binding cassette</i>                                  |
| AC    | Alachlor   |
| ACC   | Acetyl-CoA-Carboxylase                                       |
| ACN   | Acetonitril  |
| ACT   | Acetochlor   |
| ADP   | Adenosindiphosphat   |
| ALS   | Acetolacetsynthase   |
| Amp   | Ampicilin  |
| AtGST | Glutathiontransferase aus <i>Arabidopsis thaliana</i>        |
| ATP   | Adenosintriphosphat  |
| ATZ   | Atrazin  |
| BC    | Butachlor  |
| BITC  | Benzylisothiocyanat  |
| bp    | Basenpaare   |
| BSA   | Bovines Serumalbumin   |
| bzw.  | beziehungsweise  |
| CCD   | <i>charge-coupled device</i>                                 |
| cDNA  | komplementäre DNA  |
| CDNB  | 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen                                   |
| CG    | Cysteinylglyin   |
| CIS2  | γ-Glutamyltranspeptidase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> |
| Col-0 | <i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Columbia                  |
| CP    | Carboxypeptidase   |
| CPC   | Carboxypeptidase C   |
| CPY   | Carboxypeptidase Y   |
| CT    | Chlortoluron   |
| CZ    | Cyanazin   |
| d     | Tag  |
| DHAR  | Dehydroascorbatreduktase                                     |
| DI    | Direktinjektion  |
| DMC   | Dimethachlor   |
| DMSO  | Dimethylsulfoxid   |
| DNA   | Desoxyribonukleinsäure                                       |
| EPSPS | Enolpyruvatshikimat-3-phosphosynthase                        |
| ESI   | Elektrosprayionisation                                       |
| g     | Gramm  |
| Gen   | Gentamycin   |
| GFP   | grün fluoreszierendes Protein                                |
| GGT   | γ-Glutamyltranspeptidase                                     |

|        |  |
|--------|--|
| GHR    | Glutathionhydroquinonreduktase   |
| Glc    | Glukose  |
| GRX    | Glutaredoxin   |
| GS     | Glutaminsynthetase   |
| GSH    | Glutathion   |
| GST    | Glutathiontransferase  |
| GSTF   | Glutathiontransferase der Klasse Phi   |
| GSTI   | Glutathiontransferase der Klasse Iota  |
| GSTL   | Glutathiontransferase der Klasse Lambda                                      |
| GSTT   | Glutathiontransferase der Klasse Theta                                       |
| GSTU   | Glutathiontransferase der Klasse Tau   |
| GSTZ   | Glutathiontransferase der Klasse Zeta  |
| GT     | Glycosyltransferasen   |
| GTO    | Glutathiontransferase der Klasse Omega                                       |
| GTT    | Glutathiontransferase aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i>                    |
| h      | Stunde   |
| HCA    | hierarchischer Clusteranalyse  |
| hGST   | humane Glutathiontransferase   |
| HPLC   | Hochleistungsflüssigkeitschromatographie                                     |
| l      | loxylin  |
| ICR-FT | Ionenzyklotronresonanz-Fouriertransformation                                 |
| JA     | Jasmonsäure  |
| Kan    | Kanamycin  |
| KO     | <i>knock out</i>   |
| l      | Liter  |
| LB     | <i>lysogeny broth</i>  |
| LV     | Leervektor   |
| M      | molar  |
| m      | mili   |
| m      | Masse  |
| m/z    | Masse pro Ladung   |
| MAPEG  | <i>membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism</i> |
| MC     | Metolachlor  |
| MDR    | <i>multi drug resistant</i>  |
| MeOH   | Methanol   |
| MHR    | Multiherbizidresistenz   |
| min    | Minute   |
| MQ     | Milipore-Wasser  |
| MS     | Massenspektometrie   |
| MS     | Medium nach Murashige und Skoog  |
| NADPH  | Nicotinamidadenindinukleotidphosphat   |
| NBD-Cl | 4-Chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol   |
| NMR    | Kernspinresonanzspektroskopie  |
| NTSR   | <i>non-target-site-resistance</i>  |
| OD     | optische Dichte  |
| OE     | Überexpressionslinie   |

|          |  |
|----------|--|
| OPDA     | 12-Oxophytodiensäure   |
| P        | Propanil   |
| P450     | Cytochrom-P450   |
| PC       | Propachlor   |
| PCR      | Polymerasekettenreaktion   |
| PCS      | Phytochelatinsynthase  |
| PEG      | Polyethylenglykol  |
| pH       | negative dekadische Logarithmus der Wasserstoffionen                   |
| PM       | Permethrin   |
| ppm      | <i>parts per million</i>   |
| PSII     | Photosystem II   |
| PTC      | Pretilachlor   |
| PUFA     | mehrfach ungesättigte Fettsäure ( <i>poly unsaturated fatty acid</i> ) |
| Rif      | Rifampicin   |
| ROS      | reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )          |
| rpm      | <i>rounds per minute</i>   |
| s        | Sekunde  |
| SBZ      | Sebuthylazin   |
| SDM      | <i>site directed mutagenesis</i>                                       |
| SDS-PAGE | Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese                    |
| SZ       | Simazin  |
| TBZ      | Terbuthylazin  |
| TCHQD    | Tetrachlorhydroquinon-Dehalogenase                                     |
| T-DNA    | Transfer-DNA   |
| TEF      | Translationselongationsfaktor  |
| TSR      | <i>target-site-resistance</i>  |
| U        | unit   |
| ün       | über Nacht   |
| v/v      | Volumenanteil/Volumenanteil  |
| VLCFA    | <i>very long chain fatty acid</i>                                      |
| w/v      | Gewichtsanteil/Volumenanteil   |
| WT       | Wildtyp  |
| ZmGST    | Glutathiontransferase aus <i>Zea mays</i>                              |
| γ-EC     | γ-Glutamylcystein  |
| γ-ECG    | Glutathion   |

Aminosäuren sind nach dem allgemeinen Ein- oder Dreibuchstabencode abgekürzt.

## Zusammenfassung

Herbizide sind ein wichtiger Bestandteil der modernen Landwirtschaft. Unterschiede in der Detoxifizierung durch susceptible Unkräuter und Nutzpflanzen bilden die Basis für die Effizienz dieser Substanzen. Ein essentieller Mechanismus der Detoxifizierung ist dabei die Konjugation an das Tripeptid Glutathion (GSH), die durch Glutathiontransferasen (GSTs) katalysiert wird. In Pflanzen besteht die GST-Familie aus einer Vielzahl von Mitgliedern, deren funktionelle Redundanz und überlappende Substratspezifität die Charakterisierung dieser Enzyme erschwert. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zum einen eine Methode entwickelt, um potentielle GST-Substrate mittels stabiler Isotopenmarkierung und hochauflösender Massenspektrometrie (MS) zu identifizieren, und zum anderen die Substratspezifität der 57 GSTs aus *Arabidopsis thaliana* gegenüber zwei Herbizidklassen zu ermitteln.

*Saccharomyces cerevisiae* wurde als Modellsystem verwendet, um Herbizid-GSH-Konjugate mittels MS zu identifizieren. Die Kultivierung der Hefe in Medium mit Isotopem  $^{34}\text{S}$ -Schwefel resultierte in der erfolgreichen Markierung und Identifizierung von endogenen Schwefelmetaboliten und entsprechenden GSH-Konjugaten nach Herbizidbelastung. Der Nachweis dieser Detoxifizierungsprodukte wurde durch die Deletion von Genen, die für den weiteren Abbau der GSH-Konjugate entscheidend sind, optimiert. Die Belastung von Hefezellen mit 42 verschiedenen Pestiziden in Gegenwart von  $^{34}\text{S}$ -Schwefel und die nachfolgende Analyse der metabolischen Extrakte mittels MS führte in sechs Fällen zur Identifizierung der entsprechenden GSH-Konjugate. Am Beispiel des Herbizides Atrazin wurde gezeigt, dass die heterologe Expression von pflanzlichen GSTs aus *Arabidopsis* die Bildung von GSH-Konjugaten in Hefe begünstigt.

Auch für die Untersuchung der Substratspezifität und genauere Charakterisierung der *Arabidopsis*-GSTs wurden die Enzyme heterolog in Hefe exprimiert und ihre Aktivität gegenüber Mitgliedern der Herbizidklassen der Chlorotriazine und Chloroacetanilide getestet. Dafür wurde eine Hefe-Deletionsmutante verwendet, bei der neben den Genen für den GSH-Konjugatkatabolismus zusätzlich vier endogene GST-Gene entfernt wurden. Die Analyse der Chlorotriazine identifizierte lediglich drei aktive GSTs, GSTU5, GSTU18 und GSTU22, und wies damit eine - für pflanzliche GSTs ungewöhnliche - enge Substratspezifität gegenüber dieser Substanzklasse auf. Gezielte Änderungen in der Aminosäuresequenz der aktiven GSTU5 hatten keinen Effekt auf die Aktivität des Enzyms, was darauf hin deutet, dass ein Zusammenspiel mehrerer Proteinregionen die Substratbindung und -umsetzung bestimmt. Die Überexpression der aktiven GSTs führte in *Arabidopsis*, welche als Wildtyp susceptibel ist, zur Resistenz gegenüber den Chlorotriazinen, was auf die erhöhte Detoxifizierung der Herbizide zurück geführt werden konnten.

Im Gegensatz zu den Chlorotriazinen war die Anzahl der GSTs, für die der Umsatz der zweiten untersuchten Herbizidklasse, den Chloroacetaniliden, in Hefe nachgewiesen werden konnte, deutlich höher. Dabei zeigte sich mit zunehmender Größe des Substrates eine größere Substratspezifität – während das kleinsten Chloroacetanilid-Derivat, Propachlor, von 27 GSTs konjugiert wurde, wurde die Glutathionylierung des größten getesteten Chloroacetanilides, Pretilachlor, durch fünf GSTs katalysiert.

Die Analyse der GSTs aus *Arabidopsis* in *S. cerevisiae* ermöglichte Einblicke in das Substratspektrum dieser Enzyme und zeigte eine hohe, zuvor nicht beobachtete, Spezifität. Auf Basis dieser Daten konnten transgene, herbizidresistente Pflanzen entwickelt werden. Das zunehmende Verständnis der Substratspezifität gegenüber Xenobiotika kann neben der Entwicklung neuer Herbizide auch Hinweise auf mögliche endogene Substrate dieser Enzyme liefern.

## Summary

Herbicides are an important feature of modern agriculture whose function is based on the differential metabolism of crop versus weed plants. A major mechanism of herbicide detoxification is the conjugation of the tripeptide glutathione (GSH), a reaction that is catalyzed by glutathione transferases (GSTs). The large number of GSTs in a plants, together with an overlapping substrate specificity, has thus far impeded an analysis of these enzymes. In this study, a method for the identification of GST substrates was established by combining stable isotope labeling and high resolution mass spectrometry (MS). In addition, the substrate specificity of 57 GSTs from *Arabidopsis thaliana* towards members of two different herbicide classes was analysed.

*Saccharomyces cerevisiae* was used as a model system for the identification of GSH-herbicide-conjugates. Cultivation of yeast in media supplemented with <sup>34</sup>S sulfur resulted in the successful labeling and identification of endogenous sulfur metabolites and GSH conjugates subsequent to herbicide exposure. The detection of these detoxification products was improved through the deletion of genes that are responsible for further conjugate catabolism in yeast. The exposure of yeast cells towards 42 different pesticides and the following analysis of the metabolic extracts by MS resulted in the identification of only six corresponding GSH conjugates. By using the herbicide atrazine as an example, the heterologous expression of plant GSTs from *Arabidopsis* was shown to form a basis for detecting GSH conjugates in yeast.

The heterologous expression was also used to analyse the substrate specificity, to further characterize single *Arabidopsis*-GSTs and to investigate the activity of these enzymes towards the members of the herbicide classes chlorotriazines and chloroacetanilides. To this end, a yeast mutant was created, in which the genes responsible for GSH conjugate catabolism and four endogenous GST genes were deleted. The analysis of the chlorotriazines revealed only three active GSTs, GSTU5, GSTU18 and GSTU22 - an unusually narrow substrate specificity for plant GSTs. Directed amino acid changes in the active GSTU5 did not result in an altered activity, which indicates the participation of several protein regions in terms of substrate recognition and glutathionylation. The overexpression of the active GSTs in *A. thaliana*, a plant that is susceptible to chlorotriazines by nature, caused resistance, which was mediated by an enhanced herbicide detoxification.

In contrast to the results obtained with chlorotriazines, the number of active GSTs in yeast with the second herbicide class, the chloroacetanilides, was higher. With increasing size of the derivative the substrate specificity of the GSTs increased. 27 GSTs were active against the smallest tested

## Summary

---

chloroacetanilide, propachlor, whereas the number of active GSTs decreased to five with the biggest substrate, pretilachlor.

The analysis of Arabidopsis GSTs in *S. cerevisiae* allowed insight in the substrate spectra of these enzymes and showed a high specificity, which was not observed before. Based on the data obtained from yeast, transgenic herbicide-resistant plants were generated. A further understanding of substrate discrimination can be used for the development of new herbicides as well as for the detection of putative endogenous substrates.

## 1. Einleitung

### 1.1. Herbizide – Nutzen, Funktion, Metabolisierung

Pestizide sind chemische Substanzen, die als Pflanzenschutzmittel vor allem in der Landwirtschaft aber auch im privaten oder öffentlichen Raum in der Grünflächenpflege verwendet werden. Dabei unterscheidet man grundsätzlich zwischen Herbiziden, die das Wachstum von konkurrierenden Pflanzen begrenzen, Fungiziden, die Pflanzen vor Pilzpathogenen schützen, und Insektiziden, die als Schutz vor Herbivoren dienen. Daneben gibt es noch Nematizide, Rodentizide und weitere Arten, die jedoch nur einen geringen Anteil des gesamten Pestizidverbrauchs ausmachen. In Deutschland werden etwa 50 % der Fläche landwirtschaftlich genutzt (Stand 2012; Statistisches Jahrbuch Deutschland 2014), der Großteil davon wird mit Pestiziden behandelt, wobei Herbizide mit fast 40 % den höchsten Anteil in Deutschland ausmachen (Abbildung 1.1 A). Neben dem begleitenden Herbizideinsatz während der Fruchtreife wird auch der Einsatz von nicht-selektiven Totalherbiziden häufig genutzt. Durch das Abtöten aller Pflanzen auf der Ackerfläche wird das Umpflügen unnötig. Herbizide sind heutzutage ein bedeutender Teil der effizienten, modernen Landwirtschaft und das Verständnis ihrer Wirkweise und Metabolisierung ist essentiell, um sie weiterhin, auch gegen das Aufkommen von herbizidresistenten Unkräutern, effektiv nutzen zu können (Kraehmer, van Almsick *et al.*, 2014).

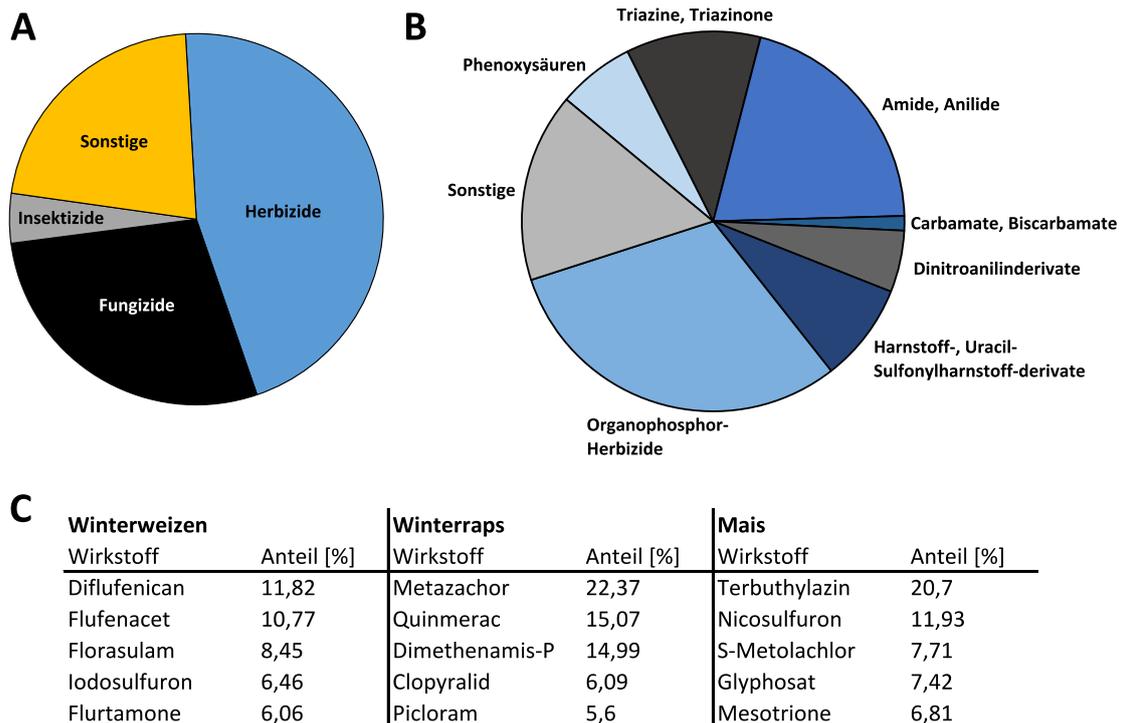
#### 1.1.1. Herbizidklassen und ihre Wirkmechanismen

Herbizide inhibieren spezifisch Schlüsselenzyme des pflanzlichen Stoffwechsels. Anhand ihres Wirkmechanismus können sie in verschiedene Gruppen unterteilt werden (Tabelle 1.1). Das erste moderne Herbizid war ein synthetisches Auxin, 2,4-Dichlorophenoxyessigsäure (2,4-D), welches bereits in den 1940er Jahren identifiziert wurde (Kraehmer, Laber *et al.*, 2014). Zu den am häufigsten vertretenen Wirkmechanismen zählen Herbizide, die die Photosynthese, die Aminosäurensynthese und die Fettsäurenbiosynthese inhibieren (Kraehmer, Laber *et al.*, 2014). Daneben werden noch Auxin-ähnliche Stoffe, Inhibitoren der Carotenoidbiosynthese, Inhibitoren der Zellteilung und einige andere eingesetzt. In den meisten Fällen setzt sich jede dieser Gruppen aus mehreren Herbizidklassen zusammen, die sich in ihrer chemischen Grundstruktur unterscheiden (Heap, 2014).

**Tabelle 1.1 Ausgewählte Herbizidklassen, eingeteilt nach ihrem Wirkmechanismus und mit Beispielen ihrer Vertreter.**

| Wirkmechanismus  | Ausgewählte Herbizidklassen                                      | Wichtige Vertreter   |
|--|--|--|
| Inhibitor der Acetyl-CoA-Carboxylase (ACC)                           | Aryloxyphenoxypropionate<br>Cyclohexanedione<br>Phenylpyrazoline | Haloxypop-R-methyl, Propaquizafop<br>Cycloxydim<br>Pinoxaden                   |
| Inhibitoren der Acetolacetatsynthase (ALS)                           | Sulfonylharnstoffe<br>Imidazolinone<br>Triazolopyrimidine        | Mesosulfuron, Nicosulfuron<br>Imazamox, Imazapyr<br>Florasulam                 |
| Inhibitoren des Photosystems II (PSII)                               | Triazine<br>Triazinone<br>Harnstoffe<br>Nitrile                  | Atrazin, Terbutylazin<br>Metamitron<br>Chlortoluron, Isoproturon<br>Bromoxynil |
| Inhibitoren der Protoporphyrinogenoxidase (PPO)                      | N- phenylphthalimide<br>Diphenylether                            | Flumioxazin<br>Fluorodifen   |
| Inhibitoren der Carotenoidbiosynthese an der Phytoendesaturase (PDS) | Nicotinanilide   | Diflufenican   |
| Inhibitoren der Carotenoidbiosynthese – unbekanntes Zielenzym        | Triazole<br>Oxazolidinone  | Amitrol<br>Clomazone   |
| Inhibitoren der 4-Hydroxyphenyl-Pyruvate-Dioxygenase (4HPPD)         | Isoxazole<br>Triketone   | Isoxaflutol<br>Mesotrion   |
| Inhibitoren der Enolpyruvylshikimat-Phosphat-Synthase (EPSPS)        | Phosponat  | Glyphosat  |
| Inhibitoren der Glutaminsynthetase                                   | Phosponat  | Glufosinat   |
| Inhibitoren des Mikrotubuli-Cytoskeletts                             | Dinitroaniline<br>Benzamide                                      | Pendimethalin<br>Propyzamid  |
| Inhibitoren der Synthese von langkettigen Fettsäuren (VLCFA)         | Chloroacetamide<br>Acetamide                                     | Metolachlor, Metazachlor<br>Napropamid   |
| Inhibitoren der Lipidbiosynthese                                     | Thiocarbamate  | Prosulfocarb   |
| Synthetische Auxine  | Phenoxyssäuren<br>Benzoessäuren<br>Pyridincarboxysäuren          | 2,4-D<br>Dicamba<br>Picloram, Clopyralid                                       |

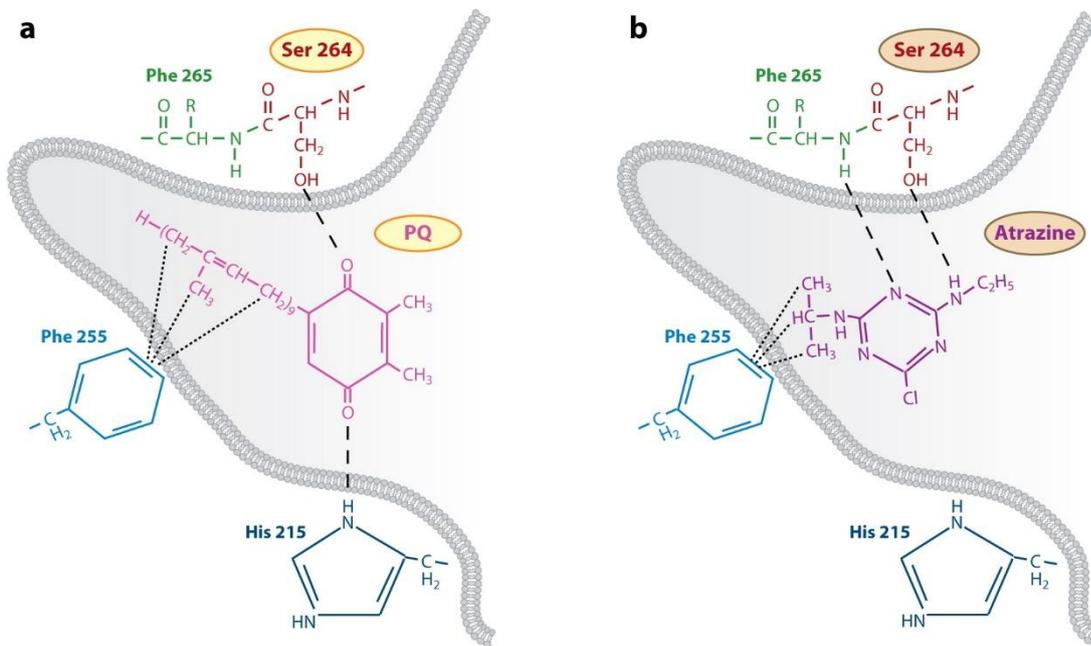
Zu den am häufigsten genutzten Herbizidklassen in Deutschland zählen Organophosphor-Herbizide, zu denen die beiden Totalherbizide Glyphosat und Glufosinat gehören, Amide/Anilide und die Photosystem II (PSII)-inhibierenden Triazine und Triazinone (Stand 2015, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, [www.bvl.bund.de/psmstatistiken](http://www.bvl.bund.de/psmstatistiken)) (Abbildung 1.1 B). Acetyl-CoenzymA-Carboxylase (ACC)- und Acetolacetatsynthase (ALS)- Inhibitoren spielen in Deutschland eine weniger wichtige Rolle. Die Wirkmechanismen dieser bedeutenden Herbizidklassen werden im Folgenden genauer beleuchtet.



**Abbildung 1.1 Pestizidverbrauch und Wirkstoffanteile in Deutschland im Jahr 2014.**

Im Inland abgegebene Pestizide, eingeteilt nach ihrem Wirkungsbereich (A). Einteilung der im Inland abgegebenen Herbizide nach Wirkstoffklasse (B). Übersicht der fünf am häufigsten verwendeten Wirkstoff im Anbau von Winterweizen, Winterraps und Mais in Deutschland (C). Der Anteil bezieht sich auf den Behandlungsindex, der in den erfassten Betrieben die Häufigkeit der Anwendungen, die behandelte Fläche und die aufgewendete Menge berücksichtigt (Quelle: Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit, Julius Kühn-Institut).

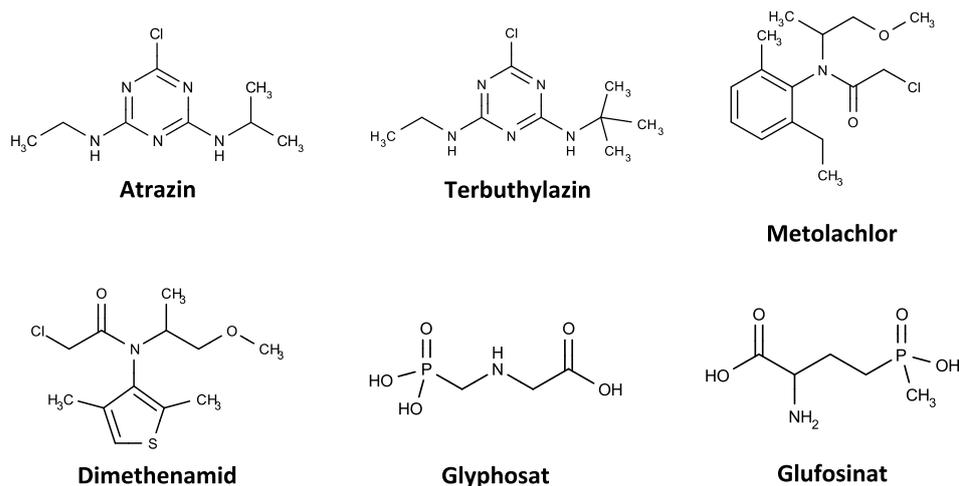
Der Wirkmechanismus der Triazine ist besonders gut erforscht, was einer erhöhten Resistenz von Unkräutern gegenüber diesen Substanzen geschuldet ist. Triazine inhibieren die Photosynthese, indem sie, wie alle anderen PSII-inhibierenden Herbizide auch, an das D1-Protein im Photosystem II binden (Mitsutake *et al.*, 1986). Dadurch wird die Bindung von Plastoquinon verhindert und der Elektronentransport unterbrochen (Fuerst und Norman, 1991). Aufgrund von intensiver Forschung ist heute bekannt, welche Aminosäuren in dem Protein an der Bindung von dem am häufigsten genutzten Triazin Atrazin (ATZ) beteiligt sind (Goloubinoff *et al.*, 1984; Hirschberg und McIntosh, 1983) (Abbildung 1.2). Modifikationen an diesen Stellen haben massiven Einfluss auf die Bindung und damit die Wirksamkeit des Herbizides. In Deutschland ist der Einsatz von ATZ wegen seiner hohen Persistenz im Boden und seinem Vorkommen im Grundwasser seit 1991 verboten, in der EU trat das Verbot 2004 in Kraft (Jablonowski *et al.*, 2011). In den USA ist es, nach Glyphosat, bis heute das am häufigsten verwendete Pestizid, was an den geringen Kosten, der geringen Toxizität und der hohen Selektivität in Mais liegt (Thelin und Stone, 2013). In Deutschland ist das verwandte Triazinderivat Terbuthylazin das am häufigsten verwendete Herbizid im Maisanbau (Stand 2015, Bundesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit) (Abbildung 1.3).



**Abbildung 1.2 Substratbindestelle im D1 Protein des PSII.**

Plastoquinon (PQ) interagiert mit dem D1-Protein über die Aminosäuren Ser264, Phe255 und His215 (A). ATZ verhindert die Bindung von Plastoquinon, indem es diese Bindestelle besetzt, was den Elektronentransport im PSII unterbricht (B). Unkrautarten, bei denen das Ser264 mutiert ist, sind gegenüber ATZ resistent, haben aber aufgrund einer weniger effizienten Bindung des Plastoquinons Nachteile, wenn kein ATZ vorhanden ist. (Abbildung entnommen aus Powles und Yu, 2010)

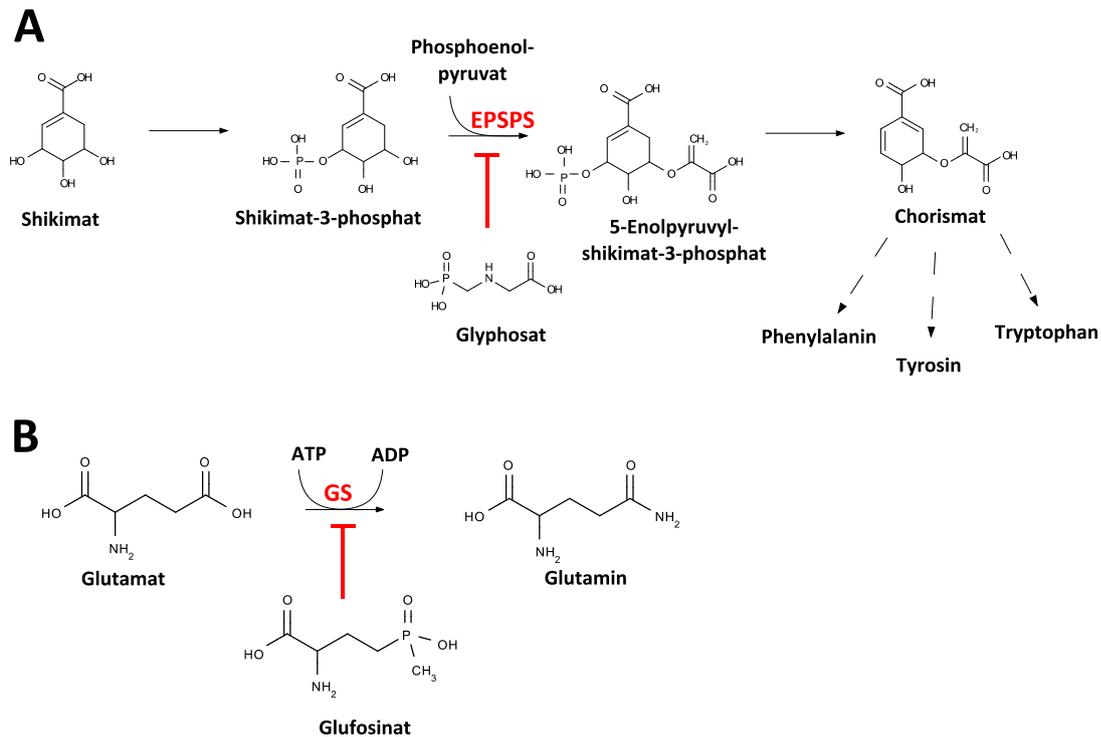
Zu den Amiden und Aniliden zählen Herbizide wie Dimethenamid und Metolachlor, welche die Synthese langkettiger Fettsäuren (*very long chain fatty acids*, VLCFA) blockieren, worauf die Zellteilung und das Wachstum der Pflanze inhibiert werden (Böger, 1997) (Abbildung 1.3). Anhand der heterologen Expression verschiedener VLCFA-Elongasen aus *Arabidopsis thaliana* in Hefe konnten strukturell unterschiedliche Anilide identifiziert werden, die diese Enzyme hemmen und somit die molekulare Basis der physiologischen Eigenschaften dieser Herbizide begründen (Trenkamp *et al.*, 2004). Anilide sind ein Beispiel für eine Herbizidklasse, bei welcher erst mehr als 30 Jahre nach der Markteinführung der molekulare Wirkmechanismus aufgeklärt wurde (Seitz *et al.*, 2003).



**Abbildung 1.3 Chemische Struktur ausgewählter Herbizide.**

Die chemische Struktur, die beispielhaft die in Deutschland meistverwendeten, Herbizide darstellen. Atrazin und Terbutylazin gehören zu den PSII-inhibierenden Triazinen. Dabei ist der Einsatz von Atrazin seit mehr als 20 Jahren in Deutschland verboten und Terbutylazin ist ein abgeleitetes Derivat, was zurzeit zu den häufigsten Herbiziden im Maisanbau in Deutschland gehört. Metolachlor und Dimethenamid sind Beispiele für Inhibitoren der langkettigen Fettsäuresynthese und Glyphosat und Glufosinat hemmen die Aminosäurebiosynthese der Pflanze.

Ein herausragendes Beispiel ist der 5-Enolpyruvylshikimat-3-phosphatsynthase (EPSPS)-Inhibitor Glyphosat, der bereits 1974 auf dem Markt eingeführt wurde und zu den Organophosphor-Herbiziden gehört. Seit der Verwendung von gentechnisch veränderten Nutzpflanzen wird Glyphosat als Totalherbizid flächendeckend eingesetzt (Powles und Yu, 2010). Obwohl in Deutschland die Verwendung von gentechnisch modifizierten Pflanzen in der Landwirtschaft verboten ist, ist Glyphosat ein im Mais- und Weizenanbau häufig verwendetes Herbizid (Abbildung 1.3). Da keine Kulturpflanze von Natur aus resistent gegenüber Glyphosat ist, steht der hohe Verbrauch wahrscheinlich eher im Zusammenhang mit der Vor- und Nachbehandlung der Ackerflächen als mit einem Einsatz in der Nutzpflanze. Die Bindung von Phosphoenolpyruvat an die EPSPS, ein Enzym des Shikimat-Stoffwechsels, welcher für die Bildung aromatischer Aminosäuren verantwortlich ist, konkurriert mit der Bindung von Glyphosat an dieses Enzym (Amrhein *et al.*, 1980; Duke, 1990) (Abbildung 1.4 A). Auch das Organophosphor-Herbizid Glufosinat hemmt die Aminosäurebiosynthese, indem es irreversibel an der Bindestelle des Glutamats in der Glutaminsynthetase bindet (Duke, 1990) (Abbildung 1.4 B).



**Abbildung 1.4 Inhibition der Aminosäurebiosynthese durch die Herbizide Glyphosat und Glufosinat.**

Das weltweit am häufigsten eingesetzte Herbizid Glyphosat inhibiert das Enzym Enolpyruvatshikimat-3-phosphosynthase (EPSPS) und damit die Synthese der aromatischen Aminosäuren (A). Durch die Inhibition des Glutaminsynthetase (GS) durch Glufosinat wird die Synthese von Glutamin unterbrochen, es kommt zu einer Anreicherung von Ammoniak und dem Absterben der Pflanze (B).

Mit ihrer strukturellen Vielfalt können Herbizide verschiedene essentielle Stoffwechselwege der Pflanze hemmen. Resistente Nutzpflanzen sind durch eine effiziente Detoxifizierung der Herbizide vor den Auswirkungen geschützt. Sie bewältigen die chemische Varianz der Herbizide durch die Abundanz mehrerer paralleler, multi-enzymatischer Abbaumechanismen.

### 1.1.2. Pflanzliche Detoxifizierung von Herbiziden

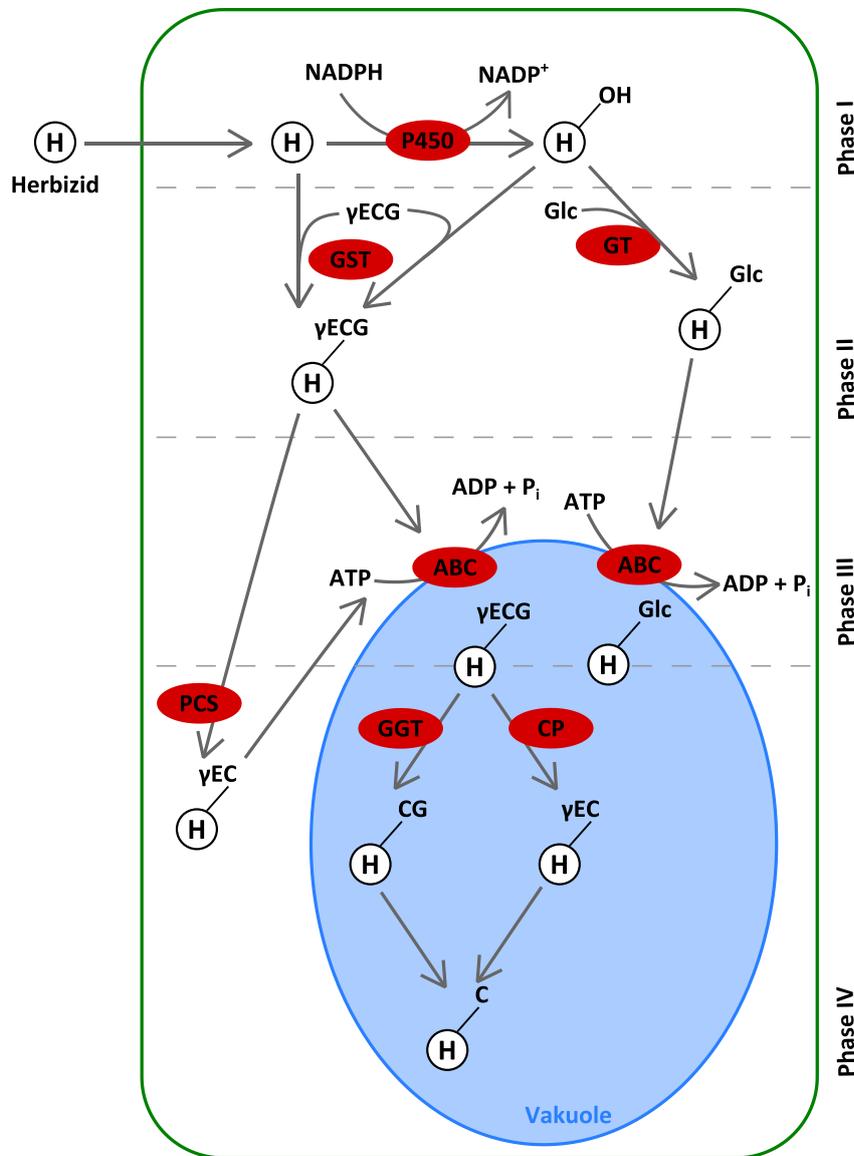
Die Grundlage der Selektivität von Herbiziden basiert auf einer effizienteren oder schnelleren Detoxifizierung dieser Substanzen in Nutzpflanzen im Vergleich zu suszeptiblen Unkräutern. Es gibt einen vierstufigen Mechanismus wie Xenobiotika, zu denen auch Herbizide zählen, in der Pflanze detoxifiziert werden: Aktivierung, Metabolisierung, Transport und Abbau (Edwards *et al.*, 2011) (Abbildung 1.5).

Der erste Schritt der Detoxifizierung ist häufig die Aktivierung des Xenobiotikums und beinhaltet in den meisten Fällen die Aktivität von Cytochrom-P450-Enzymen (P450s), aber auch von Esterasen und Amidasen (Coleman *et al.*, 1997). P450s katalysieren die Reduktion, Oxidation oder Hydroxylierung des Herbizids und führen funktionelle Gruppen ein, die für eine weitere

Metabolisierung bedeutend sind (Siminszky, 2006). Aufgrund der hohen Anzahl von P450s, eine der größten Proteinfamilien in Pflanzen mit 244 Mitgliedern in *A. thaliana*, gibt es eine hohe Varianz, die zu einer variablen Substratspezifität führt (Bak *et al.*, 2011). Herbizide vieler verschiedener Klassen werden durch P450s in einem ersten Schritt der Detoxifizierung metabolisiert, dazu zählen 2,4-D, Bentazon, Chloroacetanilide, Phenyl- und Sulfonylharnstoffe (Siminszky, 2006). Eine der ersten P450s, bei welcher Aktivität gegenüber verschiedenen Herbiziden der Phenylharnstoff-Klasse nachgewiesen wurde, war die CYP76B1 aus Topinambur (*Helianthus tuberosus*) (Robineau *et al.*, 1998). CYP76B1 ist ein Protein, das stark durch Herbizide induziert wird und vor allem gegenüber Phenylharnstoffen aktiv ist. Yun und Kollegen konnten zeigen, dass die spezifische Induktion von P450s durch verschiedene Herbizide in resistenten Individuen des Unkrauts *Echinochloa phyllopogon* entscheidend für die Resistenz ist (Yun *et al.*, 2005). Bisher gibt es nur wenige Untersuchungen, die sich mit der Auswirkung der Überexpression von P450s auf die Herbizidtoleranz von Pflanzen befassen und wenige dieser Analysen beinhalten pflanzliche P450s. Viel häufiger wurden humane P450s eingesetzt, um die Herbizidtoleranz von Pflanzen zu modifizieren. Die Analyse einer humanen P450 in Reis resultierte in einer erhöhten Toleranz der Pflanzen gegenüber 13 von 17 getesteten Herbiziden verschiedener Klassen (Hirose *et al.*, 2005). Auch die Überexpression vier verschiedener humaner P450s in Reis und Kartoffel wies Kreuzresistenzen gegenüber mehreren Herbiziden auf (Inui und Ohkawa, 2005). Die wenigen pflanzlichen Beispiele konzentrieren sich auf die Resistenz gegenüber der Herbizidklasse der Phenylharnstoffe. Die Überexpression der CYP71A10 aus Sojabohne (*Glycine max*) in Tabak führte zu einer erhöhten Metabolisierung von vier Phenylharnstoff-Herbiziden, *in vivo* waren die transgenen Pflanzen gegenüber zwei der vier getesteten Herbizide resistent (Siminszky *et al.*, 1999). Linuron- und Chlortoluron-Resistenzen konnten durch das Einbringen der CYP76B1 aus Topinambur in Arabidopsis und Tabak erzielt werden (Didierjean *et al.*, 2002).

In der zweiten Phase der Detoxifizierung werden die Herbizide oder die zuvor aktivierten Metabolite der ersten Phase an Moleküle, wie Glutathion (GSH,  $\gamma$ -ECG), Glukose (Glc) oder Aminosäuren, konjugiert. Dies erhöht ihre Polarität und senkt meist ihre Toxizität (Edwards *et al.*, 2011). Die wichtigsten Enzyme der Phase II, die diese Reaktionen katalysieren, sind die Glutathiontransferasen (GSTs) und die Glycosyltransferasen (GTs). GSTs konjugieren Herbizide an das Tripeptid GSH, wobei Halogene die häufigste Abgangsgruppe in dieser Reaktion darstellen. Sie werden in Zusammenhang mit der Detoxifizierung vieler Herbizide gebracht, darunter Triazine, Chloroacetanilide und Diphenylether (Cummins *et al.*, 1997; Hatton *et al.*, 1996; Hatton *et al.*, 1999). Ihre Überexpression führte bei vielen Pflanzen zur Resistenz gegenüber einer Vielzahl von Herbiziden und unterstreicht somit die prominente Rolle dieser Enzyme bei der Detoxifizierung von Herbiziden (Hu *et al.*, 2009; Karavangeli *et al.*, 2005; Milligan *et al.*, 2001). Die hohe Varianz in ihrer

Substratspezifität wird aber zu einem zunehmenden Problem bei der Selektivität von Herbiziden gegen Unkräuter, die durch GST-relevante Mutationen eine natürliche Resistenz erlangt haben (Anderson und Gronwald, 1991; Gray *et al.*, 1996).



**Abbildung 1.5 Schematische Darstellung des Herbizidabbaus in der Pflanzenzelle.**

Der Herbizidabbau wird in mehrere Phasen unterteilt; die wichtigsten Komponenten sind hier dargestellt. Nachdem das Herbizid (H) in die Zelle gelangt, wird es entweder in Phase I durch die Aktivität von Cytochrom-P450-Enzymen (P450) aktiviert oder kann, abhängig von den reaktiven Gruppen des Moleküls, direkt in Phase II metabolisiert werden. Dabei werden GSH (γECG) oder Glukose (Glc) an das Herbizid konjugiert. Diese Reaktionen werden von GSTs oder Glycosyltransferasen (GT) katalysiert. Die Produkte der Phase II werden über ABC-Transporter in die Vakuole gebracht. Eine weitere Metabolisierung ist im Fall von Glc-Konjugaten bisher nicht beschrieben. Das Wissen über Enzyme, die am Katabolismus von GSH-Konjugaten beteiligten sind, ist hingegen umfangreich. Über vakuoläre γ-Glutamyl-Transpeptidasen (GGT) wird der γ-Glutamyl-Rest des GSH abgespalten. Die Abspaltung des Glycyl-Restes kann von Carboxypeptidase (CP) katalysiert werden. Daneben ist ein möglicher cytosolischer Abbau bekannt, bei dem Phytochelatin-Synthasen (PCS) für die Abspaltung des Glycyl-Restes verantwortlich sind.

Die Konjugation an Glukose ist die häufigste beobachtete Xenobiotikareaktion in der Pflanze (Edwards *et al.*, 2011). GTs katalysieren diese Reaktion an OH-, COOH-, SH- oder NH<sub>2</sub>-Gruppen (Yuan *et al.*, 2007). Obwohl GTs eine Vielzahl von Xenobiotika konjugieren, ist ihre Rolle in der Herbiziddetoxifizierung bisher wenig erforscht. Beispiele für Herbizide, die über diesen Mechanismus entgiftet werden, sind chlorierte Phenole, Aniline und Thiophenole (Loutre *et al.*, 2003). Die Anzahl der kodierenden Gene ist genau wie bei P450s und GSTs in Pflanzen sehr hoch, in *A. thaliana* sind 120 GTs identifiziert (Paquette *et al.*, 2003). Zwei GTs, die endogen eine Rolle im spezialisierten Metabolismus haben, wurden aus Sojabohne isoliert und ihre Aktivität gegenüber dem Herbizid Bentazon *in vitro* bestätigt (Leah *et al.*, 1992). Das Beispiel der UGT72B1 aus *A. thaliana* zeigt jedoch, dass eine Aktivität *in vitro* nicht immer eine erhöhte pflanzliche Toleranz als Konsequenz hat. Brazier-Hicks und Kollegen haben zwar gezeigt, dass UGT72B1 *in vitro* eine deutliche Aktivität gegenüber Trichlorophenol und Dichloroanilin hat, aber die Deletion dieses Gens überraschenderweise zu einer erhöhten Toleranz gegenüber diesen Herbiziden führt (Brazier-Hicks *et al.*, 2007; Brazier-Hicks und Edwards, 2005). Obwohl viele Abbauprodukte von Herbiziden als Glycosyl-Konjugate identifiziert werden, ist die konkrete Beteiligung der GTs an ihrem Metabolismus *in planta* bis heute nicht aufgeklärt.

Die konjugierten Herbizide werden im Anschluss meist über ABC-Transporter (*ATP-binding cassette*), die alle eine ATP-bindende Kasette gemeinsam haben, in die Vakuole oder den Apoplasten befördert (Yuan *et al.*, 2007). Im Jahr 1993 wurde erstmals der ATP-abhängige Transport von GSH-Konjugaten in die Vakuole beschrieben (Martinoia *et al.*, 1993). Insgesamt sind im Genom von Arabidopsis 129 ABC-Transporter-Gene bekannt, von denen 15 der Klasse der *multi drug resistant*-assoziierten Proteine (MDR) zugeordnet werden (Sánchez-Fernández *et al.*, 2001; Schulz und Kolukisaoglu, 2006). Von diesen 15 Proteinen, die vermutlich eine wichtige Rolle bei der Detoxifizierung von Fremdstoffen in der Pflanze spielen, sind lediglich fünf im Hinblick auf ihr Substratspektrum charakterisiert (Klein *et al.*, 2006). Es gibt zudem Hinweise, dass es nach dem Transport in die Vakuole bei den GSH-Konjugaten zu einem Retransport und zu weiteren Modifikationen im Cytosol kommen kann. Experimente mit dem GSH-Konjugat von Fenclorim weisen auf einen solchen Abbaumechanismus hin (Brazier-Hicks *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2009). Wie bei der Überexpression von P450s und GSTs gibt es deutliche Evidenzen, dass es sich bei ABC-Transportern um einen entscheidenden Teil des Herbizidabbaus handelt und ihre Überexpression zur Multi-Herbizidresistenz führen kann (Windsor *et al.*, 2003).

Die weitere Metabolisierung der GSH-Konjugate kann auf zwei Wegen erfolgen. Zum einen gibt es in der Vakuole und im Apoplasten  $\gamma$ -Glutamyl-Transpeptidasen (GGTs), die den Abbau des GSH-Konjugates zu dem entsprechenden Cysteinylglycin-Konjugat katalysieren (Grzam *et al.*, 2007; Ohkama-Ohtsu, Radwan *et al.*, 2007; Ohkama-Ohtsu, Zhao *et al.*, 2007). In Arabidopsis wurde dies

als primärer Abbauweg von GSH-Konjugaten beschrieben (Grzam *et al.*, 2006). Die weitere Abspaltung des Glycins könnte durch eine Carboxypeptidase erfolgen. In *A. thaliana* gibt es bisher keine Evidenzen für ein solches vakuoläres Protein, in Gerste (*Hordeum vulgare*) wurde jedoch eine Carboxypeptidase identifiziert und ihre Aktivität gegenüber GSH-Konjugaten verschiedener Herbizide bestätigt (Wolf *et al.*, 1996). Zum anderen kann es sich bei dem primären Katabolismusprodukt um das  $\gamma$ -Glutamylcystein-Konjugat handeln. Enzyme, die diese Reaktion katalysieren können, sind die Phytochelatinsynthasen (PCSs). Sie sind ein Bestandteil der Schwermetallentgiftung in der Pflanze, indem sie  $\gamma$ -Glutamylcystein von GSH auf Phytochelatine übertragen und somit Schwermetallionen chelatieren (Grill *et al.*, 1989). Auch GSH-Konjugate können PCS als Substrat dienen und das Resultat dieser cytosolischen Reaktion ist das entsprechende  $\gamma$ -Glutamylcystein-Konjugat (Blum *et al.*, 2007). Die Kinetik der Metabolisierung von Fenclorim-GSH-Konjugaten lässt den Schluss zu, dass beide Abbauwege, der cytosolische über die PCS und der vakuoläre über die GGT, parallel in der Pflanzenzelle stattfinden und im Fall von Fenclorim der PCS-vermittelte Katabolismus bevorzugt wird (Brazier-Hicks *et al.*, 2008).

Die weitere Prozessierung zu Cysteinyl- und Malonyl-Konjugaten ist bisher kaum erforscht. Dass es sich hierbei um den konsequenten Schritt nach der Glutathionylierung handelt, kann aufgrund der verschiedenen identifizierten Herbizid-Malonyl-Konjugate geschlossen werden (Lamoureux und Rusness, 1980, 1987, 1989).

Diese vier Phasen des Xenobiotikaabbaus sind entscheidend für die Toleranz einer Pflanze gegenüber Herbiziden. Dabei können die Enzyme jeder Stufe ausschlaggebend für Toleranz oder Suszeptibilität sein. Nutzpflanzen, wenn sie nicht gentechnisch modifiziert sind, sind dabei im Gegensatz zu Unkräutern durch das Portfolio und die Effizienz ihrer detoxifizierenden Enzyme von Natur aus in der Lage Herbizide schnell und effizient abzubauen und somit durch das Herbizid verursachte Schäden zu vermeiden (Andrews *et al.*, 1997; Shimabukuro *et al.*, 1970).

Ist diese natürliche Resistenz in Nutzpflanzen nicht gegeben oder nur unzureichend ausgebildet, werden häufig Safener eingesetzt. Dabei handelt es sich um chemische Substanzen, die die Detoxifizierungsmechanismen in der Pflanze stimulieren. Hoffmann entdeckte 1953 erstmals die schützende Wirkung einer Substanz gegenüber dem Herbizid 2,4-D (Hoffmann, 1953). Seither sind eine Vielzahl verschiedener Safener entwickelt worden, die Spezies- und Herbizid-spezifisch eingesetzt werden (Kreuz *et al.*, 1991). Moderne Safener wie Isoxadifen-ethyl können auch in mehreren Nutzpflanzen gegen mehr als ein Herbizid funktionieren (Kraehmer, Laber *et al.*, 2014). Viele Safener werden dabei selbst als GSH-Konjugate detoxifiziert (Deng und Hatzios, 2002; Miller *et al.*, 1996). Es wurde allerdings bisher nicht gezeigt, dass es sich hierbei um eine für die Signalantwort erforderliche Reaktion handelt. Safener können in der Regel nur in Monokotyledonen als Schutz eingesetzt werden, da sie in Dikotyledonen zwar die

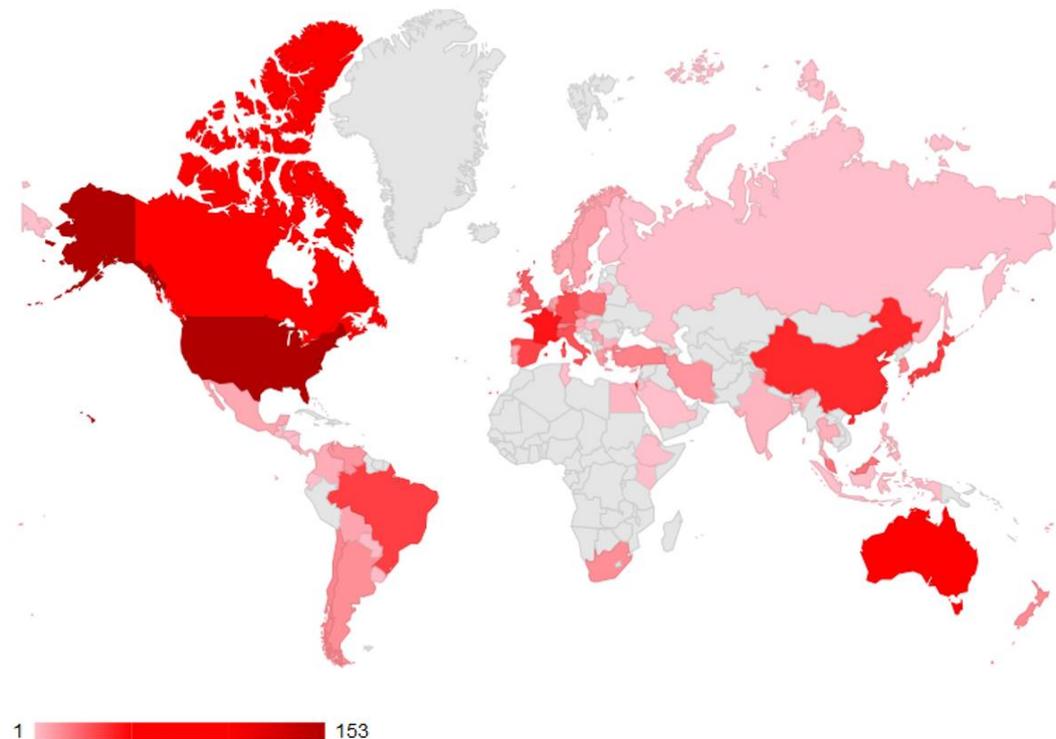
Detoxifizierungsenzyme induzieren, jedoch nicht zu einer erhöhten Resistenz gegenüber einem Herbizid führen (DeRidder *et al.*, 2002). Warum es diese Diskrepanz gibt, ist bis heute noch nicht vollständig verstanden. Es wird vermutet, dass in dikotylen Pflanzen die Substrat- oder Gewebespezifität der induzierten Proteine der Grund für die fehlende Herbizidtoleranz ist (DeRidder und Goldsbrough, 2006). Im Gegensatz dazu wird in Mais und Weizen durch Safener die Expression von GSTs, die spezifische Herbizidsubstrataktivitäten aufweisen, induziert (Cummins *et al.*, 1997; Holt *et al.*, 1995). Obwohl in *A. thaliana* keine Safener-vermittelte Resistenz nachgewiesen werden konnte, wurde diese Pflanze aufgrund des sequenzierten Genoms und der umfassenden, etablierten molekularbiologischen Techniken für die Analyse der Safener-Antwort verwendet. Die Behandlung mit verschiedenen Safenern zeigte die Induktion mehrerer GSTs und ABC-Transporter (DeRidder und Goldsbrough, 2006). Eine Mikroarray-Analyse ergab nach Safener-Behandlung unter anderem die Induktion von 8 P450s, 9 GTs, 13 GSTs und 8 ABC-Transportern, wobei die Induktion zum Teil Salicylsäure-abhängig war (Behringer *et al.*, 2011). Der Mechanismus und die involvierten Signalkaskaden, die zu der Safener-vermittelten Antwort führen, sind bis heute nicht ausreichend geklärt.

In jeder der vier Phasen sind mehrere Enzymfamilien gleichzeitig an der Detoxifizierung beteiligt. ATZ wird in Mais über die Konjugation mit GSH, Hydrolyse und Dealkylierung detoxifiziert (Shimabukuro *et al.*, 1970). Ein anderes Beispiel ist der Katabolismus von GSH-Konjugaten des Safeners Fenclorim, der sowohl vakuolär über GGTs als auch cytosolisch über die PCS abgebaut wird (Brazier-Hicks *et al.*, 2008). Diese Vielzahl von parallelen Stoffwechselwegen, die zudem noch dynamisch auf veränderte Umweltbedingungen (siehe Safener) reagieren können, macht Nutzpflanzen so erfolgreich bei der Detoxifizierung von Pestiziden.

### 1.1.3. Herbizidresistente Unkräuter

In den letzten zwei Jahrzehnten ist die Anzahl an Unkräutern, die resistent gegenüber einem oder mehreren Herbiziden sind, dramatisch gestiegen und wird zu einer immer größeren Bedrohung für die Landwirtschaft (Kraehmer, van Almsick *et al.*, 2014) (Abbildung 1.6). Ein monotoner, langjähriger Einsatz eines oder einiger weniger Pestizide kann aufgrund des hohen Selektionsdrucks zu einer erhöhten Resistenz in den zu beseitigenden Pflanzen führen (Yuan *et al.*, 2007). Die Einführung von resistenten „RoundupReady“-Pflanzen und der damit einhergehende ausschließliche Einsatz von Glyphosat als weltweit zentralem Herbizid (außer in Europa) unterstreichen das Problem noch einmal. Während resistente Unkräuter meist mehr als ein Jahrzehnt benötigt haben, um Resistenzen auszubilden, wurden bereits drei Jahre nach der

Einführung von „RoundupReady“-Pflanzen erste Resistenzen gegenüber Glyphosat registriert (VanGessel, 2001).



**Abbildung 1.6 Vorkommen und Anzahl von herbizidresistenten Unkrautarten.**

Die Weltkarte zeigt die Anzahl von bekannten, herbizidresistenten Unkrautarten (Quelle: Heap, 2016).

Herbizidresistenzen unterscheidet man grundsätzlich nach *target-site-* und *non-target-site-resistance* (TSR bzw. NTSR). Mutationen, die zur TSR führen, beeinträchtigen die Bindung des Herbizids an das Zielenzym und resultieren somit in einer verminderten Inhibition. Triazin-Herbizide gehören zu den am häufigsten eingesetzten Herbiziden weltweit. Erste Resistenzen in Unkräutern wurden daher bereits 1968 identifiziert und bis heute gehört ATZ zu den Herbiziden, gegenüber dem die meisten Herbizid-resistenten Unkrautartenarten gefunden wurden (Heap, 2016; Ryan, 1970). Eine einzelne Mutation im D1-Protein (Ser264Gly) entwickelte sich mehrmals unabhängig und führt dazu, dass ATZ und verwandte Triazin-Herbizide nicht mehr binden können (Bettini *et al.*, 1987). Die Bindung des ursprünglichen Substrates Plastoquinon ist in verringertem Maße noch möglich, jedoch ist die Effizienz der Photosynthese dadurch reduziert und führt ohne Herbizidbelastung zu einer verringerten *fitness* der Mutanten (El-Lithy *et al.*, 2005). Mittlerweile wurden mehrere verschiedene Aminosäureaustausche im D1-Protein identifiziert, die je nach Mutation Resistenzen gegenüber einem oder mehreren PSII-inhibierenden Herbiziden auslösen

(Powles und Yu, 2010). Ein besonderes Beispiel der TSR stellen die ALS-inhibierenden Herbizide dar. Mitglieder dieser Herbizidklasse binden nicht substitutiv in der Bindetasche der ALS und konkurrieren nicht direkt mit dem ALS-Substrat Pyruvat, sondern besetzen durch ihre Bindung den Eingang zum katalytischen Zentrum (Powles und Yu, 2010). Das hat zur Folge, dass Mutationen, die die Herbizidresistenz gegenüber ALS-Inhibitoren fördern, keine negativen Folgen auf die Aktivität des Enzyms haben. Dies ist ein Grund für die hohe Abundanz der identifizierten Punktmutationen, die in Zusammenhang mit dieser TSR gebracht werden (Heap, 2014). Drei Sulfonylharnstoff-resistente Unkrautarten zeigten aufgrund einer ALS-Mutation neben einer Resistenz gegenüber fünf Sulfonylharnstoffen zusätzlich Resistenzen gegen zwei weitere ALS-Inhibitoren anderer chemischer Klassen (Saari *et al.*, 1992).

TSR treten häufig auf, wenn Herbizide mit dem gleichen Wirkmechanismus über einen längeren Zeitraum intensiv eingesetzt werden; der kontinuierliche Wechsel zwischen Herbiziden verschiedener Wirkmechanismen kann diese Entwicklung verlangsamen. Im Gegensatz dazu ist eine NTSR eher auf zu geringe, nicht vollständig inhibierende Mengen Herbizid zurückzuführen, die eine allmählichen Adaption an diese Umweltbedingungen ermöglichen (Neve und Powles, 2005). NTSR basiert darauf, dass weniger aktives Herbizid das Zielenzym erreicht und Pflanzen mit NTSR zeigen Modifikationen bei der Aufnahme, Translokation und dem Metabolismus von Herbiziden. Der variable, multi-enzymatische Metabolismus von Herbiziden in der Pflanze verdeutlicht dabei das große Potential, auf welchem sich Änderungen, die zu Resistenzen führen, entwickeln können. Die hohe Varianz in der Substratspezifität, die in vielen dieser Enzymfamilien, besonders den P450s und GSTs, nachgewiesen wurde, weist auf die Gefahr der Multi-Herbizid-Resistenzen (MHR) hin, die mehrere Herbizidklassen mit unterschiedlichen Wirkmechanismen betreffen kann. Kreuzresistenzen aufgrund von NTSR wurden in jedem bedeutenden resistenten Unkraut identifiziert und es gibt für Enzyme jeder Detoxifizierungsphase Beispiele. Chlorotoluron-resistentes Acker-Fuchsschwanzgras (*Alopecurus myosuroides*) weist eine Kreuzresistenz gegenüber ACC-Inhibitoren auf, was auf eine erhöhte P450-Aktivität zurückzuführen ist (Menendez und Prado, 1996). In ATZ-resistenten Populationen der Samtpappel (*Abutilon theophrasti*), die zuerst Mitte der 80er Jahre auftauchten, wurde eine erhöhte GST-Aktivität als Grund für die Resistenz gegenüber ATZ identifiziert (Anderson und Gronwald, 1991; Plaisance und Gronwald, 1999). Im Steif-Loch (*Lolium rigidum*), welches gegenüber einer ganzen Reihe von Herbiziden resistent ist, sind mindestens vier unterschiedliche Resistenzmechanismen an der MHR beteiligt (Preston *et al.*, 1996). Vor einigen Jahren wurde in *A. myosuroides* eine GST identifiziert, die in Populationen mit MHR hochreguliert ist und neben einer Transferase- auch GSH-Peroxidase-Aktivität aufweist (Cummins *et al.*, 1999). In nachfolgenden Studien wurde gezeigt, dass dieses Enzym tatsächlich für die MHR verantwortlich ist. Jedoch nicht, indem es direkt an der

Detoxifizierung beteiligt ist, sondern indem es den Flavonoid- und Anthocyaninmetabolismus und somit indirekt durch eine erhöhte Resistenz gegenüber reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) die MHR beeinflusst (Cummins *et al.*, 2013). NTSRs wirken durch ihre Varianz einer Vielzahl von Herbiziden entgegen, sind primär an der MHR beteiligt und es kann nicht ausgeschlossen werden, dass gänzlich neue oder noch gar nicht entwickelte Herbizide von diesen Resistenzen betroffen sein können (Yuan *et al.*, 2007).

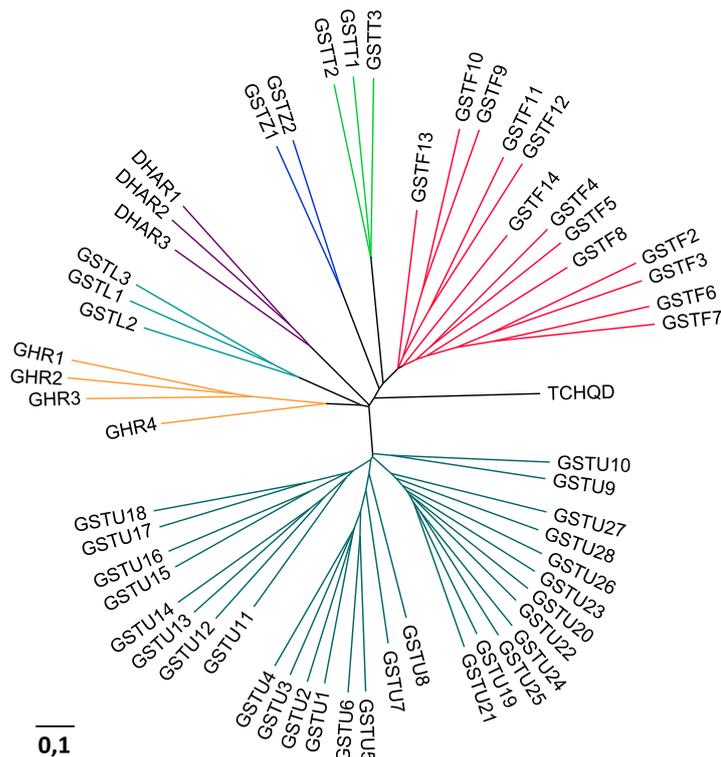
Die Tatsache, dass die Anzahl der herbizidresistenten Unkräuter in den letzten Jahren rapide zugenommen hat und keine effizienten Herbizide mit neuen Wirkmechanismen auf den Markt gebracht wurden, macht resistente Unkräuter zu einer wachsenden Bedrohung (Kraehmer, van Almsick *et al.*, 2014).

### 1.2. Pflanzliche Glutathiontransferasen

GSTs wurden zum ersten Mal in der Leber der Ratte beschrieben und bisher in allen Domänen nachgewiesen (Booth *et al.*, 1961; Mashiyama *et al.*, 2014). In Pflanzen wurde kurze Zeit später ein Zusammenhang zwischen der ATZ-Resistenz und dem GSH-Konjugat dieses Herbizides festgestellt (Lamoureux *et al.*, 1970). GSTs übertragen GSH auf kleine elektrophile Substanzen, können als GSH-abhängige Isomerasen und nicht-katalytisch als Flavonoid-bindende Transportproteine funktionieren (Edwards *et al.*, 2000). Einige GSTs haben auch GSH-abhängige Peroxidase-Funktionen und schützen die Membran durch die Reduktion von toxischen Lipidperoxiden vor den Folgen von ROS. Zudem spielen sie durch ihre variable Substratspezifität eine wichtige Rolle in der Detoxifizierung von Xenobiotika (Marrs, 1996).

#### 1.2.1. Klassifizierung und Struktur

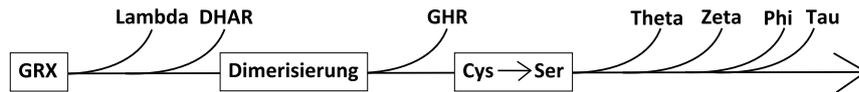
GSTs besitzen eine Thioredoxin-ähnliche Struktur, wodurch die Bindung von GSH ermöglicht wird. Somit sind sie ein Teil der Thioredoxin-Superfamilie, zu der unter anderem Glutaredoxine, Thioredoxine und Proteindisulfid-Isomerasen gehören (Copley *et al.*, 2004; Frova, 2006). Im Gegensatz zu tierischen Systemen ist die Anzahl der Isoenzyme in Pflanzen deutlich höher. Im Genom von Pappel (*Populus trichocarpa*) sind 81 GSTs, in Reis (*Oryza sativa*) 79 GSTs und in Sojabohne 101 putative GSTs kodiert (Jain *et al.*, 2010; Lan *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2015). Die 57 Enzyme dieser Genfamilie in *A. thaliana* gehören zu den am umfangreichsten untersuchten pflanzlichen GSTs (Dixon und Edwards, 2009; Wagner *et al.*, 2002) (Abbildung 1.7).



**Abbildung 1.7 Stammbaum der GST-Familie in *A. thaliana*.**

Die 57 GSTs aus *A. thaliana* lassen sich in acht Klassen einteilen, von denen die Tau (U)- und Phi (F)-Klasse mit 28 bzw. 13 Mitgliedern die Größten sind. Zu den kleineren Klassen zählen Lambda (L), Theta (T), Zeta (Z), Dehydroascorbatreduktasen (DHAR), Tetrachlorohydroquinon-Dehalogenase (TCHQD) und Glutathionhydroquinonreduktasen (GHR).

Die in photosynthetischen Eukaryoten vorkommenden GSTs können in bis zu 14 unterschiedliche Klassen unterteilt werden. Dabei weist eine Proteinsequenzübereinstimmung von 40-50 % auf GSTs der gleichen Klasse hin, während Proteine mit weniger als 20 % Identität in unterschiedliche Klassen eingeteilt werden (Frova, 2006; Lallement, Brouwer *et al.*, 2014). In Angiospermen wurden bisher die Klassen Theta (T), Zeta (Z), Phi (F), Tau (U), Lambda (L), Dehydroascorbatreduktasen (DHAR), Tetrachlorohydroquinon-Dehalogenase (TCHQD) und Glutathionhydroquinonreduktasen (GHR) identifiziert, wobei die Klassen Phi, Tau, Lambda und DHAR pflanzenspezifisch sind (Abbildung 1.7). Die Mitglieder der GHR-Klasse, die Ähnlichkeiten mit den Omega-GSTs der Tiere haben, wurden erst kürzlich als GSTs beschrieben (Lallement, Brouwer *et al.*, 2014). Daneben gibt es noch MAPEGs (*membrane associated proteins in eicosanoid and glutathione metabolism*), die jedoch evolutionär unabhängig von den GSTs entstanden sind (Dixon und Edwards, 2010a). Das Vorkommen der einzelnen Klassen lässt Aussagen über die Evolution dieser Proteine zu (Abbildung 1.8). So besitzt das Moos *Physcomitrella patens* keine Tau-GSTs, was auf die jüngere Entwicklung dieser Klasse innerhalb der GST-Familie in den vaskulären Pflanzen schließen lässt (Liu *et al.*, 2013).



**Abbildung 1.8 Model der GST-Evolution in Pflanzen.**

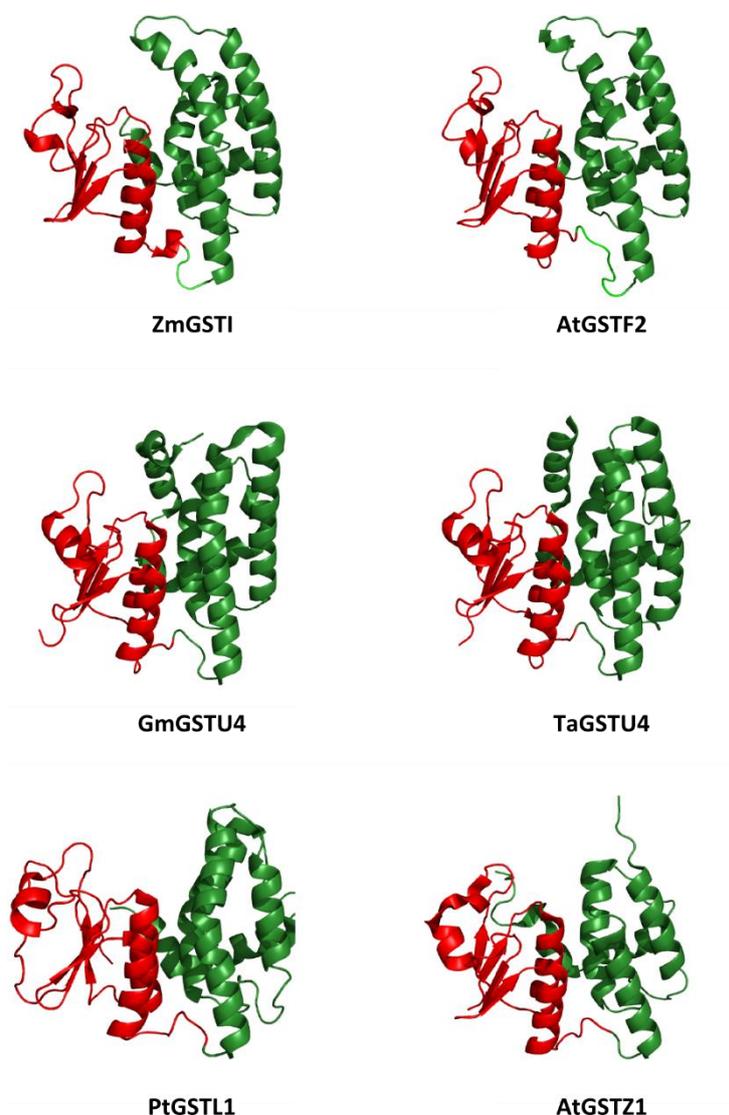
GSTs haben zusammen mit Glutaredoxinen (GRX) einen gemeinsamen Ursprung. Von dort sind die monomeren, Cystein-enthaltenden Klassen Lambda und DHAR entstanden. Entscheidende Schritte in der Evolution der GSTs waren die Dimerisierung, die eine Eigenschaft aller übrigen Klassen ist, und die Änderung der Aminosäure im aktiven Zentrum von Cystein zu Serin (Abbildung verändert nach Frova, 2006).

Mitglieder der Klassen GSTL und DHAR agieren als einzige GSTs als Monomere, alle anderen GSTs bilden Dimere (Frova, 2006). Diese können innerhalb ihrer Klasse Homo- oder Heterodimere bilden, wobei jede Untereinheit zwar unabhängig funktioniert, die Dimerisierung jedoch einen hohen Einfluss auf die Stabilität des Proteins hat, die Enzymeffizienz erhöht und die Substratspezifität beeinflussen kann (Sommer und Böger, 1999; Wang und Yang, 2011). Das aktive Zentrum der Proteine liegt dabei zwischen den beiden Monomeren. Jedes GST-Monomer besitzt ein katalytisch unabhängiges aktives Zentrum, welches von zwei Domänen des Proteins gebildet wird: einer N-terminalen *G-site* und einer C-terminalen *H-site*. Die konservierten Aminosäuren der *G-site* sind vor allem an der Bindung des GSH beteiligt, während die Aminosäuren der hydrophoben *H-site* ein zweites, elektrophiles Substrat binden.

Der katalytische Mechanismus ist ein mehrstufiger Prozess und wurde bei tierischen GSTs besonders gut untersucht. GSTs senken den  $pK_a$  des Cysteinthiols von GSH von 9 auf 6,2 und begünstigen somit die Bildung eines Thiolatanions (Caccuri *et al.*, 1998; Graminski *et al.*, 1989). Dieses wird durch Wasserstoffbrückenbindung mit einem konservierten Tyrosin in der *G-site* stabilisiert und für den nukleophilen Angriff auf ein zweites Substrat, welches in der hydrophoben *H-site* gebunden ist, positioniert (Reinemer *et al.*, 1991; Sinning *et al.*, 1993). Die Bindung des zweiten Substrates führt zu einer Konformationsänderung der GST, die die Orientierung der Substrate und die Katalyse beeinflusst (Axarli *et al.*, 2009a; Nilsson *et al.*, 2002).

GSTs zeigen eine hohe Spezifität für GSH, die *G-site* ist innerhalb der Genfamilie stark konserviert. Allerdings haben sie eine breite Substratspezifität für das zweite, elektrophile Substrat, was sich in sehr variablen Sequenzen der *H-site* verschiedener GSTs widerspiegelt (Labrou *et al.*, 2015; Winayanuwattikun und Ketterman, 2005). Während die Substratvariabilität mit der Varianz in der Sequenz der *H-site* der verschiedenen GSTs begründet werden kann, ist die Promiskuität einzelner GSTs auf die strukturelle Flexibilität und Konformationsänderungen des aktiven Zentrums zurückzuführen (Labrou *et al.*, 2015; Nilsson *et al.*, 2002). Obwohl die Primärstruktur der Proteine sehr stark variieren kann, ist die Tertiärstruktur - auch zwischen den Klassen - sehr ähnlich (Abbildung 1.9). Strukturelle Differenzen beziehen sich eher auf die Länge einzelner Schleifen und

Helices sowie das Vorhandensein N- oder C-terminaler Verlängerungen (Dixon und Edwards, 2010a).



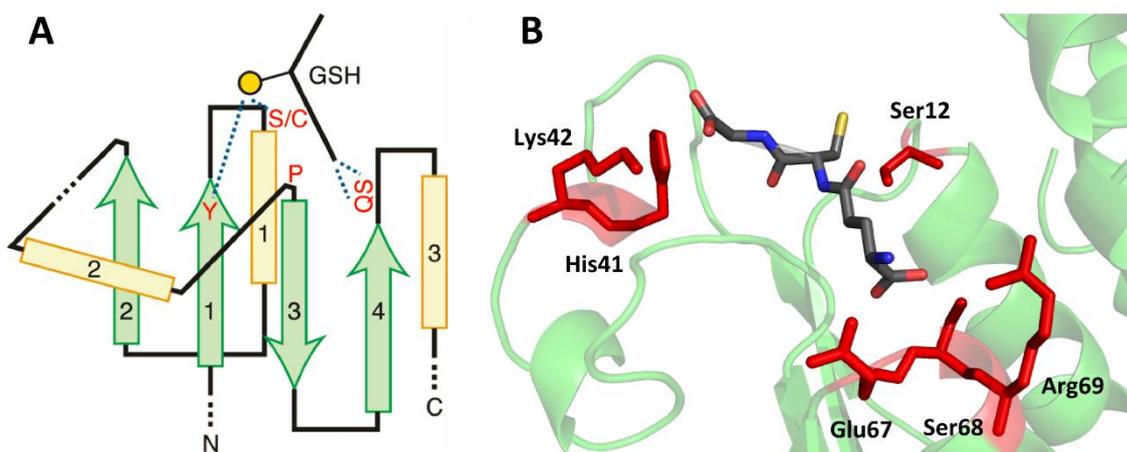
**Abbildung 1.9 Vergleich der dreidimensionalen Struktur von pflanzlichen GSTs verschiedener Klassen.**

Die dreidimensionale Tertiärstruktur der GSTs ist über alle Klassen hinweg stark konserviert. Der N-Terminus (rot) besteht aus einer stark konservierten Abfolge von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern, während der C-Terminus der Proteine (grün) vollständig von  $\alpha$ -Helices gebildet wird. In Tau-GSTs liegt die letzte Helix im Gegensatz zu den Mitgliedern anderer GST-Klassen über dem aktiven Zentrum und blockiert dieses zum Teil. Dargestellt sind die Strukturen der GSTFs ZmGSTI aus Mais (1AXD) und AtGSTF2 aus Arabidopsis (1BX9), der GSTUs GmGSTU4 aus *G. max* (2VO4) und TaGSTU4 aus Weizen (1GWC), der Lambda-GST PtGSTL1 aus *P. trichocarpa* (4PQH) und der AtGSTZ1 der Zeta-Klasse aus Arabidopsis (1E6B).

Der N-terminale Teil des Proteins besteht aus der konservierten Abfolge der Sekundärstruktur  $\beta_1\alpha_1\beta_2\alpha_2\beta_3\beta_4\alpha_3$ , die die Thioredoxin-Faltung darstellt (Atkinson und Babbitt, 2009) (Abbildung 1.10 A). Die N-terminale Struktur  $\beta_1\alpha_1\beta_2$  ist dabei durch eine lange Schleife, welche die Helix  $\alpha_2$  enthält, mit  $\beta_3\beta_4\alpha_3$  verbunden. In dieser Schleife liegt ein hoch-konserviertes Prolin, welches zwar nicht

direkt in die Katalyse involviert ist, aber für die Konformation des Proteins wichtig zu sein scheint (Allocati *et al.*, 1999). Einige GSTs haben zusätzlich eine N-terminale Erweiterung, wie die GSTF4, GSTF5 und GSTU12 in *A. thaliana* (Dixon und Edwards, 2010a). Im Gegensatz zu tierischen GSTs, bei denen sich ein Tyrosin im aktiven Zentrum zur Stabilisierung des Thiolatanions befindet, unterscheidet man in Pflanzen GSTs, die an dieser Stelle ein Serin oder ein Cystein tragen. Zu den Cystein-enthaltenden GSTs gehören die der Lambda-, DHAR-, und GHR-Klassen (Lallement, Brouwer *et al.*, 2014). Alle übrigen GSTs haben ein Serin im aktiven Zentrum des Enzyms. Ausnahmen hiervon bilden in Arabidopsis GSTF11, GSTF12, GSTF14 und GSTU14. Tyrosin und Serin agieren als Wasserstoffbrückenbindungs-Donor für die Thiolgruppe des GSH und fördern auf diese Weise die Bildung und Stabilisierung des reaktiven Thiolatanions. GSTs, die ein Cystein anstatt des Serins im aktiven Zentrum haben, bilden mit GSH über diese Aminosäure ein gemischtes Disulfid und sind eher an Redoxreaktionen beteiligt (Frova, 2006; Lallement, Brouwer *et al.*, 2014). Diese Aminosäuren sind entscheidend für die katalytische Aktivität der Enzyme, sodass Mutationen an dieser Position zu einem Verlust der Enzymaktivität führen (Ayarli *et al.*, 2009b; Zeng und Wang, 2005).

Neben dem Serin bzw. Cystein, welche mit dem Schwefelatom des GSH interagieren, gibt es noch weitere Aminosäuren, die eine Funktion in der GSH-Bindung übernehmen. Die Hydroxylgruppe des Glycyl-Restes wird durch His41 und Lys42 stabilisiert, während Glu67, Ser68 und Arg69 den Glutamylrest des GSH binden (Nummerierung anhand der Proteinsequenz von GSTF2) (Prade *et al.*, 1998; Reinemer *et al.*, 1996) (Abbildung 1.10 B). Dabei ist nur das Ser68 in allen Klassen mit Ausnahme von TCHQD strikt konserviert (Tabelle 1.2). Neben den Aminosäuren des aktiven Zentrums, welche sich um das katalytisch aktive Serin bzw. Cystein befinden, lassen sich GSTs auch anhand der konservierten Aminosäuren, die für die Bindung des Glutamylrestes von GSH verantwortlich sind, klassifizieren.



**Abbildung 1.10 Darstellung der GSH-Bindung in GSTs.**

Die schematische Darstellung der Thioredoxin-Faltung des N-Terminus von GSTs zeigt Helices als Kasten (gelb) und Faltblätter als Pfeile (grün) (A). Eingezeichnet ist zudem GSH mit der Thiolgruppe als gelben Punkt. Die Interaktionen von Aminosäuren mit GSH sind als blaue Linien dargestellt. In tierischen GSTs handelt es sich meist um Tyrosin (Y), welches mit der Thiolgruppe des GSH interagiert, während in Pflanzen Serin (S) oder Cystein (C) vorkommen. Die Glutamylgruppe wird durch die Interaktion mit zwei Aminosäuren am Ende des Faltblattes  $\beta_4$  stabilisiert. In Tieren handelt es sich hierbei um Glutamin (Q) und Serin (S), während in pflanzlichen GSTs Glutaminsäure oder Asparaginsäure gefolgt von einem Serin vorkommen. Das hochkonservierte Prolin (P), welches in allen GSTs vorkommt, liegt in der Schleife vor  $\beta_3$ . Die dreidimensionale Struktur dieser Bindung ist zusätzlich als Stäbchenmodell dargestellt (B). Dabei sind die Aminosäuren der GSTF2 aus Arabidopsis, die entscheidend für die Bindung von GSH sind, rot markiert. Während das Ser12 für die Interaktion mit der Thiolgruppe des GSH wichtig ist, interagieren Glu67, Ser68 und Arg69 mit der Glutamylgruppe und His41 und Lys42 mit der Glycylgruppe. (Teil A der Abbildung entnommen aus Atkinson und Babbitt, 2009)

N- und C-Terminus des Proteins sind durch eine kurze Sequenz (ca. 10 Aminosäuren) miteinander verbunden (Neuefeind *et al.*, 1997; Thom *et al.*, 2002). Der C-terminale Teil des Proteins, der für die Bindung des zumeist hydrophoben Substrates zuständig ist, besteht ausschließlich aus einer variablen Anzahl Helices. Die Sequenzvarianz der *H-site* ist deutlich größer als die der *G-site* und aufgrund der verschiedenen Substratspezifitäten lassen sich nicht einzelne, an der Bindung beteiligte, Aminosäuren benennen. Mutationen in der *H-site* von ZmGSTI aus Mais führen zu einer substratabhängig veränderten Spezifität, sowohl gegenüber dem elektrophilen Substrat als auch gegenüber GSH, und somit zu einer veränderten Aktivität in der ZmGSTI (Labrou *et al.*, 2005). Bei GSTs der Tau-Klasse faltet sich die letzte Helix des C-Terminus über den N-terminalen Teil des Proteins zurück, wodurch zum Teil das aktive Zentrum blockiert wird (Axarli *et al.*, 2009a; Thom *et al.*, 2002) (Abbildung 1.9). Die Beteiligung dieser Region an der Bindung des elektrophilen Substrates ist sehr wahrscheinlich und ähnelt in der Struktur den humanen GSTs der Alpha- und Omega-Klasse (Board *et al.*, 2000; Nilsson *et al.*, 2000).

**Tabelle 1.2 Charakteristika der pflanzlichen GST-Klassen in *A. thaliana*.**

Die für eine Klasse typische Sequenz der Aminosäuren um das katalytische Zentrum herum als auch die Aminosäuren, die den Glutamyl-Rest des GSH binden, sind dargestellt. Das Serin bzw. Cystein, welches im katalytischen Zentrum für die Bindung des Cysteinyl-Restes verantwortlich ist, ist rot markiert.

| Klasse                              | Abkürzung | Anzahl in   |                 | Aminosäuren aktives Zentrum            | Aminosäuren GSH-Bindung |
|-------------------------------------|-----------|-------------|-----------------|--|-------------------------|
|                                     |           | Arabidopsis | Quartärstruktur |  |                         |
| Phi                                 | F         | 13          | Dimer           | PASTA<br>F S N<br>S M A S<br>C S A C C | ESR<br>E S R            |
| Tau                                 | U         | 28          | Dimer           | WASP<br>P M Y                          | ESL<br>E S L            |
| Theta                               | T         | 3           | Dimer           | RMSQP                                  | ESH<br>E S H            |
| Zeta                                | Z         | 2           | Dimer           | WRSSC                                  | DSF<br>D S F            |
| Lambda                              | L         | 3           | Monomer         | YTCPF                                  | ESL<br>E S L            |
| Dehydroascorbat-reduktase           | DHAR      | 3           | Monomer         | GDCPF                                  | DSD<br>D S D            |
| Tetrachlorohydroquinon-Dehalogenase | TCHQD     | 1           | Dimer           | PYSID                                  | DTI<br>D T I            |
| Glutathionhydroquinin-redukates     | GHR       | 4           | Dimer           | YACPW<br>L P                           | ESS<br>E S S            |

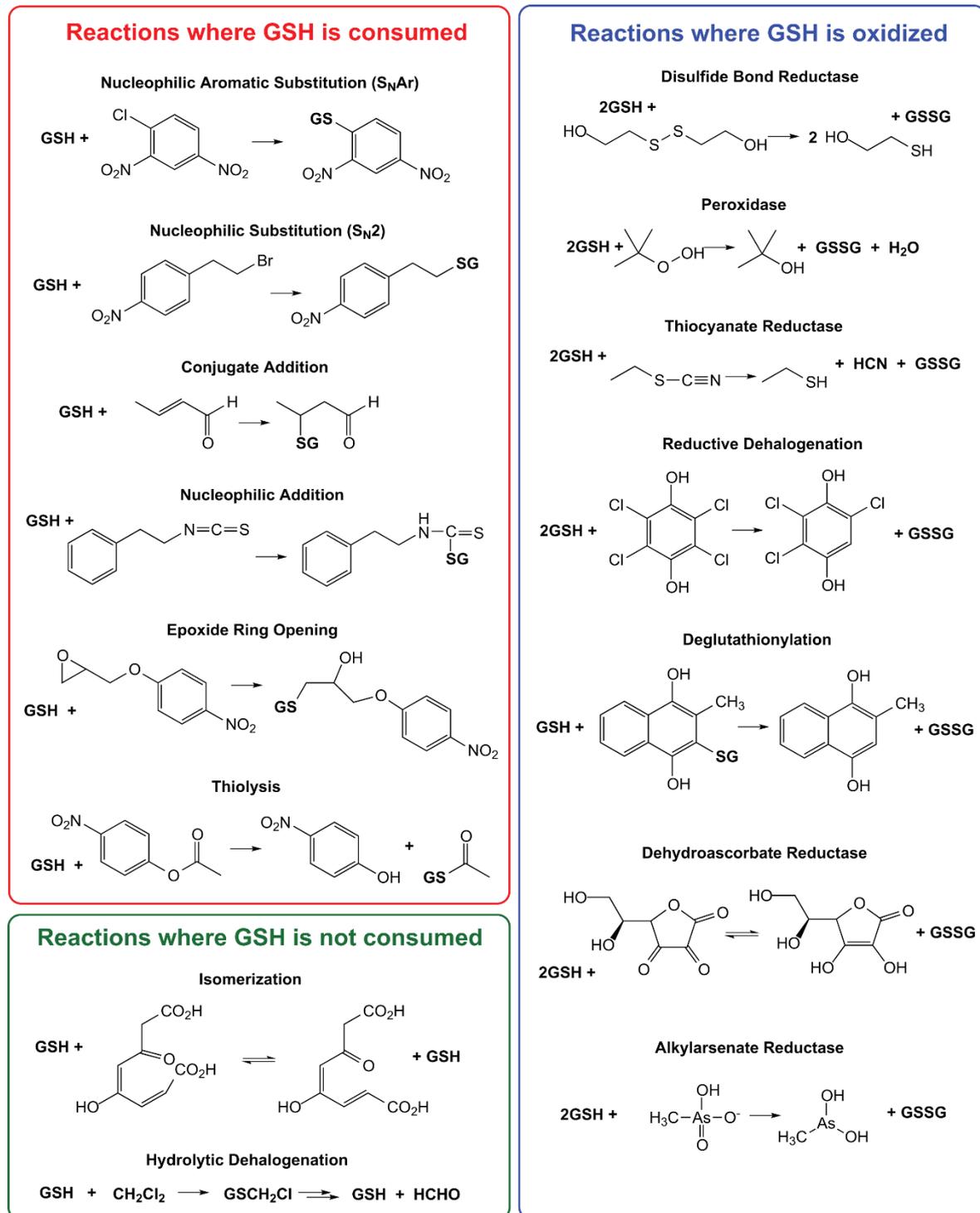
Zusätzlich wurden nicht-enzymatische Liganden-Bindestellen (*L-site*) in verschiedenen GSTs identifiziert. Man unterscheidet dabei grundlegend zwei Formen: zum einen kommen Bindungen vor, die mit der *H-site* teilweise überlappen. Zum anderen gibt es Bindungen, die an der Dimer-Grenze lokalisiert sind (Axarli *et al.*, 2004). Verschiedene Liganden können dabei unterschiedliche *L-sites* in derselben GST nutzen (Smith *et al.*, 2003). Kürzlich wurde eine *L-site* an der Oberfläche der GmGSTU4 aus Sojabohne identifiziert, die wahrscheinlich eine Rolle bei Protein-Protein-Interaktionen spielen könnte (Axarli *et al.*, 2009b).

### 1.2.2. Katalysierte Reaktionen

GSTs können GSH-abhängige Transferase-, Peroxidase- und Reduktasereaktionen katalysieren und so eine Vielzahl verschiedener Funktionen in der Zelle ausführen (Dixon *et al.*, 2002). Mashiyama und Kollegen gruppieren die möglichen 15 GST-Reaktionsarten abhängig davon, ob GSH verbraucht, nicht verbraucht oder oxidiert wird (Mashiyama *et al.*, 2014) (Abbildung 1.11). Die grundlegende Funktion von GSTs ist die Katalyse der Konjugation des Tripeptids GSH an ein elektrophiles Substrat, was vor allem von den GSTs der Klassen Phi und Tau durchgeführt wird. Neben der Konjugation an

GSH können GSTs auch GSH-abhängige Peroxidase-Aktivität aufweisen. Dies ist vor allem in den GSTTs prominent, beschränkt sich jedoch nicht nur auf diese. So haben auch GSTs der Phi- und Tau-Klasse eine moderate Peroxidase-Aktivität (Dixon *et al.*, 2009). GSTTs reduzieren organische Hydroperoxide zu den entsprechenden Alkoholen, zu denen auch die Hydroperoxide der Linol- und Linolensäuren gehören (Dixon *et al.*, 2009). GSTZs zeigen eine geringe Aktivität als Transferase oder Peroxidase, haben aber eine sehr hohe Isomerase-Aktivität und katalysieren die Isomerisierung von Maleylacetoacetat zu Fumarylacetoacetat, einem Schritt des Tyrosin-Katabolismus (Dixon *et al.*, 2000).

DHAR und Lambda sind insofern außergewöhnliche GSTs, da sie zum einen ein Cystein im aktiven Zentrum enthalten und somit keine GSH-Transferase-Aktivität aufweisen. Zum anderen sind sie als Monomere aktiv (Dixon *et al.*, 2002). Ihnen wurde eine Thioltransferase-Aktivität nachgewiesen und sie katalysieren die Deglutathionylierung von Substraten (Dixon *et al.*, 2002). Auch GHRs enthalten ein Cystein im aktiven Zentrum. Lam und Kollegen haben gezeigt, dass GHRs aus Hefe und Bakterien glutathionylierte Hydroquinone deglutathionylieren (Lam *et al.*, 2012). Ihre Funktion in Pflanzen ist bisher noch nicht geklärt ist. DHARs katalysieren die Reduktion von Dehydroascorbat zu Ascorbat durch die Oxidation von GSH zum Disulfid (GSSG) (Dixon *et al.*, 2002). Das katalytisch aktive Cystein bildet dabei ein gemischtes Disulfid mit GSH als Teil des katalytischen Mechanismus. DHARs spielen damit eine essentielle Rolle bei der Redox-Balance der Zelle. GSTLs reduzieren GSH-abhängig die GSH-Konjugate von Quercetin und Mercaptoethanol (Dixon und Edwards, 2010b). Kürzlich wurde die zentrale Rolle des Cysteins im aktiven Zentrum bei Deglutathionylierungsreaktionen verdeutlicht. PtGSTLs aus *P. trichocarpa*, bei denen das Cysteine zum Serin mutiert wurde, verloren ihre Thioltransferase-Aktivität, waren dafür aber in der Lage, zuvor nicht mögliche GSH-Transferase-Reaktionen zu katalysieren (Lallement, Meux *et al.*, 2014).



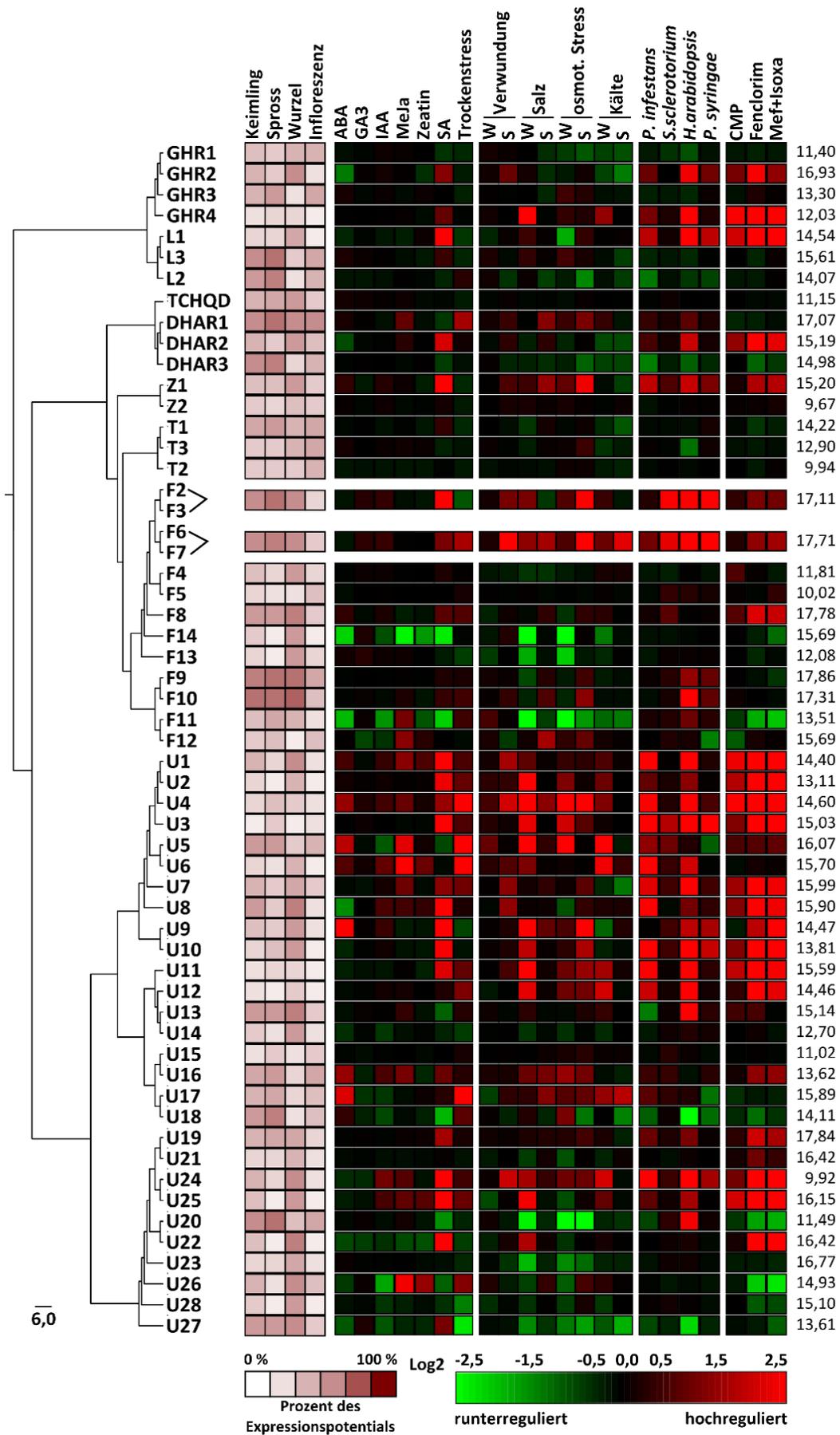
**Abbildung 1.11 Von GSTs katalysierte Reaktionen.**

GSTs können eine Vielzahl von Reaktionen katalysieren, die sich danach einteilen lassen, ob dabei GSH verbraucht, nicht verbraucht oder oxidiert wird. Der nukleophile Angriff ist die klassische GST-Reaktion, bei der GSH auf ein zweites Substrat übertragen wird. Isomerisierungsreaktionen werden von GSTs mit Maleylacetoacetat als Substrat katalysiert. Eine weitere wichtige Eigenschaft von GSTs ist ihre Peroxidase-Aktivität. GSTs mit einem Cystein im aktiven Zentrum katalysieren im Gegensatz zu Serin-enthaltenden GSTs Deglutathionylierungen und Reduktase-Reaktionen (Abbildung entnommen aus Mashiyama *et al.*, 2014).

### 1.2.3. Expression und Funktion

GSTs sind an dem Metabolismus von Xenobiotika und endogenen Substanzen beteiligt. Die Xenobiotika-Funktion ist dabei sehr gut erforscht, während die Identifizierung von endogenen GST-Substraten bisher immer noch sehr lückenhaft ist. Aufgrund des bereits lange sequenzierten Genoms sind viele Untersuchungen an den 57 GSTs von Arabidopsis durchgeführt worden und die umfassendsten Informationen zu Expression und Aktivität gibt es über die GST-Familie dieser Pflanzenspezies (Abbildung 1.12). Dabei hat sich gezeigt, dass GSTs bei unterschiedlichem biotischen und abiotischen Stress akkumulieren und die Genexpression durch Phytohormone, Schwermetalle, Salz, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Ozon, Kälte, bakterielle oder pilzliche Elicitoren, Herbizide und Safener beeinflusst werden kann (Sappl *et al.*, 2009; Smith *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 2002).

Die Überexpression von GSTs führt zu einer erhöhten Toleranz gegenüber verschiedenen abiotischen Stressfaktoren und hat Einfluss auf die Entwicklung der Pflanzen. So zeigen sowohl die Überexpression der GST Nt107 in Tabak als auch die der OsGSTU4 in Arabidopsis eine erhöhte Stresstoleranz gegenüber Salz und oxidativem Stress (Roxas *et al.*, 2000; Sharma *et al.*, 2014). Die Vermutung, dass die erhöhte Expression dieser GSTs zu weniger Schäden aufgrund von oxidativem Stress führen, wurde durch die verminderte Akkumulation von ROS im Fall der OsGSTU4 nachgewiesen. Zudem sind Pflanzen, die die OsGSTU4 überexprimieren, insensitiv gegenüber Abscisinsäure (ABA) und Auxin (Sharma *et al.*, 2014). Auch die GSTU17 in Arabidopsis wird in Zusammenhang mit dem Phytohormon ABA gebracht. Die Expression dieses Gens wird durch ABA und Trockenstress induziert und die Deletion führt zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Trockenstress (Chen *et al.*, 2012). Gleichzeitig ist der GSH-Gehalt in den Deletionsmutanten erhöht und es ist nicht klar, ob die beobachtete, modifizierte ABA-Antwort direkt durch die GST oder indirekt durch solch sekundäre Effekte moduliert wird. Neben der Stressantwort haben GSTs einen Einfluss auf den Blühzeitpunkt und Ethylengehalt (Gong *et al.*, 2005). Ein molekularer Zusammenhang zwischen der Aktivität von GSTs und der Antwort *in planta* wurde bisher nicht aufgeklärt.



**Abbildung 1.12 Stammbaum und Expression der GSTs in Arabidopsis.**

Die Expression der Arabidopsis GSTs in der Pflanze und ihre Änderungen durch verschiedenen Stimuli können in der Datenbank GENEVESTIGATOR® ermittelt werden. Die GST-Expression in Keimling, Spross, Wurzel und Infloreszenz ist logarithmisch als Anteil der maximal möglichen Expression dieses Gens dargestellt. Der in der Datenbank vorliegende, maximale Expressionswert ist am Ende der Zeile für jedes Gen angegeben. Die Änderungen in der Expression aufgrund verschiedener Stimuli wurden in Col-0 bestimmt und sind als logarithmische Änderungen im Vergleich zu der unbehandelten bzw. mit Lösungsmittel behandelten Probe dargestellt. Phytohormon-bedingte Expressionsänderungen beziehen sich auf 3 h Inkubation mit Abscisinsäure (ABA, 10 µM), Gibberelinsäure (GA3, 1 µM), Auxin (IAA, 1 µM), Methyljasmonat (MeJA, 10 µM), Zeatin (1 µM) und Salicylsäure (SA, 10 µM) im Vergleich zur Inkubation mit Lösungsmittel (Genevestigator ID AT-00110). Der Trockenstress wurde in Pflanzen, die für 7 d nicht bewässert wurden, im Vergleich zu bewässerten Pflanzen gemessen (Genevestigator ID AT-00292). Der Einfluss von abiotischem Stress auf die Expression der GSTs in Wurzel (W) und Spross (S) wurde durch 24 h Behandlung im Vergleich zu einer unbehandelten Probe ermittelt (Genevestigator ID AT-00120). Als Salzstress wurden die Pflanzen mit 150 mM NaCl behandelt, der osmotische Stress wurde mit 300 mM Mannitol ausgelöst und für eine Induktion durch Kälte wurden die Pflanzen für 24 h bei 4 °C inkubiert. Als Beispiele für biotischen Stress ist die Expression von GSTs im Zusammenhang mit einer Infektion durch *Phytophthora infestans* (6 h, Genevestigator ID AT-00108), *Sclerotinia sclerotiorum* (2 d, Genevestigator ID AT-00681), *Hyaloperonospora arabidopsidis* (4 d, Genevestigator ID AT-00545) oder *Pseudomonas syringae* (tomato DC3000 avrRpm1, 6 h, Genevestigator ID AT-00106) dargestellt. Die GST-Induktion durch Safener wurde anhand der Substanzen 4-Chloro-6-Methyl-2-Phenylpyrimidin (CMP, 100 µM, 4 h), Fenclorim (100 µM, 4 h) und Mefenpyr und Isoxadifen (Mef-Isoxa, 6 h) ermittelt (Genevestigator ID AT-00459 und AT-00581).

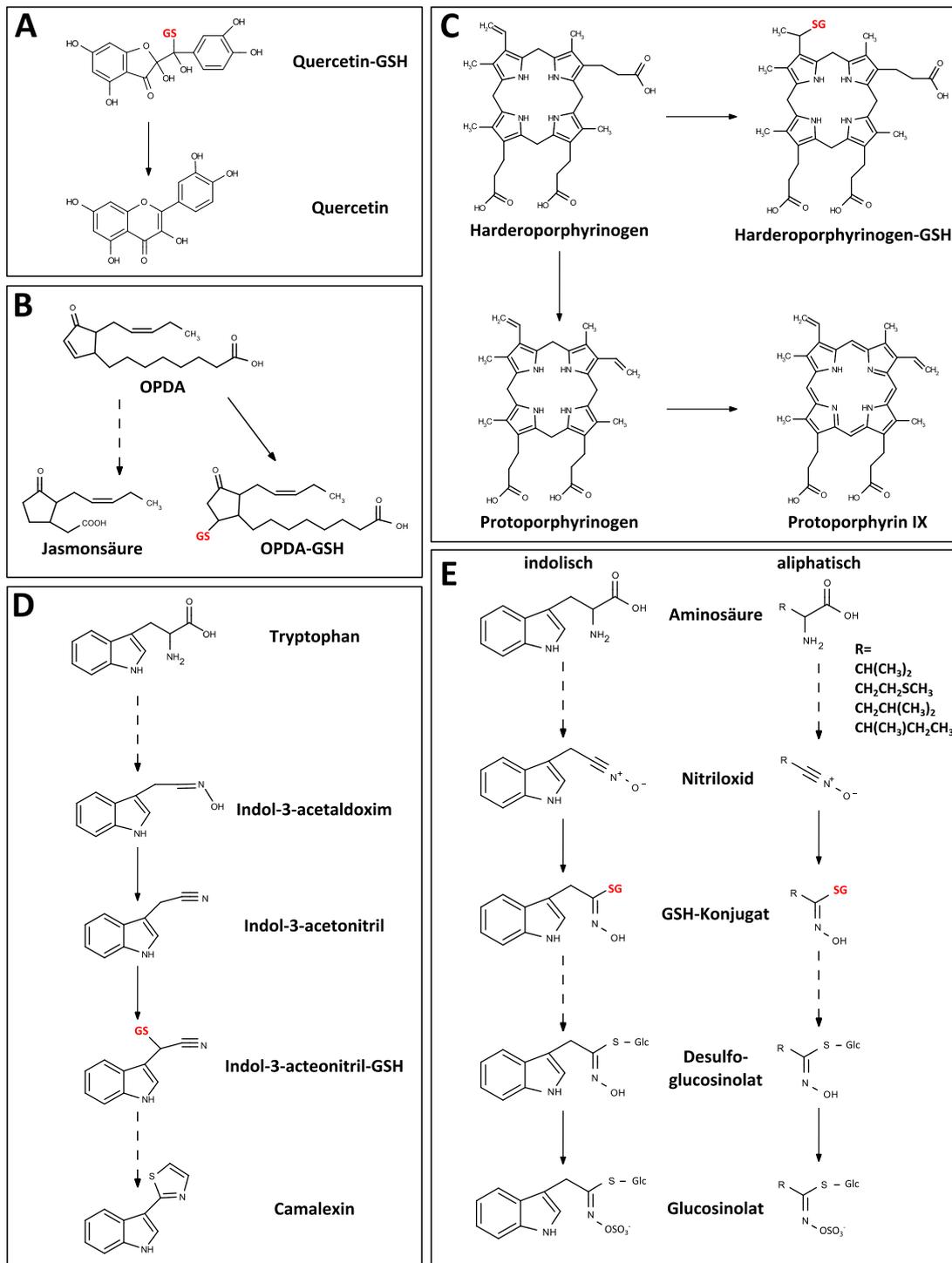
Abhängig von der Klasse und der Reaktion, die sie katalysieren, können einige GSTs eindeutigen Aufgaben zugeordnet werden. So zeigen DHAR, GSTs und GSTTs spezifische Aktivitäten und eine entsprechende Lokalisation in der Zelle, die ihre Aufgabe zusätzlich unterstreicht. GSTTs sind als GSH-Peroxidasen in der oxidativen Stress-Antwort involviert, reduzieren Hydroperoxide von Fettsäuren und sind in Peroxisomen lokalisiert (Dixon *et al.*, 2010). DHARs fungieren durch die Reduktion von Dehydroascorbat zu Ascorbat als essentieller Teil der Redox-Homeostase, ihre Lokalisation wird in Chloroplasten vermutet (Dixon und Edwards, 2010a). Die Bindung von Kampferol und anderen Flavonoiden an GSTs und die Deglutathionylierung von Quercetin deutet auf eine Rolle in der Homeostase der reduzierten Flavonoide in der Zelle hin (Dixon und Edwards, 2010b) (Abbildung 1.13 A).

Viel schwieriger ist es, Funktionen der Mitglieder der beiden größten Klassen, Phi und Tau, zu benennen. Die einzige GST aus Arabidopsis, die zu einer dieser Klassen gehört und der eine eindeutige Funktion zugeordnet werden kann, ist die GSTF12. Änderungen in dem Gen – Mutanten in Arabidopsis werden als *TRANSPARENT TESTA 19 (tt19)* bezeichnet – führen zu verminderter Bindung und Transport von Proanthocyaniden und Anthocyanen in die Vakuole (Li *et al.*, 2011; Sun *et al.*, 2012). Da GSTF12 kein Serin im aktiven Zentrum enthält, wird kein GSH-Konjugat gebildet. Jedoch konnte in *Vitis vinifera* gezeigt werden, dass der Transport von Anthocyanen durch den ABC-Transporter ABCC1 GSH-abhängig ist (Zhao, 2015).

Bei der Analyse von anderen GSTs fehlen solch eindeutige Phänotypen jedoch aufgrund ihrer Anzahl und Redundanz und *in vivo*-Studien sind nicht aussagekräftig. Selbst multiple *knock-outs* (KO) von

GSTs zeigten keinen deutlichen Phänotyp (Sappl *et al.*, 2009). Zudem sind nur wenige endogene Substrate bekannt. Die meisten Aktivitätsstudien wurden mit dem Modells substrat 1-Chloro-2,4-dinitrobenzen (CDNB) oder, aufgrund der wirtschaftlichen Relevanz, mit Herbiziden durchgeführt (Dixon und Edwards, 2009; Krajewski *et al.*, 2013; McGonigle *et al.*, 2000). Durch „fishing“-Experimente wurde die Bindung von Protoporphyrin-Intermediaten und unterschiedlichen Fettsäuren an GSTUs gezeigt (Dixon *et al.*, 2008; Dixon und Edwards, 2009). Dazu passt die Beobachtung, dass das Signal- und Vorläufer-Molekül von Jasmonsäure (JA) 12-Oxophytodiensäure (OPDA) an GSH konjugiert wird und dass diese Reaktion durch GSTF8 katalysiert wird (Dueckershoff *et al.*, 2008; Mueller *et al.*, 2008) (Abbildung 1.13 B). Die biologische Funktion dieser Glutathionylierung ist noch nicht weiter untersucht. Durch die Addition könnten chemisch reaktive Gruppen geschützt werden und die GSTs als Transportproteine für diese Substanzen fungieren. Weitere Produkte der Lipidperoxidation, die durch verschiedene Stressfaktoren induziert werden, wurden ebenfalls als GSH-Konjugate identifiziert (Davoine *et al.*, 2005; Davoine *et al.*, 2006). In wie weit diese spontan gebildet werden und ob GSTs bei der Formation, dem Transport oder der Detoxifizierung *in vivo* beteiligt sind, ist bisher ungeklärt. Das reaktive Protoporphyrinogen wird in den Chloroplasten synthetisiert und unter anderem in den Mitochondrien in der Häm-Biosynthese eingesetzt. Die Protoporphyrin-bindenden GSTs könnten an diesem Transport beteiligt sein (Dixon *et al.*, 2008) (Abbildung 1.13 C).

Die Ko-Regulation der Expression von GSTs mit Genen, die im Sekundärmetabolismus involviert sind, ist eine weitere Möglichkeit, um endogene Funktionen dieser Enzymfamilie zu beleuchten (Glombitza *et al.*, 2004). GSTU3/GSTU4 und GSTU11/GSTU12 zeigen in Expressionsanalysen die Ko-Regulation mit Genen der Indol-Glucosinolatbiosynthese, während die Expression von GSTF10, GSTF11 und GSTU20 mit Genen der aliphatischen Glucosinolatbiosynthese verknüpft ist (Dixon *et al.*, 2010). Es wird postuliert, dass GSH der Donor für das Schwefelatom in Glucosinolaten und Camalexin in *Arabidopsis* ist und GSTs an dieser Reaktion beteiligt sind (Geu-Flores *et al.*, 2011; Sønderby *et al.*, 2010; Su *et al.*, 2011) (Abbildung 1.13 D, E). Die wenigen Beispiele für endogene GST-Substrate könnten an der Art der Reaktion und dem Umsatz der Produkte in der Zelle liegen. Während bei Pestiziden durch die GST-vermittelte Detoxifizierung eine funktionelle Gruppe durch GSH ersetzt wird, wird bei endogenen Substraten meist eine reversible Additionsreaktion durchgeführt (Dixon *et al.*, 2010).



**Abbildung 1.13 Endogene Substrate für pflanzliche GSTs.**

GSTs der Klasse Lambda reduzieren glutathionylierte Flavonoide wie Quercetin und scheinen auf diese Weise an der Aufrechterhaltung des antioxidativen Flavonoide-Vorrats in der Zelle beteiligt zu sein (A). 12-Oxophytodiensäure (OPDA), ein Zwischenprodukt der Jasmonsäurebiosynthese, dem selbst biologische Eigenschaften zugeschrieben werden, wurde als GSH-Konjugat nachgewiesen (B). Intermediate der Protoporphyrin-Biosynthese binden an GSTs und wurden als GSH-Konjugate in GST-überexprimierenden Arabidopsis identifiziert (C). Camalexin (D) und Glucosinolate (E) sind schwefelhaltige Sekundärmetabolite in Arabidopsis, bei denen der Schwefeldonor GSH ist.

Daher ist die Rolle, die GSTs in der Herbiziddetoxifizierung spielen, gut erforscht. Bei einer Vielzahl von Herbiziden konnte Resistenz, die auf eine erhöhte GST-vermittelte Konjugation an GSH basiert, nachgewiesen werden (Gray *et al.*, 1996; Hatton *et al.*, 1996; Shimabukuro *et al.*, 1971). Die Überexpressionen von hochaktiven GSTs einer Spezies in einer anderen, die keine natürliche Toleranz gegenüber den getesteten Herbiziden hatte, führen häufig zur Herbizidresistenz. So konnte die Expression der ZmGSTI aus *Zea mays* Tabak vor den Schäden durch das Herbizid Alachlor schützen (Karavangeli *et al.*, 2005). Die Überexpression der ZmGSTIV in Weizen führte sogar zur Multi-Herbizidtoleranz (Milligan *et al.*, 2001). Die Überexpression der GSTU4 aus Sojabohne in Tabak, die eine Aktivität gegenüber den Herbiziden Fluorodifen und Alachlor aufweist, führte zu einer erhöhten Herbizidkonjugation mit GSH und einem besseren Wachstum der Überexpressionslinien auf Herbizid-haltigem Medium (Benekos *et al.*, 2010). Ungewiss scheint der Effekt der Überexpression der eigenen OsGSTL1 auf die Resistenz von Reis zu sein (Hu *et al.*, 2009). Hu und Kollegen zeigen in den überexprimierten Pflanzen eine erhöhte GST-Aktivität gegenüber CDNB, die verringerte Produktion von Superoxid und die Resistenz gegenüber Glyphosat und Chlorsulfuron. Da Glyphosat kein Substrat für GSTs ist, sind wahrscheinlich sekundäre Effekte, wie eine erhöhte Toleranz gegenüber oxidativem Stress, der Grund für die beobachtete Resistenz. In dem multi-herbizidresistentem Unkraut *A. myosuroides* wurde ein ähnlicher Effekt als Resistenzursache identifiziert (Cummins *et al.*, 2013).

Die hohe Abundanz, flexible Expression und Vielzahl von katalysierten Reaktionen der GSTs zusammen mit einem breiten Substratspektrum bieten die Voraussetzungen für unterschiedliche Aufgaben in der Zelle.

### 1.3. Zielsetzung der Arbeit

Obwohl die Forschung an GSTs bereits lange andauert, bleiben viele Fragen bisher unbeantwortet:

Was sind endo- und exogene Substrate für pflanzliche GSTs?

Warum ist diese Genfamilie in Pflanzen so groß?

Wie sehr überlappen GSTs in ihrem Substratspektrum?

Welche Aminosäuren beeinflussen die Substratspezifität?

Ein Grund warum diese Fragen nur teilweise oder unzureichend geklärt sind, liegt an der früheren Fokussierung auf einige, wenige Isoenzyme aus wirtschaftlich relevanten Nutzpflanzen. So ist das Wissen über eine Handvoll GSTs aus Mais und Weizen sehr detailliert, ermöglicht jedoch keine Aussagen über das gesamte Spektrum der GSTs einer Spezies (Cummins *et al.*, 1997; Dixon

*et al.*, 1997). Erst in den letzten Jahren, mit zunehmenden Informationen zu Genomsequenzen und Expressionsdaten, wurde die komplette GST-Familie einer Art möglichst umfassend beschrieben und in Teilen charakterisiert (Dixon *et al.*, 2009; Lan *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2013). In allen Fällen wird dabei die Aktivität der GSTs auf die grundlegenden katalytischen Mechanismen mit einigen wenigen Modellsubstraten, wie CDNB, 4-Chloro-7-nitro-2,1,3-benzoxadiazol (NBD-Cl), Dehydroascorbat, Etacrynsäure und Cumolhydroperoxid, bestimmt; nur wenige Studien erörtern das breite katalytische Potential, das GSTs aller Vorrausicht nach haben (Clarke, 1998; McGonigle *et al.*, 2000).

Krajewski und Kollegen haben durch die heterologe Expression von pflanzlichen GSTs in einem GST-defizientem Hefestamm (*Saccharomyces cerevisiae*) die Aktivität von 42 der 59 GSTs aus Arabidopsis gegenüber drei verschiedenen Substraten demonstriert (Krajewski *et al.*, 2013). Hefe ist ein gut etabliertes System, um pflanzliche Enzyme zu charakterisieren und Toxizität und Detoxifizierung xenobiotischer Substanzen zu analysieren (Cabral *et al.*, 2003; Pompon *et al.*, 1997; van Leeuwen *et al.*, 2011). Im Rahmen dieser Arbeit soll die Expression der GST-Familie aus *A. thaliana* in Hefe und die Analyse ihrer Aktivität gegenüber verschiedenen Herbiziden Substratspezifitäten aufzeigen, wenn möglich Struktur-Aktivitäts-Beziehungen beleuchten und ihren Einfluss auf die Herbizidtoleranz *in planta* aufklären. Das Hefesystem soll durch die Deletion der Gene, die für Proteine des GSH-Konjugat-Katabolismus kodieren, weiterentwickelt werden und so die Detektion und Analyse von GSH-Substraten optimiert werden.

Zusätzlich gibt es die Möglichkeit Hefemetabolite durch stabile Schwefelisotope zu markieren und GSH-Konjugate mittels MS nachzuweisen (Gläser *et al.*, 2014). Zur Identifizierung von potentiellen GST-Substraten anhand der Schwefelmarkierung soll eine Methode etabliert und getestet werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Geräte

| Gerät                  | Modell                                | Hersteller            |
|------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| DNA-Gelelektrophorese  | CONSORT E844                          | Biometra              |
|                        | Doc-It                                | UVP                   |
|                        | P91D                                  | Mitsubishi            |
|                        | UV 312 nm                             | Bachhofer             |
| Elektroporation        | Eporator                              | Eppendorf             |
| HPLC                   | P680 HPLC Pumpe                       | Dionex                |
|                        | ASI-100 Automated Sample Injector     |                       |
|                        | UVD170U Detector                      |                       |
| ICR-FT/MS              | SolariX                               | Bruker Daltonics      |
|                        | Apollo II ESI                         |                       |
|                        | 12 T supraleitender Magnet            |                       |
| Inkubator              | WTB                                   | Binder                |
| Nano-Drop              | NanoPhotometer 7122 V1.4              | Implen                |
| PCR                    | T-Gradient                            | Biometra              |
| Photometer             | Ultrospec 2000 UV                     | Pharmacia Biotech     |
| Protein-Elektrophorese | Mini Protean Tetra System             | BioRad                |
| qPCR                   | C1000 Thermal Cycler                  | BioRad                |
|                        | CFX 96 Real Time System               |                       |
|                        |                                       |                       |
| Schüttler Mikrobio     | Labshake THO5                         | C. Gerhardt           |
| Schüttler Pflanzen     | AG-15                                 | Infors                |
| Schwingmühle           | Tissue LyserII                        | Qiagen                |
| Thermomixer            | Thermomixer comfort                   | Eppendorf             |
| Ultraschall            | Sonoplus HD2070                       | Bandelin              |
| Vortexer               | Vortex-Genie 2                        | Scientific Industries |
| Waage                  | BP 3100 S                             | Sartorius             |
|                        | A 200 S                               | Sartorius             |
| WesternBlot            | Trans-Blot® SD Semi-Dry Transfer Cell | BioRad                |
|                        | EPS 200 Electrophoresis Power Supply  | Pharmacia Biotech     |
| Zentrifuge             | Avanti J-25                           | Beckmann Coulter      |
|                        | Centrifuge 5424                       | Eppendorf             |
|                        | Centrifuge 5424 R                     | Eppendorf             |
|                        | ROTINA 420R                           | Hettich               |
|                        | Sprout                                | Biozym Scientific     |

## 2.2. Chemikalien und Lösungsmittel

Wenn nicht anders angegeben, wurden alle verwendeten Chemikalien in höchstmöglicher Reinheit von Sigma-Aldrich GmbH (München) oder Carl Roth GmbH & Co KG (Karlsruhe) erworben. Lösungsmittel für die HPLC wurden in HPLC-Qualität von J.T. Baker (Avantor Performance Materials, Center Valley, USA) bezogen. Die verwendeten Pestizide wurden in analytischer Standardqualität PESTANAL® von Sigma-Aldrich GmbH (München) verwendet und für alle Analysen gelöst in Dimethylsulfoxid (DMSO) eingesetzt.

## 2.3. Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Primer wurden alle bei Eurofins MWG Synthesis (Ebersberg) in „salt free“-Qualität bestellt. Eine Liste der Sequenzen findet sich im Anhang unter Tabelle 6.1.

## 2.4. Stämme und Anzuchtbedingungen

### 2.4.1. *Escherichia coli*

*E. coli* wurde zur Klonierung und Vermehrung von Plasmid-DNA verwendet, wobei auf die Stämme XL1 blue (endA1 gyrA96(nal<sup>R</sup>) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[::Tn10 proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> Δ(lacZ)M15] hsdR17(r<sub>K</sub><sup>-</sup> m<sub>K</sub><sup>+</sup>) und DH5α (fhuA2 lac(del)U169 phoA glnV44 Φ80' lacZ(del)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17) zurückgegriffen wurde. Kulturen wurden in *lysogeny broth* (LB)-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bei 37 °C angezogen, Flüssigkulturen wurden zudem bei 200 rpm geschüttelt. Eine Liste aller, im Rahmen dieser Arbeit, verwendeten *E. coli* findet sich im Anhang (Tabelle 6.2).

| LB-Medium (1L) |      |
|----------------|------|
| Pepton         | 10 g |
| Hefeextrakt    | 5 g  |
| NaCl           | 10 g |

Der pH wurde auf 7 eingestellt und bei Festmedium zusätzlich 15 g Agar zugefügt. Nach dem Autoklavieren wurden 100 µg/ml Ampicillin oder 50 µg/ml Kanamycin zugesetzt.

### 2.4.2. *Saccharomyces cerevisiae*

*S. cerevisiae* wurde als Modelorganismus für die heterologe Expression von GSTs aus Arabidopsis verwendet. Hierfür wurden durch homologe Rekombination verschiedene *knock out* (KO)-

Mutanten hergestellt und verwendet, die in Tabelle 6.3 aufgelistet sind. Die Grundlage aller verwendeten Stämme waren die beiden Wildtypen (WT) BY4741 (MATa his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 met15 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0) und BY4742 (MAT $\alpha$  his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0) (Brachmann *et al.*, 1998). Eine Liste der GST-exprimierenden, unterschiedlichen Hefestämme findet sich im Anhang (Tabelle 6.4).

Die Anzucht von Hefekulturen, die kein Plasmid trugen, erfolgte in YPD-Medium, während alle Plasmid-enthaltenden Hefestämme im Minimalmedium SD angezogen wurden. Für die Markierung mit Isotopem  $^{34}\text{S}$ -Schwefel wurde schwefelfreies SD-Medium verwendet, dem nach dem Autoklavieren  $^{32}\text{SO}_4^{2-}$  oder  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  zugesetzt wurden. Wenn nicht anders angegeben betrug die Endkonzentration des Sulfats im Medium 80  $\mu\text{M}$ . Die Kulturen wurden entweder auf Festmedium bei 30 °C für mindestens 2d oder in Flüssigkultur bei 30 °C und 200 rpm angezogen.

---

| <b>YPD-Medium (1L)</b> |      |
|------------------------|------|
| Pepton                 | 20 g |
| Hefeextrakt            | 10 g |

Der pH wurde auf 6,5 eingestellt und nach dem Autoklavieren 50 ml einer 40 %igen (w/v), sterilen Glukoselösung zugegeben. Für Festmedium wurden 15 g/L Agar zugefügt.

---

| <b>SD-Medium (1L)</b>       |    |
|-----------------------------|----|
| Makrosalze                  | 1x |
| Mikrosalze                  | 1x |
| auf 850 ml mit MQ auffüllen |    |

Der pH betrug 5,8. Nach dem Autoklavieren wurden 100 ml der 10x Dropout-Lösung ohne die, auf die zu selektierenden, Aminosäuren und 50 ml 40 % (w/v) Saccharose bzw. Galaktose. Alle zugegebenen Lösungen wurden zuvor autoklaviert. Für Festmedium wurden 15 g/L Agar zugefügt.

---

| <b>10x Makrosalze schwefelhaltig (1L)</b> |         | <b>10x Makrosalze schwefelfrei (1L)</b> |         |
|---|---------|---|---------|
| Kaliumdihydrogenphosphat                  | 10 g    | Kaliumdihydrogenphosphat                | 10 g    |
| Magnesiumsulfat Heptahydrat               | 10,24 g | Magnesiumchlorid                        | 3,95 g  |
| Natriumchlorid                            | 1 g     | Natriumchlorid                          | 1 g     |
| Calciumchlorid Anhydrat                   | 1 g     | Calciumchlorid Anhydrat                 | 1 g     |
| Ammoniumsulfat                            | 50 g    | Ammoniumchlorid                         | 40,46 g |

| <b>1000x Mikrosalze schwefelhaltig (1L)</b> |         | <b>1000x Mikrosalze schwefelfrei (1L)</b> |          |
|---|---------|---|----------|
| Biotin                                      | 2 mg    | Biotin                                    | 2 mg     |
| Pantothensäure Calciumsalz                  | 400 mg  | Pantothensäure Calciumsalz                | 400 mg   |
| Folsäure                                    | 20 mg   | Folsäure                                  | 20 mg    |
| Myo-Inositol                                | 2000 mg | Myo-Inositol                              | 2000 mg  |
| Nicotinsäure                                | 400 mg  | Nicotinsäure                              | 400 mg   |
| p-Aminobenzolsäure                          | 200 mg  | p-Aminobenzolsäure                        | 200 mg   |
| Pyridoxinhydrochlorid                       | 400 mg  | Pyridoxinhydrochlorid                     | 400 mg   |
| Riboflavin                                  | 200 mg  | Riboflavin                                | 200 mg   |
| Thiamin HCl                                 | 400 mg  | Thiamin HCl                               | 400 mg   |
| Borsäure                                    | 500 mg  | Borsäure                                  | 500 mg   |
| Kupfersulfat                                | 40 mg   | Kupferchlorid                             | 21,6 mg  |
| Kaliumiodid                                 | 100 mg  | Kaliumiodid                               | 100 mg   |
| Eisen-II-chlorid                            | 200 mg  | Eisen-II-chlorid                          | 200 mg   |
| Mangansulfat                                | 400 mg  | Manganchlorid                             | 468,4 mg |
| Natriummolybdän                             | 200 mg  | Natriummolybdän                           | 200 mg   |
| Zinksulfat                                  | 400 mg  | Zinkacetat                                | 305,2 mg |

| <b>10x Dropout-Lösung (1L)</b> |         |
|--------------------------------|---------|
| L-Adenin Hemisulfatsalz        | 200 mg  |
| L-Arginin HCl                  | 200 mg  |
| L-Isoleucin                    | 300 mg  |
| L-Lysin HCl                    | 300 mg  |
| L-Methionin                    | 200 mg  |
| L-Phenylalanin                 | 500 mg  |
| L-Threonin                     | 2000 mg |
| L-Tyrosin                      | 200 mg  |
| L-Valin                        | 1500 mg |
| L-Tryptophan                   | 200 mg  |
| L-Histidin                     | 200 mg  |
| L-Leucin                       | 1000 mg |
| L-Uracil                       | 200 mg  |

#### 2.4.3. *Agrobacterium tumefaciens*

*A. tumefaciens* wurde als Vektor für die stabile Transformation von *A. thaliana* verwendet. Da für die Transformation von Pflanzen das Plasmid pGreen verwendet wurde, wurde ein *A. tumefaciens*-Stamm verwendet, der die Virulenzgene bereits auf einem zweiten Plasmid, dem pSoup, enthält: GV3101. Für die Vorkulturen wurde *A. tumefaciens* in LB-Medium mit Gentamycin (25 µg/ml) und Rifampicin (25 µg/ml) angezogen. Nach der Transformation mit pGreen wurde zusätzlich mit 50 µg/ml Kanamycin selektiert. Die Kultivierung erfolgte bei 30 °C für 2 d auf Festmedium oder bei 200 rpm und 30 °C in Flüssigkultur. Zusammensetzung des LB-Mediums siehe Abschnitt 3.4.1.

### 2.4.4. *Arabidopsis thaliana*

Alle verwendeten Stämme basierten auf dem Ökotyp Columbia-0 und wurden in Tabelle 6.5 aufgelistet. Die KO-Mutanten wurden vom European Arabidopsis Stock Centre (NASC, Loughborough, UK) bezogen, während Überexpressionslinien mittels *A. tumefaciens*-vermittelter Transformation selbst generiert wurden. Für die Überexpression von Genen in *Arabidopsis* wurde das Plasmid pGreen verwendet (Hellens *et al.*, 2000), bei dem das Gen unter der Kontrolle des 35S-Promotors aus dem Blumenkohlmosaikvirus (CMV) steht (Odell *et al.*, 1985). Als Terminator diente der Nos-Terminator. Die Selektion in *A. tumefaciens* und *E. coli* wurde durch den Kanamycin-Marker auf dem Plasmid ermöglicht, während die Selektion in der Pflanze durch BASTA® (Bayer CropScience AG) erfolgte.

Für die Vermehrung und Gewinnung von Samen wurde *Arabidopsis* in Typ T-Erde mit einer unteren Vermiculit-Schicht bei 22 °C und Langtag-Bedingungen ( $160 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) bis zum Abreifen der Schoten angezogen. Für physiologische Analysen wurden meist 10 d alte Keimlinge verwendet, die als sterile Samen auf  $\frac{1}{4}$  Murashige und Skoog (MS)-Platten ohne Zucker ausgebracht wurden (Murashige und Skoog, 1962). Kurzzeitige Belastungsexperimente erfolgten in Flüssigkulturen von  $\frac{1}{4}$  MS ohne Zucker. Für Untersuchungen des Wurzelwachstums oder dem Umsatz von Pestiziden wurden die Keimlinge bei Dauerlicht einer Lichtstärke von  $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  und 23 °C, im Falle von Flüssigkulturen bei 100 rpm, inkubiert. Für Analysen, die die Auswirkung von PSII-inhibierenden Herbiziden untersuchten, wurden Pflanzen unter Langtag-Bedingungen (16 h Licht ( $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) bei 22 °C und 65 % Luftfeuchtigkeit, 8 h Dunkelheit bei 17 °C und 75 % Luftfeuchtigkeit) angezogen.

---

| <b><math>\frac{1}{4}</math> MS-Medium (1L)</b> |       |
|--|-------|
| Makrosalze                                     | 0,25x |
| Mikrosalze                                     | 0,25x |
| 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure               | 1 g   |

---

| <b>10x MS-Makrosalze (1L)</b>          |        |
|--|--------|
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>        | 16,5 g |
| KNO <sub>3</sub>                       | 19 g   |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>        | 1,7 g  |
| CaCl <sub>2</sub> x 2 H <sub>2</sub> O | 4,4 g  |
| MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O | 3,7 g  |

| <b>50x MS-Mikrosalze (1L)</b>                         |         |
|---|---------|
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                        | 310 mg  |
| CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O                | 1,25 mg |
| CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O                | 1,25 mg |
| FeSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O                | 1390 mg |
| MnSO <sub>4</sub> x 4 H <sub>2</sub> O                | 1115 mg |
| KI  | 41,5 mg |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O | 12,5 mg |
| ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O                | 430 mg  |
| Na <sub>2</sub> EDTA x 2 H <sub>2</sub> O             | 1860 mg |

## 2.5. Methoden

### 2.5.1. Isolierung von Nukleinsäuren

#### 2.5.1.1. Isolierung von DNA aus *S. cerevisiae*

Genomische DNA wurde aus Hefe isoliert, um Gene zu amplifizieren oder den erfolgreichen KO von Genen zu überprüfen. Dafür wurde eine Hefe-Flüssigkultur in YPD bei 30 °C und 200 rpm inkubiert und die Hefezellen anschließend mittels Zentrifugation geerntet. Das Zellpellet wurde mit dem gleichen Volumen, in HCl gewaschener, Glasperlen (ø 0,25-0,5 mm) in 500 µl Lysispuffer resuspendiert und für mindestens eine Minute auf einem Vortexer geschüttelt. Nach kurzer Zentrifugation wurde die Lösung in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 275 µl Ammoniumacetat (7M, pH 7) versetzt und bei 65 °C für 5 min inkubiert. Nach dem Mischen mit 500 µl Chloroform und erneutem Zentrifugieren wurde die obere, wässrige Phase abgenommen und mit eiskaltem Isopropanol gemischt. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugation für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit pelletiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und im Anschluss bei RT getrocknet. Nach der Aufnahme in TE-Puffer (pH 8) wurde die DNA über eine Säule aufgereinigt. Dafür wurde das NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up-Kit von Macherey-Nagel, nach Angaben des Herstellers für die Aufreinigung großer DNA-Fragmente, verwendet.

| <b>Lysispuffer</b> |        |
|--------------------|--------|
| Tris-HCl, pH 8     | 100 mM |
| EDTA, pH 8         | 50 mM  |
| SDS (v/v)          | 1 %    |

### 2.5.1.2. Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Für die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* wurde das NucleoSpin® Plasmid-Kit (Macherey-Nagel) nach Angaben des Herstellers verwendet. Dabei wurde das Protokoll für die Isolierung von *low copy*-Plasmiden angewandt.

### 2.5.1.3. Isolierung von RNA aus *A. thaliana*

Die Isolierung von RNA aus Blattmaterial von *A. thaliana* erfolgte mittels dem innuPrep RNA Mini-Kit von Analytik Jena. Dabei wurde das Protokoll des Herstellers verwendet. Die erfolgreiche Extraktion und Reinheit der RNA wurde auf einem Agarosegel überprüft.

### 2.5.2. Agrosegelelektrophorese

Zum Nachweis von Nukleinsäuren und der Auftrennung entsprechend ihrer Größe wurde die Agarosegelelektrophorese verwendet. Dafür wurden 0,8 % Agarose in TAE-Puffer gelöst und mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Auftrennung der Proben, die mit 6x Ladepuffer versetzt waren, in der Gelmatrix erfolgte bei 200 V. Als Größenstandard wurde der GeneRuler 1kb DNA ladder (Thermo Fisher) verwendet. Das, in die DNA interkalierende, Ethidiumbromid wurde unter UV-Licht bei x nm sichtbar.

| <b>50x TAE-Puffer (1L)</b> |       | <b>6x Ladepuffer</b> |       |
|----------------------------|-------|----------------------|-------|
| Tris                       | 2 M   | Glycerin             | 50 %  |
| EDTA, pH 8                 | 50 mM | EDTA, pH 8           | 1 mM  |
| Eisessig                   | 5 %   | Orange G             | 0,2 % |

### 2.5.3. Restriktion von DNA

Restriktionsenzyme erkennen spezifische Sequenzen in der DNA und schneiden diese, meist an palindromischen Stellen. Für die Restriktion von Plasmiden oder PCR-Produkten wurde bis zu 1 µg DNA mit 1x Restriktionspuffer und 1 U Restriktionsenzym bei 37 °C für 1 h inkubiert. Die geschnittene DNA wurde über ein Agarosegel aufgetrennt oder mittels Säule (NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up-Kit von Macherey-Nagel) aufgereinigt. Restriktionsenzyme wurden von Thermo Fisher bezogen und entsprechend der Herstellerangaben verwendet.

### 2.5.4. Dephosphorylierung von DNA

Durch die Dephosphorylierung wurde die Religation restringierter DNA-Fragmente verhindert. Dafür wurde die zu behandelnde DNA mit 1 U Antarctic Phosphatase (New England BioLabs) und 1x Reaktionspuffer gemischt und nach 15 min bei 37 °C für 5 min bei 70 °C inkubiert.

2.5.5. Ligation von DNA

Die Ligation zweier DNA-Fragmente erfolgte mittels T4 DNA Ligase (Thermo Fisher). Die Inkubation des Reaktionsansatzes, bestehend aus DNA, Reaktionspuffer und 1,5 U Ligase, erfolgte bei 16 °C üN oder 21 °C für 2 h.

2.5.6. DNA-Präparation aus Agarosegelen

Die Extraktion von DNA-Fragmenten nach ihrer Auftrennung in einem Agarosegel erfolgte mittels NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up-Kit von Macherey-Nagel nach Angaben des Herstellers.

2.5.7. cDNA-Synthese

Für den Abbau von DNA durch DNasen und die Synthese der komplementären DNA (cDNA) durch Reverse Transkriptase wurde das cDNA Synthesis-Kit (Thermo Fisher) verwendet. Die Isolierung der messenger-RNA (mRNA) aus RNA erfolgte, indem bei der cDNA-Synthese ein Oligo d(t)-Primer verwendet wurde.

2.5.8. Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde verwendet, um DNA-Fragmente zu vervielfältigen, die erfolgreiche Transformation von Plasmiden in Mikroorganismen nachzuweisen (Kolonie-PCR), anhand der Quantität eines spezifischen Fragmentes die Expressionsstärke von Genen zu ermitteln (*real time*-PCR) oder über Primer gezielt Mutationen in ein Gen einzubringen. Der Einsatz des KAPA3G Plant PCR-Kits ermöglichte den Nachweis von Fremd-DNA in Pflanzen direkt anhand des Blattmaterials, ohne eine vorherige Aufreinigung der DNA.

2.5.8.1. PCR

| Ansatz (20 µl)                     |           | Programm               |            |           |
|------------------------------------|-----------|------------------------|------------|-----------|
| DNA                                | 0,1-10 ng | Initiale Denaturierung | 98 °C      | 3 min     |
| Primer                             | je 0,5 µM | Denaturierung          | 98 °C      | 15 s      |
| dNTPs                              | 0,5 mM    | Primer-Anlagerung      | 50 - 65 °C | 20 s      |
| 5x HF-Puffer                       | 1 x       | Elongation             | 72 °C      | 30 s/1 kb |
| Phusion-Polymerase (Thermo Fisher) | 0,5 U     | Abschluss-Elongation   | 72 °C      | 3 min     |

} 30x

2.5.8.2. Kolonie-PCR

Wurden *E. coli* oder *A. tumefaciens* getestet, wurde eine Kolonie in 5 µl MQ-H<sub>2</sub>O gelöst, mit dem restlichen PCR-Ansatz vermischt und direkt in der PST eingesetzt. Der Nachweis von DNA in

Hefezellen mittels PCR erforderte zunächst eine Vorbehandlung mit Lyticase. Dafür wurde eine Hefekolonie in 50 µl Lyticase (50 U/ml) gelöst und für 30 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Deaktivierung der Lyticase bei 95 °C für 10 min wurden 2 µl in der PCR eingesetzt.

| Ansatz (15 µl)                 |           | Programm               |            |            |
|--------------------------------|-----------|------------------------|------------|------------|
| <i>template</i>                | 1 Kolonie | Initiale Denaturierung | 98 °C      | 8 min      |
| Primer                         | je 0,5 µM | Denaturierung          | 98 °C      | 30 s       |
| dNTPs                          | 1 mM      | Primer-Anlagerung      | 50 - 55 °C | 30 s       |
| 5x Puffer                      | 1 x       | Elongation             | 72 °C      | 1 min/1 kb |
| GoTaq®-Polymerase<br>(Promega) | 1,25 U    | Abschluss-Elongation   | 72 °C      | 5 min      |

28x

#### 2.5.8.3. PCR mit Blattmaterial

Für die direkte PCR auf Blattmaterial wurde, entsprechend der Angaben des Herstellers, ein Blattstück in 50 µl Extraktionspuffer mit einer Pipetenspitze zerdrückt und von diesem Extrakt wurde 1 µl in die PCR eingesetzt.

| Extraktionspuffer |        |
|-------------------|--------|
| Tris-HCl          | 50 mM  |
| EDTA (pH 8)       | 0,1 mM |
| Dithiothreitol    | 10 mM  |

| Ansatz (15 µl)                                  |           | Programm               |            |           |
|---|-----------|------------------------|------------|-----------|
| Extrakt   | 1 µl      | Initiale Denaturierung | 95 °C      | 3 min     |
| Primer  | je 0,5 µM | Denaturierung          | 95 °C      | 20 s      |
| 2x KAPA-Puffer                                  | 1 x       | Primer-Anlagerung      | 50 - 55 °C | 15 s      |
| KAPA3G Plant-<br>Polymerase<br>(KAPABiosystems) | 1U        | Elongation             | 72 °C      | 30 s/1 kb |
|   |           | Abschluss-Elongation   | 72 °C      | 5 min     |

36x

#### 2.5.8.4. Quantitative *real time*-PCR

Quantitative *real time*-PCR (qPCR) ermöglicht die Quantifizierung von DNA durch den Einbau eines fluoreszierenden Farbstoffs in die DNA, welcher bei 492 nm angeregt wird und bei 530 nm emittiert. Die Fluoreszenz nimmt dabei proportional zu der Menge des gebildeten PCR-Produktes zu.

| Ansatz (10 µl)       |            | Programm               |          |       |
|----------------------|------------|------------------------|----------|-------|
| cDNA (1:20 verdünnt) | 1 µl       | Initiale Denaturierung | 95 °C    | 3 min |
| Primer               | je 0,25 µM | Denaturierung          | 95 °C    | 10 s  |
| 2x GoTaq® qPCR       | 1 x        | Primer-Anlagerung      | 60 °C    | 10 s  |
| Mastermix            |            | Elongation             | 72 °C    | 20 s  |
| (Promega)            |            | Schmelzkurve           | 60-95 °C | 10 s  |

45x

Vor der Quantifizierung wurden die verwendeten Primer auf ihre Effizienz hin untersucht und dieser Wert ist in die Berechnungen mit eingeflossen. Die Quantifizierung erfolgte relativ zu einer internen Kontrolle. Dabei wurde für die Normalisierung der Proben das Referenzgen *Ubiquitin10* verwendet. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software BioRad CFX Manager 3.1 (Bio-Rad Laboratories). Der Vergleich der Expressionsstärke zweier oder mehrerer Gene erfolgte durch die Bestimmung des Wertes  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Der Ct-Wert (*cycle threshold*) gab den Wert an, bei dem die exponentielle Phase der Amplifikation erreicht wurde. Die veränderte Expression des Zielgens in der Probe in Relation zur Kontrolle wurde anhand der Formel

$$2^{-\Delta\Delta Ct} = 2^{-[(Ct_{Zielgen} - Ct_{Referenzgen})_{Probe} - (Ct_{Zielgen} - Ct_{Referenzgen})_{Kontrolle}]}$$

berechnet.

#### 2.5.8.5. PCR-basierte, gerichtete Mutagenese

Für die gerichtete Mutagenese von Genen (*site directed mutagenesis*, SDM) wurden Primer, die in ihrer Sequenz im Vergleich zum Zielgen Punktmutationen trugen, verwendet. Als Vorlage für die PCR diente ein bereits klonierter Vektor mit dem entsprechenden Zielgen. Die verwendeten Vorwärts- und Rückwärts-Primer überlappten an der Stelle der Mutation auf einer Länge von 15 bp.

| Ansatz (20 µl)     |           | Programm                     |            |           |
|--------------------|-----------|------------------------------|------------|-----------|
| Plasmid-DNA        | 10-100 ng | Initiale Denaturierung       | 98 °C      | 3 min     |
| Primer             | je 0,5 µM | Denaturierung                | 98 °C      | 15 s      |
| dNTPs              | 0,5 mM    | Primer-Anlagerung (Gradient) | 50 - 70 °C | 20 s      |
| 5x HF-Puffer       | 1 x       | Elongation                   | 72 °C      | 30 s/1 kb |
| Phusion-Polymerase | 0,5 U     | Abschluss-Elongation         | 72 °C      | 10 min    |
| (Thermo-Fisher)    |           |                              |            |           |

20x

Der Vektor, der als Vorlage für die PCR diente, wurde durch das Enzym DpnI verdaut, sodass in der, im Anschluss folgenden, Transformation von *E. coli* lediglich die neu amplifizierten Plasmide mit mutiertem Zielgen in die Bakterien eingebracht wurden.

### 2.5.9. Transformation

#### 2.5.9.1. Transformation von *E. coli*

Zur Gewinnung von chemisch kompetenten *E.coli*-Zellen wurden 250 ml einer Kultur in Anfangsmedium bei 18 °C und 200 rpm auf eine OD<sub>600</sub> von 0,6 angezogen. Nach 10 min auf Eis wurden die Zellen bei 4 °C und 2500 g für 15 min zentrifugiert und das Pellet in 80 ml kaltem TB-Medium resuspendiert. Nach der Zugabe von 0,7 ml DMSO folgte eine Inkubation auf Eis für 10 min. Aliquotiert wurden sie bei -80 °C gelagert.

100 µl kompetenter Zellen wurden mit 10-500 ng DNA gemischt und für 20 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock bei 42 °C für 60 s, wurde 1 ml LB-Medium zugegeben und für 45-60 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Durch Zentrifugation wurden die Zellen pelletiert, in 100 µl LB-Medium aufgenommen und auf LB-Festmedium mit der entsprechenden Selektion ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C für 24 h.

| <b>Anfangsmedium (1L)</b> |        | <b>TB-Medium</b>  |        |
|---------------------------|--------|-------------------|--------|
| Pepton                    | 20 g   | PIPES, pH 6,4     | 10 mM  |
| Hefeextrakt               | 5 g    | MnCl <sub>2</sub> | 55 mM  |
| NaCl                      | 10 mM  | CaCl <sub>2</sub> | 15 mM  |
| KCl                       | 2,5 mM | KCl               | 250 nM |
| MgCl <sub>2</sub>         | 10 mM  |                   |        |
| MgSO <sub>4</sub>         | 10 mM  |                   |        |

#### 2.5.9.2. Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von Hefe war angelehnt an das Protokoll von Dietz und Schistl (Gietz und Schiestl, 2007). Der zu transformierende Hefestamm wurde von Platte in einer Vorkultur aus SD-Medium mit 2 % Saccharose üN bei 30 °C und 200 rpm angezogen, um am darauffolgenden Tag 50 ml Hauptkultur (pro Transformation 5 ml Hauptkultur) auf eine OD<sub>600</sub> von 0,3 aus der Vorkultur angeimpft und für weitere 5-6 h bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen bei maximaler Geschwindigkeit und 4 °C für 8 min pelletiert und mit 30 ml sterilem MQ-H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Liciumacetat (100 mM) aufgenommen, in ein neues Reaktionsgefäß überführt und erneut für 30 s bei RT und 12000 g zentrifugiert. Die Zellen wurden in 500 µl Liciumacetat (100 mM) resuspendiert, pro Transformationsansatz wurden 50 µl in einem neuen Reaktionsgefäß aliquotiert und erneut pelletiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden dem Pellet folgenden Lösungen (in dieser Reihenfolge) zugegeben:

240 µl 50 % PEG 3000

36 µl 1 M Liciumacetat

50 µl Lachs-DNA

34 µl Plasmid + MQ-H<sub>2</sub>O

Die Lachs-DNA (2 mg/ml in TE, pH 8) wurde zuvor für mind. 5 min bei 95 °C inkubiert und anschließend auf Eis gestellt. Das Pellet wurde gründlich resuspendiert und für 40 min bei 42 °C inkubiert. Nachdem die Zellen pelletiert und in MQ-H<sub>2</sub>O aufgenommen wurden, wurden sie auf SD-Festmedium mit der entsprechenden Selektion ausplattiert. Die Inkubation erfolgte bei 30 °C für 2 d.

#### 2.5.9.3. Transformation von *A. tumefaciens*

Zur Herstellung von elektrokompetenten *A. tumefaciens* wurden Zellen in LB-Medium bei 30 °C und 200 rpm auf eine OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 1 angezogen, auf Eis abgekühlt und anschließend durch Zentrifugation bei 4 °C und 5000 rpm für 10 min pelletiert. Das Zellpellet wurde zwei Mal mit 500 ml eiskühlem MQ-H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in 20 ml sterilem Glycerin (10 % v/v) aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation bei 4 °C und 5000 rpm für 10 min wurden die Zellen in 9 ml sterilem Glycerin (10 % v/v) resuspendiert und als Aliquots bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation von Plasmid-DNA in *A. tumefaciens* wurden die Zellen auf Eis aufgetaut und mit 10-100 ng DNA gemischt und in eine eiskühlte Elektroporationsküvette überführt. Nach einem elektrischen Impuls von 2500 V wurde 1 ml LB-Medium zu den Zellen hinzugefügt und die Zellen in einem neuen Reaktionsgefäß für 2 h bei 30 °C inkubiert. Pelletierte Zellen wurden in 100 µl LB-Medium aufgenommen, auf Festmedium mit entsprechender Selektion ausplattiert und bei 30 °C für 2 d inkubiert.

#### 2.5.9.4. Transformation von *A. thaliana*

Die stabile Transformation von *A. thaliana* erfolgte durch *A. tumefaciens*-vermittelten DNA-Transfer mittels *floral dip* (Clough und Bent, 1998). Dies setzte ca. drei Wochen alte Pflanzen voraus, deren Blüten kurz vor der Öffnung standen. Vorkulturen von *A. tumefaciens*, die den zu transformierenden binären Vektor enthielten, wurden in 3 ml LB-Medium (+Gen +Kan +Rif) bei 30 °C und 200 rpm für 24 h angezogen. Anschließend wurden 200 ml selektives LB-Medium mit der Vorkultur angeimpft und für weitere 24 h bei 30 °C und 200 rpm inkubiert. Die Zellen wurden durch Zentrifugation bei 4 °C und 3000 h für 10 min geerntet und das Pellet in 300 ml Infiltrationsmedium resuspendiert. Die Infloreszenzen der drei Wochen alten Pflanzen wurden 1 min in der Bakteriensuspension inkubiert. Nach dem Abreifen der Samen wurden positive Transformanten

selektiert, indem die Samen auf Erde ausgebracht und mit BASTA® (Bayer CropScience AG, Wirkstoff: Glufosinat-ammonium) behandelt wurden.

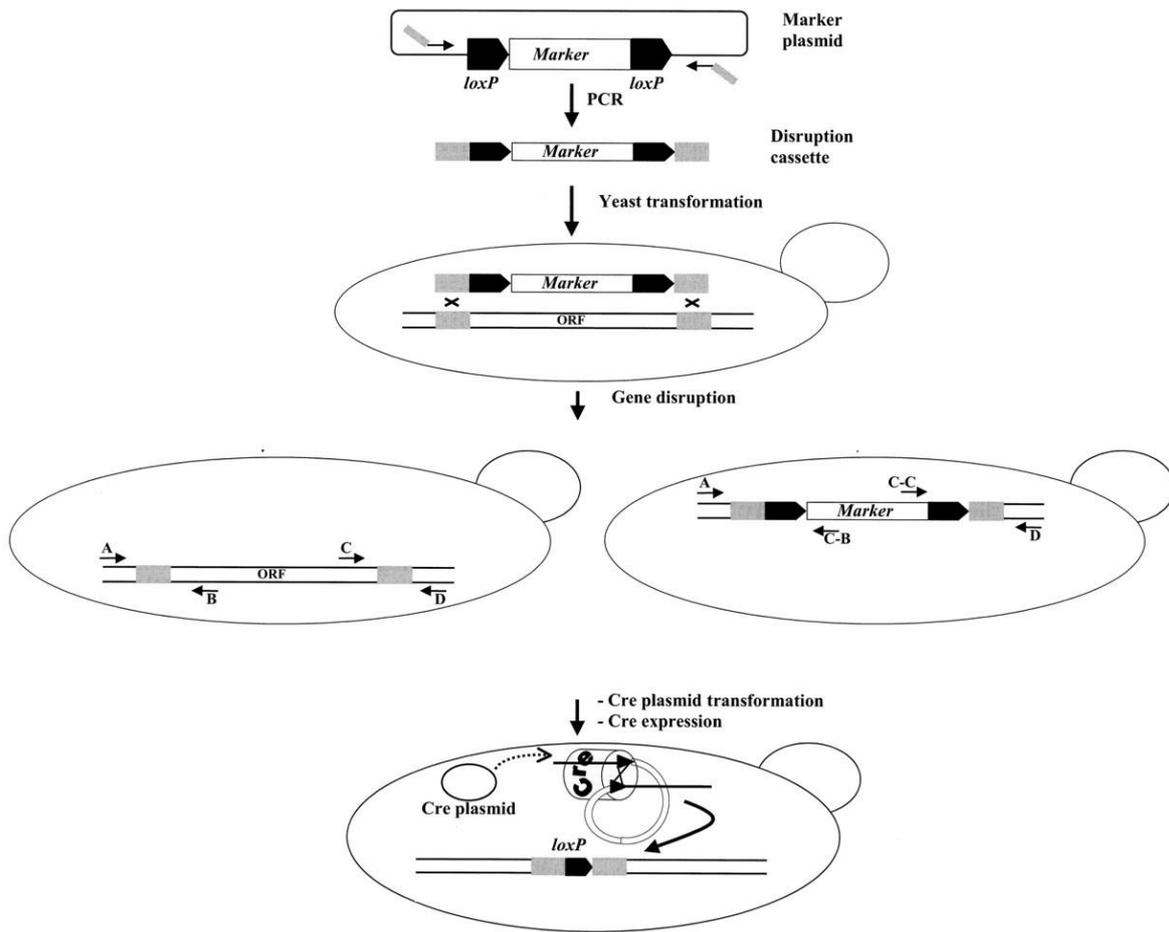
---

| <b>Infiltrationsmedium (1L)</b>  |        |
|----------------------------------|--------|
| Saccharose                       | 70 g   |
| 2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure | 0,5 g  |
| Silwet L-77 (Lehle Seeds, USA)   | 500 µl |
| pH 5,8                           |        |

### 2.5.10. Generierung von KO-Mutanten in *S. cerevisiae*

Die Deletion von Genen in *S. cerevisiae* erfolgte durch Marker-gestützte, homologe Rekombination (Güldener *et al.*, 1996; Güldener *et al.*, 2002). Dafür wurde mittels PCR ein Auxotrophiemarker mit Überhängen, die komplementär zu dem zu deletierenden Gen sind, generiert (Abbildung 2.1). Für eine vollständige und erfolgreiche Deletion wurden jeweils der Anfang und das Ende des Gens von den Überhängen abgedeckt und hatten mindestens eine Länge von 35 bp. Als *template* für die PCR dienten die Plasmide pUG72 (URA3) oder pUG73 (LEU2). Das PCR-Produkt wurde in Hefe transformiert und konnte auf die Auxotrophie des eingebrachten Markers selektiert werden.

Für die Deletion mehrerer Gene und die Wiederverwendung des Markers enthielt die, in Hefe eingebrachte, Kasette zusätzlich zwei *loxP*-Stellen. Diese werden von der Cre-Rekombinase erkannt. Durch Rekombination kommt es zur Deletion der Sequenz zwischen den beiden *loxP*-Stellen und es verbleibt eine *loxP*-Sequenz an der Stelle, an welcher zuvor das zu deletierende Gen war. Das Plasmid pSH62-Cre, welches eine Cre-Rekombinase kodierende Sequenz unter der Kontrolle des GAL1-Promotors enthielt, wurde dafür in die Hefemutanten eingebracht. Durch die Kultivierung in Galaktose-haltigem Medium wurde die Rekombinase exprimiert. Eine erfolgreiche Entfernung des Markers wurde durch den Verlust der Auxotrophie und mittels PCR, bei der Primer für die flankierenden Sequenzen des zuvor deletierten Gens verwendet wurden, überprüft. Das Plasmid pSH62-Cre wurde durch die Anzucht von Hefe in nicht-selektivem Medium über mehrere Generationen entfernt.



**Abbildung 2.1. Schema der Marker-vermittelten Gendeletion und nachfolgendem *marker rescue* in Hefe.**

Ein Auxotrophiemarker mit zwei flankierenden *loxP*-Erkennungssequenzen diente als Vorlage für die Amplifikation der Deletionskassette mittels PCR. Die verwendeten Primer wiesen dabei eine zusätzliche Sequenzen von ca. 45 bp am 5'-Ende auf, die homolog zu den flankierenden Sequenzen des zu deletierenden Gens waren. Nach der Transformation des PCR-Produktes in Hefe wurden die Transformanten auf den eingebrachten Marker selektiert und die erfolgreiche Integration mittels PCR nachgewiesen. Dafür wurden verschiedene Kombinationen von Primern verwendet: Primer, die in den flankierenden Sequenzen des Zielgens lagen (A, D) wurden zusammen mit Primern, die komplementär zu der Deletionskassette (C-B, C-C) oder zu dem Zielgen (B, C) waren, verwendet. War der Größenunterschied zwischen Marker und Zielgen ausreichend, wurde lediglich das PCR-Produkt der Primer A und D als Nachweis verwendet. Das Einbringen und die Galaktose-induzierten Expression der Cre-Rekombinase resultierten in dem Entfernen der Markerkassette. Es verblieb eine *loxP*-Stelle am Lokus des Zielgens.

(modifiziert nach Güldener *et al.*, A second set of *loxP* marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast, 2002, 30, 6, figure 1, by permission of Oxford University Press)

#### 2.5.11. Polyacrylamidgelelektrophorese und *western blot*

Die Auftrennung von Proteinen nach ihrer Masse kann mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) erfolgen (Laemmli, 1970). SDS bindet an die Proteine, solubilisiert sie und überdeckt ihre Eigenladung. Sollen spezifische Proteine detektiert und quantifiziert werden, werden, nach der Übertragung der Proteine von dem Gel auf eine Membran, diese mittels Antikörper nachgewiesen. Wurde das zu untersuchende Protein als Fusionsprotein

mit einem *tag* exprimiert, kann anstatt einem spezifischen Antikörper einer verwendet werden, der das *tag* detektiert. Für den Nachweis von pflanzlichen GSTs in Hefe wurden diese als Fusionsproteine mit GFP (im Vektor pGREG563) exprimiert und mit einem Anti-GFP-Antikörper detektiert.

### 2.5.11.1. Probenaufbereitung

Die GFP:GST-Fusionsproteine standen unter der Kontrolle des GAL1-Promotors. Die Expression der Proteine in Hefe wurde in Galaktose-haltigem SD-Medium induziert, als Kontrolle dienten Proben die in SD-Medium mit Saccharose kultiviert wurden. Die Belastung mit ATZ, Ernte der Zellen und Metabolixtraktion erfolgte analog zu den GST-exprimierenden Hefeproben und ist Punkt 2.5.13 zu entnehmen. Das Pellet, welches nach der Metabolixtraktion Zellreste und Proteine enthielt, wurde bei 90 °C für 5 min getrocknet, um mögliche Methanolreste zu entfernen. Anschließend wurde es in 600 µl SDS-Probenpuffer aufgenommen und für 10 min bei 95 °C aufgeköcht. 5 µl des Überstandes wurden in der SDS-PAGE eingesetzt.

---

| <b>6x SDS-Ladepuffer</b> |        |
|--------------------------|--------|
| Tris-HCl, pH 6,8         | 375 mM |
| Dithiothreitol           | 500 mM |
| SDS (w/v)                | 1 %    |
| Glycerin (v/v)           | 50 %   |
| Bromphenolblau (w/v)     | 1 %    |

### 2.5.11.2. SDS-PAGE

Für die SDS-PAGE wurde das Mini-PROTEAN® Tetra Cell-System genutzt. Die Auftrennung der Hefeproteine erfolgte in Gelen mit 15 %igem Trenngel und vierprozentigem Sammelgel. Als Größenstandard wurden 5 µl PageRuler™ Prestained Protein Ladder (Thermo Fisher) verwendet. Die Proteine wurden bei 200 V und 120 mA für 1 h aufgetrennt.

---

| <b>Trenngel (15 %)</b>                  |        | <b>Sammelgel (4 %)</b>                  |        |
|---|--------|---|--------|
| Tris-HCl, pH 8,8                        | 375 mM | Tris-HCl, pH 6,8                        | 120 mM |
| 10 % SDS (w/v)                          | 0,2 %  | 10 % SDS (w/v)                          | 1 %    |
| 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid (w/v) | 50 %   | 30 % Acrylamid/0,8 % Bisacrylamid (w/v) | 13 %   |
| 10 % Ammoniumpersulfat (w/v)            | 1 %    | 10 % Ammoniumpersulfat (w/v)            | 1 %    |
| Tetramethylethyldiamin                  | 0,1 %  | Tetramethylethyldiamin                  | 0,2 %  |

**10x SDS-Laufpuffer**

|        |        |
|--------|--------|
| Tris   | 30,2 g |
| Glycin | 188 g  |
| SDS    | 10 g   |

2.5.11.3. *western blot*

Die Übertragung der Proteine auf eine Membran erfolgte mittels *semidry western blot*. Dafür wurde das Sammelgel von der SDS-PAGE entfernt und das Trenngel auf eine Nitrozellulose-Membran (0,45 µm Porengröße, Satorius Stedim Biotech, Göttingen) gelegt. Dieser Aufbau wurde zwischen zwei Stapel angefeuchtetes Whatman-Papier gelegt und die Proteine durch das Anlegen eines elektrischen Feldes (25 V, 240 mA) für 1 h auf die Membran übertragen. Der erfolgreiche Übertrag wurde durch Ponceau-Färbung der Membran überprüft.

| <b>Blotpuffer</b> |        | <b>Ponceau-Färbung</b> |       |
|-------------------|--------|------------------------|-------|
| Methanol (v/v)    | 10 %   | Ponceau S (w/v)        | 0,1 % |
| Trid              | 25 mM  | Essigsäure (v/v)       | 5 %   |
| Glycin            | 192 mM |                        |       |

## 2.5.11.4. Antikörper-Nachweis

Für den Antikörper-Nachweis der GFP-Fusionsproteine wurde die Membran zunächst in einer Milchpulver-Lösung (2 g Milchpulver/50 ml TBS) für mind. 1 h bei 4 °C geblockt. Anschließend wurde die Membran drei Mal für jeweils 15 min bei RT mit TBS-T gewaschen und mit dem ersten Antikörper (Anti-GFP mouse, Santa Cruz Biotechnology, 1:1000 verdünnt) für 1 h bei RT inkubiert. Nach erneutem, dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran mit dem zweiten Antikörper (Goat-Anti-Mouse HRP conjugate, Pierce™, 1:10000 verdünnt in TBS) für 1 h bei RT behandelt. Die anschließende Detektion der Meerrettich-Peroxidase-Aktivität erfolgte nachdem die Membran drei Mal mit TBS-T gewaschen wurde. Die Aktivität der Meerrettich-Peroxidase wurde anhand der Chemiluminiszenz mittels SuperSignal™ West Femto Maximum Sensitivity Substrate-Kit (Thermo Fisher) durch eine CCD-Kamera (ImageQuant LAS4000 mini, GE Healthcare, Freiburg) nachgewiesen.

| <b>TBS-T</b>        |        | <b>TBS</b>       |        |
|---------------------|--------|------------------|--------|
| Tris-HCl, pH 7,4    | 50 mM  | Tris-HCl, pH 7,4 | 50 mM  |
| NaCl                | 150 mM | NaCl             | 150 mM |
| 20 % Tween-20 (v/v) | 0,05 % |                  |        |

### 2.5.12. GST-Extraktion aus *S. cerevisiae* und Aktivitätsnachweis

Für den Nachweis der GST-Aktivität *in vitro* wurden die Enzyme in Hefe exprimiert und isoliert. Dafür wurden Hefekulturen in SD-Medium mit 2 % Galaktose üN bei 30 °C und 200 rpm angezogen und durch Zentrifugation pelletiert. Das Pellet wurde zwei Mal mit MQ-H<sub>2</sub>O gewaschen und in 2,5 ml Puffer A resuspendiert. Nach einer Inkubation bei 30 °C und 200 rpm für 10 min wurden die Zellen erneut bei 2500 g und 4 °C für 5 min zentrifugiert. Das Pellet wurde zwei Mal mit Puffer B gewaschen und in 1,5 ml Puffer B mit Lyticase (4 mg Lyticase/1,5 ml Puffer B) gelöst und für 1 h bei 30 °C inkubiert. Nach der Zugabe von 10 ml Puffer B wurde das Gemisch bei 1000 g und 10 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1,5 ml KP-Puffer gelöst und die Zellen mit einer Ultraschallsonde (5 Impulse, 70 %) für 20 s aufgeschlossen. Der Überstand wurde nach Zentrifugation (15000 g, 10 min, 4 °C) in ein neues Reaktionsgefäß überführt und über Säulen (illustra™ NAP™-25 Säulen, GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers entsalzt. Die Proben wurden in 2,5 ml KP-Puffer (100 mM, pH 6) eluiert und für Konzentrationsbestimmung und GST-Aktivitätsnachweise verwendet.

Die Bestimmung der Konzentration der isolierten Hefeproteine erfolgte nach Bradford (Bradford, 1976). Die Proben wurden 1:10 verdünnt und 5 µl Probe mit 795 µl MQ-H<sub>2</sub>O und 200 µl Bradford-Lösung (BioRad) gemischt. Die Detektion erfolgte im Photometer bei 595 nm. Zur Ermittlung der Konzentration wurde zudem eine Standardkurve mit Bovinem Serumalbumin (BSA) erstellt.

Für die Bestimmung der GST-Aktivität wurden 100 µg Proteinextrakt mit 5 mM GSH und 1 mM Pestizid (gelöst in DMSO) gemischt und für 2 h bei 30 °C inkubiert. Die Proben wurden 1:1 mit 70 % Methanol, versetzt mit 0,1 % Ameisensäure, gemischt, bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und der Überstand auf mögliche gebildete GSH-Konjugate mittels HPLC hin untersucht. Als Kontrolle dienten Proben ohne Protein.

| Puffer A       |       | Puffer B         |       |
|----------------|-------|------------------|-------|
| Tris-HCl, pH 9 | 100mM | Sorbitol         | 1,2 M |
| DTT            | 10 mM | Tris-HCl, pH 7,2 | 20 mM |

### 2.5.13. Pestizidumsatz von GSTs in *S. cerevisiae*

Um die Aktivität von GSTs aus *Arabidopsis* gegenüber verschiedenen Pestiziden zu untersuchen, wurden diese Enzyme heterolog in Hefe unter der Kontrolle des Galaktose-induzierten Promotors GAL1 exprimiert. Das Plasmid, auf dem die kodierende Sequenz der GST in Hefe eingebracht wurde, war pSH62 (Güldener *et al.*, 2002). In diesem wurde die ursprünglich enthaltene Cre-Rekombinase durch das GST-Gen ersetzt. Der Auxotrophiemarker, der für die Selektion verwendet wurde, war HIS3.

#### 2.5.13.1. Heterologe Expression von GSTs in *S. cerevisiae*

Hefestämme, die die GST trugen, wurden zunächst für 2 d bei 30 °C auf Festmedium kultiviert, um anschließend 8 ml SD-Medium mit 2 % Saccharose als Vorkultur anzupflanzen. Nach der Inkubation in 200 rpm bei 30 °C wurden aus der Vorkultur 15 ml SD-Medium mit 2 % Galactose auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft. Es wurde darauf geachtet, dass in allen Proben die Konzentration von Saccharose bei 0,06 % (v/v) lag. Die Kultivierung in Galaktose-haltigem Medium betrug mindestens vier Stunden bei 30 °C und 200 rpm, um eine ausreichende Induktion des Promotors und Expression der GST zu gewährleisten (Johnston *et al.*, 1994; Romanos *et al.*, 1992).

#### 2.5.13.2. Belastung

Die Belastung erfolgte mit, in DMSO gelösten, Pestiziden. Lösungen waren nicht älter als eine Woche. Die Endkonzentration der Pestizide betrug, wenn nicht im Text anders angegeben, 50 µM und die DMSO-Konzentration einheitlich 0,05 % (v/v). Je nach Pestizid wurden die Zellen für 6-24 h bei 30 °C und 200 rpm inkubiert, genaue Angaben sind dem Text zu entnehmen.

#### 2.5.13.3. Ernte

Vor der Ernte wurde die OD<sub>600</sub> photometrisch bestimmt, die zur Normalisierung der Proben verwendet wurde. Anschließend wurden die Kulturen bei 4500 g und 4 °C für 7 min pelletiert, zwei Mal mit MQ-H<sub>2</sub>O gewaschen, der Überstand restlos entfernt und die Proben bis zur Analyse bei - 80 °C gelagert.

#### 2.5.13.4. Metabolitextraktion

Die Metabolitextraktion aus *S. cerevisiae* erfolgte in 200-500 µl 70 % Methanol mit 0,1 % Ameisensäure. Dafür wurden dem Gemisch Glasperlen (Ø 0,25-0,5 mm) zugegeben und mit 30 Hz für 4 min homogenisiert. Der Überstand wurde zwei Mal bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert und entweder direkt in den Analysen eingesetzt oder bis zur Messung bei - 80 °C gelagert.

#### 2.5.14. Pestizidumsatz in *A. thaliana*

Um die Konjugation von Pestiziden an GSH *in planta* zu untersuchen wurden Keimlinge, die zuvor steril auf ¼ MS-Festmedium angezogen wurden, in Flüssigkultur überführt und für einen kurzen Zeitraum mit einer hohen Pestizid-Konzentration belastet. Nach der Ernte wurden methanolische Extrakte hergestellt und diese mittels HPLC oder ICR-FT/MS analysiert.

### 2.5.14.1. Sterilisation von Samen

Für das Wachstum unter sterilen Bedingungen wurden die Samen, vor der Anzucht auf Medium, zunächst oberflächensterilisiert. Dafür wurde das Saatgut in ein Reaktionsgefäß gefüllt und in 500 µl 80 % Ethanol, 0,1 % Triton X-100 für 20 min bei 600 rpm inkubiert. Nach einer weiteren Inkubation im gleichen Volumen Natriumhypochlorid (3 %, v/v) für 3 min wurden die Samen fünf Mal mit sterilem MQ-H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend auf Festemedium ausgebracht. Nach der Stratifizierung bei 4 °C für 24 h, wurden die Pflanzen bei Dauerlicht (70 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) und 23 °C inkubiert.

### 2.5.14.2. Belastung und Ernte

Keimlinge wurden zunächst 10 d bei 23 °C und Dauerlicht (70 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>) auf ¼ MS-Medium ohne Zucker angezogen. 10-15 Stück wurden in Kolben mit 10 ml ¼ MS-Flüssigmedium ohne Zucker überführt und für weitere 24 h bei 23 °C und Dauerlicht unter konstantem Schütteln (100 rpm) inkubiert. Die Belastung mit 100 µM Pestizid erfolgte bei den Analysen von putativen GST-Substraten für 8 h bzw. für 24 h bei der Belastung mit Chlorotriazin. Nach der Belastung wurden die Keimlinge in einem Büchnertrichter unter Vakuum vom Medium getrennt, mit MQ-H<sub>2</sub>O gewaschen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Bis zu Extraktion wurden die Proben bei – 80 °C gelagert.

### 2.5.14.3. Metabolitextraktion

Für die Extraktion der Metabolite aus *A. thaliana* wurden die Proben unter flüssigem Stickstoff gemörsert und mit 500 µl 70 % Methanol, 0,1 % Ameisensäure gemischt. Das Pflanzenmaterial wurde mittels Ultraschall (80 % Intensität, 20 s) aufgeschlossen, der Überstand durch zweimalige Zentrifugation bei 4 °C und maximaler Geschwindigkeit für 15 min gewonnen und mittels ICR-FT/MS analysiert.

### 2.5.15. Nicht-enzymatische Generierung von GSH-Konjugaten

Die nicht-enzymatische Bildung von GSH-Konjugaten kann durch die Zugabe des basischen Lösungsmittels Triethylamin oder Trimethylamin und der daraus resultierenden Erhöhung des pHs begünstigt werden (Andrews *et al.*, 1997; Edwards und Dixon, 2005; Plaisance und Gronwald, 1999). Im Reaktionsansatz wurde GSH im Überschuss mit Pestizid, gelöst in DMSO, gemischt. Die Zugabe von Trimethylamin führte zu einem pH von 9-10 im Ansatz. Nach einer Inkubation von 24 h bei RT wurden die gebildeten GSH-Konjugate mittels HPLC oder ICR-FT/MS nachgewiesen.

| <b>Reaktionsansatz</b> |      |
|------------------------|------|
| GSH                    | 4 mM |
| Pestizid               | 1 mM |
| Trimethylamin          | 0,6% |
| (33 % in Ethanol, v/v) |      |
| in 50 % Ethanol        |      |

#### 2.5.16. Hochleistungsflüssigkeitschromatographie

Mittels Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (HPLC) wurden GSH-Konjugate von Pestiziden chromatographisch aufgetrennt und quantifiziert. Als stationäre Phase wurde eine C<sub>18</sub>-Säule (Prontosil 120-5-C18; 150 mm x 4 mm, 5 µm, Bischoff Chromatography, Deutschland) verwendet. Bei der mobilen Phase handelte es sich um einen Methanolgradienten. Die Quantifizierung erfolgte anhand einer Standardkurve, die für jede untersuchte Substanz erstellt wurde. Die spezifischen Parameter der Gradienten sind im Folgenden aufgelistet:

|   | Gradient |     |
|---|----------|-----|
|   | min      | % B |
| <b>CDNB</b>   |          |     |
| Laufmittel A: 10 % MeOH, 0,1 % Ameisensäure           | 0'-1'    | 25  |
| Laufmittel B: MeOH                                    | 1'-8'    | 60  |
| Flussrate: 1,5 ml/min                                 | 8'-10'   | 60  |
| Detektion bei 340 nm                                  | 10'-11'  | 80  |
|   | 11'-12'  | 80  |
|   | 12'-14'  | 25  |
|   | 14'-15'  | 25  |
| <b>Benzylisothiocyanat</b>                            |          |     |
| Laufmittel A: 10 % ACN, 20 mM Essigsäure              | 0'-5'    | 0   |
| Laufmittel B: ACN, 20 mM Essigsäure                   | 5'-15'   | 100 |
| Flussrate: 2 ml/min                                   | 15'-20'  | 0   |
| Detektion bei 254 nm                                  |          |     |
| <b>Chlorotriazine</b>                                 |          |     |
| Laufmittel A: MQ-H <sub>2</sub> O, 0,1 % Ameisensäure | 0'-2'    | 35  |
| Laufmittel B: MeOH                                    | 2'-12'   | 50  |
| Flussrate: 1 ml/min                                   | 12'-15'  | 100 |
| Detektion bei 264 nm                                  | 15'-20'  | 100 |
|   | 20'-22'  | 35  |
|   | 22'-25'  | 35  |

**Chloroacetanilide**

|   |         |     |
|---|---------|-----|
| Laufmittel A: MQ-H <sub>2</sub> O, 0,1 % Ameisensäure | 0'-1'   | 35  |
| Laufmittel B: MeOH                                    | 1'-6'   | 50  |
| Flussrate: 1,5 ml/min                                 | 6'-12'  | 100 |
| Detektion bei 220 nm                                  | 12'-14' | 100 |
|   | 14'-15' | 35  |
|   | 15'-17' | 35  |

Unter diesen Bedingungen eluierten die Pestizide und ihre GSH-Konjugate wie folgt:

| Substanz            | Retentionszeit [min] |              |
|---------------------|----------------------|--------------|
|                     | pur                  | GSH-Konjugat |
| CDNB                | 8,47                 | 5,58         |
| Benzylisothiocyanat | 12,15                | 8,58         |
| Atrazin             | 16,15                | 7,75         |
| Terbuthylazin       | 16,96                | 12,25        |
| Sebuthylazin        | 16,87                | 11,01        |
| Propazin            | 16,91                | 11,34        |
| Cyanazin            | 12,20                | 8,59         |
| Simazin             | 13,33                | 4,93         |
| Alachlor            | 11,75                | 9,67         |
| Acetochlor          | 11,63                | 9,60         |
| Propachlor          | 10,13                | 7,18         |
| Butachlor           | 12,93                | 11,43        |
| Dimethachor         | 10,38                | 7,50         |
| Pretilachlor        | 12,59                | 10,96        |
| Metolachlor         | 11,74                | 9,73         |

Die Daten wurden mit der Software Chromeleon (Version 6.50) verarbeitet und ausgewertet.

2.5.17. Ionenzyklotronresonanz-Fouriertransformations-Massenspektrometrie

Massenspektrometrisch wurden GSH-Konjugate und ihre Metabolite in Hefe, in Arabidopsis und *in vitro* mittels Ionenzyklotronresonanz-Fouriertransformations-Massenspektrometrie (ICR-FT/MS) nachgewiesen. Zellextrakte wurden, wenn nicht anders angegeben, zehnfach in 70 % Methanol (v/v) verdünnt und mit 250 Scans gemessen. Die Reaktionsansätze der nicht-enzymatischen *in vitro*-Synthese von GSH-Konjugaten wurde 1:1000 in 70 % Methanol (v/v) verdünnt und mit 50 Scans analysiert. In allen Fällen wurden die Proben mit einem Fluss von 120 µl/h in eine negative Elektrospray-Ionisation (ESI)-Quelle geleitet und die Ionen in einem Massenbereich von 123-1000 m/z und einer Akkumulationszeit von 0,3 s analysiert. Die externe Kalibrierung des Systems erfolgte mit Arginin (5-10 ppm). Die Bearbeitung der Massenspektren und ihr Export erfolgten mit der Software DataAnalysis (Version 4.0, Bruker Daltonics, Bremen, Deutschland). Jedes

Massenspektrum wurde intern anhand einer Referenzliste von Fettsäuren auf eine Abweichung  $< 0,03$  ppm kalibriert. Das *signal-to-noise*-Verhältnis wurde auf 4 festgelegt und die Massen mit 5 Dezimalstellen dargestellt.

#### 2.5.18. Identifizierung von schwefelhaltigen Massen

Um schwefelhaltige Komponenten in Hefe zu identifizieren, wurde Hefe entweder in schwefelfreiem Medium, supplementiert mit  $^{32}\text{SO}_4^{2-}$  oder  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ , angezogen und die extrahierten Metabolite mittels ICR-FT/MS analysiert.

Schwefelmassen wiesen in den  $^{34}\text{S}$ -markierten Proben eine Masseänderung von 1,99579 u pro Schwefelatom im Vergleich zu  $^{32}\text{S}$ -markierten Proben auf. Mittels Excel (Microsoft Office 2013) wurden die putativen  $^{34}\text{S}$ -Massen der gemessenen  $^{32}\text{S}$ -Proben berechnet und mit den Massen der gemessenen  $^{34}\text{S}$ -Proben im Rahmen von 2 ppm Abweichung verglichen. Visuell wurden die Intensitäten der ausgewählten Massen in den Spektren untersucht. Ein Kriterium war die vergleichbare Intensität der  $^{32}\text{S}$ -Masse in der  $^{32}\text{S}$ -Probe und der entsprechende  $^{34}\text{S}$ -Masse in der  $^{34}\text{S}$ -Probe. Zudem sollte die Intensität der  $^{34}\text{S}$ -Masse in der  $^{32}\text{S}$ -Probe 4 % betragen. Dies konnte bei Massen mit einer geringen Intensität, deren  $^{34}\text{S}$ -Masse damit unter dem Detektionslimit in der  $^{32}\text{S}$ -Probe lagen, nicht überprüft werden.

Ausgehend von dem Markierungsmuster der Schwefelmassen in den beiden Proben, konnten spezifische Massen auch anhand einer Clusteranalyse identifiziert werden. Um mehrerer Proben miteinander zu vergleichen wurde zunächst mit dem Matrix Generator (Frommberger, Biogeochemie, Helmholtz Zentrum München) eine Matrix mit einer Toleranz von 1 ppm erstellt. Mittels einer hierarchischen Clusteranalyse, verwendet wurde die Software Hierarchical Clustering Explorer (Version 3.0, Human Computer Interaction Lab, University of Maryland, USA), wurden die Massen geordnet. Dabei wurde die Ähnlichkeit der Variablen durch den Euklidischen Abstand und die Gruppierung in ein Cluster über die UPGMA-Methode (*unweighted pair-group method using arithmetic averages*) bestimmt. Massen, die spezifisch für  $^{32}\text{S}$ - oder  $^{34}\text{S}$ -Proben waren, wurden anhand eines vorgegebenen Profils selektiert. Dabei wurde der Abstand der Variablen zu dem vorgegebenen Profil anhand des Pearson-Korrelationskoeffizienten bestimmt. Massen, die im Rahmen der vorgegebenen Bedingungen ( $\geq 0.95$ ) dem Profil entsprachen, wurden als spezifisch identifiziert.

Eine andere Möglichkeit bietet der Vergleich von  $^{32}\text{S}$ -Proben mit Proben, die auf Medium mit gleichem Anteil  $^{32}\text{S}$  und  $^{34}\text{S}$  wuchsen und somit eine 50 %-Markierung aufweisen (Gläser *et al.*, 2014). Mit einer Abweichung von 1 ppm wurden Massen der  $^{32}\text{S}$ - und  $^{32/34}\text{S}$ -Proben miteinander verglichen und solche selektiert, deren Intensität in der  $^{32/34}\text{S}$ -Probe geringer war als in der  $^{32}\text{S}$ -Probe. Ausgehend von diesen Massen wurden die putativen Massen der  $^{34}\text{S}$ -Isotope, für ein bis drei

Schwefel (1,99579 u/S), berechnet. Nach der Identifizierung der putativen  $^{34}\text{S}$ -Massen im Spektrum wurden die Intensitäten dieser Massen in der  $^{32}\text{S}$ - und  $^{32/34}\text{S}$ -Probe verglichen.  $^{34}\text{S}$ -Isotope von schwefelhaltigen Massen hatten in der  $^{32/34}\text{S}$ -Probe eine höhere Intensität als in der  $^{32}\text{S}$ -Probe.

### 2.5.19. Identifizierung von GSH-Konjugaten

Um GSH-Konjugate von Pestiziden zu identifizieren wurden für die jeweilige Inkubation mit dem Pestizid spezifische schwefelhaltige Massen identifiziert. In Hefe wurde dabei eine vollständige Markierung mit  $^{32}\text{S}$  oder  $^{34}\text{S}$  durchgeführt, während für den Nachweis in Arabidopsis oder in nicht-enzymatisch generierten Proben die natürliche Abundanz des  $^{34}\text{S}$ -Isotops, die 4 % betrug, genutzt wurde. In allen Fällen wurde zunächst eine Matrix der gemessenen Proben mit einer Abweichung von 1 ppm mittels Matrix Generator (Frommberger, Biogeochemie, Helmholtz Zentrum München) gebildet. In der nachfolgenden hierarchischen Clusteranalyse (Hierarchical Clustering Explorer, Version 3.0, Human Computer Interaction Lab, University of Maryland, USA) wurde ein Profil vorgegeben, welches Massen, die eine hohe Intensität bei einem bestimmten Pestizid im Vergleich zu den anderen gemessenen Proben aufwiesen, selektierte. Die Grenzen für die Übereinstimmung mit dem vorgegebenen Profil wurden dabei auf  $\geq 0,95$  gesetzt. Für Proben, die in Hefe generiert wurden, wurde dies nur für  $^{32}\text{S}$ -markierte Proben durchgeführt. Für alle selektierten  $^{32}\text{S}$ -Massen wurden die putativen  $^{34}\text{S}$ -Massen berechnet ( $m/z + 1,99579$  u) und Massen mit einer  $m/z$  kleiner als 306 aussortiert. Die putativen  $^{34}\text{S}$ -Massen wurden bei Proben, die von Arabidopsis oder *in vitro*-Reaktionen stammen, mit den gemessenen Werten verglichen. Bei Hefeproben wurden die putativen, selektierten  $^{34}\text{S}$ -Massen mit den gemessenen Massen der  $^{34}\text{S}$ -Probe verglichen. Dafür wurde ein Rahmen von 5 ppm für die Übereinstimmung zweier Massen vorgegeben.  $^{32}\text{S}$ -Massen wurden den entsprechenden  $^{34}\text{S}$ -Massen zugeordnet und die Intensitäten miteinander verglichen. Wurde die natürliche Abundanz des  $^{34}\text{S}$ -Isotops betrachtet, sollten die Intensität der  $^{34}\text{S}$ -Massen 4 % der Intensität der  $^{32}\text{S}$ -Masse betragen. Bei der Markierung in Hefe sollten  $^{32}\text{S}$ - und  $^{34}\text{S}$ -Masse eine vergleichbare Intensität aufweisen. Diesen, als schwefelhaltig identifizierten, Massen wurde anschließend eine oder mehrere Summenformel mittels Formulae 1.2 Megapeak (Frommberger, Biogeochemie, Helmholtz Zentrum München) zugewiesen. Als Bedingungen wurde eine Summenformel mit der Komposition  $\text{C}_{10-80}\text{H}_n\text{N}_{3-20}\text{O}_{6-50}\text{P}_{0-10}\text{S}_{1-5}\text{Cl}_{0-5}\text{Br}_{0-3}\text{F}_{0-3}$  innerhalb eines Rahmens von 0,5 ppm festgelegt, wodurch mindestens ein GSH-Molekül vorausgesetzt wurde. Die Summenformeln wurden auf ihre Plausibilität anhand der Vorgaben von Kind und Fiehn hin untersucht (Kind und Fiehn, 2007). Ein Abgleich der erhaltenen Formeln mit den zuvor eingesetzten Pestiziden grenzte mögliche Kandidaten weiter ein.

### 2.5.20. Physiologische Analysen von *A. thaliana*

Der Einfluss von Pestiziden auf das Wachstum und die Entwicklung von *Arabidopsis* wurde analysiert, indem sterile Samen auf  $\frac{1}{4}$  MS-Festmedium, welches mit Pestiziden versetzt war, ausgebracht und inkubiert wurden. Chlorotriazine inhibierten die Photosynthese und führten zum Ausbleichen der Keimlinge. Der Einfluss dieser Herbizidklasse wurde genauer untersucht, indem die Schädigung des Photosyntheseapparates durch das Herbizid mittels Bestimmung der maximalen Quantenausbeute festgestellt wurde. Im Gegensatz zu Chlorotriazinen inhibierten Chloroacetanilide die Synthese von langkettigen Fettsäuren, was in einem reduzierten Wachstum resultierte. Die Länge der Wurzel schien ein geeigneter Parameter zu sein, um die Auswirkungen von Chloroacetaniliden auf das Wachstum der Pflanzen quantifizieren zu können.

#### 2.5.20.1. Chlorophyllfluoreszenz-Messungen

Sterile Samen verschiedener *Arabidopsis*-Linien wurden auf  $\frac{1}{4}$  MS-Festmedium, versetzt mit verschiedenen Konzentrationen ATZ oder TBZ, ausgebracht und, nach 24stündiger Stratifikation bei 4 °C, 11 d unter Langtagbedingungen angezogen. Für die Messung der maximalen Quantenausbeute wurde die Grundfluoreszenz  $F_0$  und die maximale Fluoreszenz  $F_m$  mit der Imaging-PAM M MAXI Version (Heinz Walz GmbH, Effeltrich, Deutschland) bestimmt. Die Keimlinge auf der Platte wurden 20 min im Dunkeln inkubiert und anschließend die Chlorophyllfluoreszenz für 10 min gemessen. Die Messung der Grundfluoreszenz erfolgte bei einer Lichtintensität von  $80 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , alle 60 s wurde die maximale Fluoreszenz durch einen sättigenden Lichtimpuls gemessen. Die Parameter *light intensity* und *frequency* waren dabei auf den Wert 2 gesetzt, *gain* und *damping* betragen auch den Wert 2. Mit der Software ImagingWin (Version v2.41a, Hein Walz GmbH) wurden, wenn möglich, pro Keimling zwei Messpunkte auf zwei verschiedenen Blättern gesetzt und die Chlorophyllfluoreszenz innerhalb dieser Messpunkte bestimmt. Der threshold für die Fluoreszenz-Pixel lag bei 0,04, Werte, die kleiner waren, wurden als schwarze Pixel dargestellt. Die Berechnung der maximalen Quantenausbeute ergab sich aus der Formel  $(F_m - F_0)/F_m$  (Maxwell und Johnson, 2000).

#### 2.5.20.2. Wurzelwachstum

Um das Ausmaß der Chloroacetanilid-vermittelten Inhibierung auf das Wurzelwachstum von Col-0 und darauf basierenden Linien zu analysieren, wurden sterile Samen auf Platten mit  $\frac{1}{4}$  MS-Festmedium ohne Zucker und mit verschiedenen Konzentrationen eines Chloroacetanilid-Herbizids ausgebracht, für 24 h bei 4 °C stratifiziert und anschließend für 8 d bei Dauerlicht ( $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) inkubiert. Dabei wurden die Platten senkrecht gelagert, sodass die Wurzel auf der Medium-

Oberfläche entlang wuchs. Nach 8 d wurde das Wachstum der Keimlinge fotografisch dokumentiert und die Wurzellänge mit der Software ImageJ (Version 1.44, National Institutes of Health, USA) bestimmt.

## 2.6. Bioinformatische Programme, Internetressourcen und Datenbanken

### 2.6.1. Datenbanken für DNA- und Proteinsequenzen und Kristallstrukturen

NCBI - National Center for Biotechnology Information

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

UniProt

<http://www.uniprot.org/>

TAIR - The Arabidopsis Information Resource

<https://www.arabidopsis.org/>

ePlant

<http://bar.utoronto.ca/eplant/>

MaizeGDB – Maize Genetics And Genomics Database

<http://www.maizegdb.org/>

SGD - *Saccharomyces* Genome Database

<http://www.yeastgenome.org/>

RCSB PDB – Protein Data Bank

<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>

### 2.6.2. Datenbanken für Expressionanalysen

eFP Browser

<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>

GENEVESTIGATOR®

<https://genevestigator.com/gv/>

2.6.3. T-DNA-Insertionslinien

NASC - European Arabidopsis Stock Centre

<http://arabidopsis.info/>

GABI-KAT

<https://www.gabi-kat.de/>

2.6.4. Analyse von DNA- und Proteinsequenzen

Gentle, v1.9.4

<http://gentle.magnusmanske.de/>

ClustalOmega

<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>

2.6.5. Primer-Design

Primer3plus

<http://www.bioinformatics.nl/cgi-bin/primer3plus/primer3plus.cgi>

OligoAnalyzer 3.1 - Integrated DNA Technologies

<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>

T-DNA-Primer

<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>

2.6.6. Darstellung von Stammbäumen

FigTree, v1.4.0

<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>

2.6.7. Vorhersage und Visualisierung von Protein-3D-Strukturen

Phyre2 - Protein Fold Recognition Server

<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>

PyMOL, v1.3

<https://www.pymol.org/>

2.6.8. Annotation und Analyse von MS-Daten

Metlin

<https://metlin.scripps.edu/index.php>

PubChem

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>

HCE - Hierarchical Clustering Explorer, v3.0

<http://www.cs.umd.edu/hcil/hce/>

Seven Golden Rules

[http://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/Seven\\_Golden\\_Rules/](http://fiehnlab.ucdavis.edu/projects/Seven_Golden_Rules/)

2.6.9. Berechnung von monoisotopen Massen

MoIE - Molecular Mass Calculator v2.02

<http://mods.rna.albany.edu/masspec/MoIE>

2.6.10. Darstellung von Strukturformeln

MarvinSketch, v6.0.4

<https://www.chemaxon.com/download/marvin-suite/#mbeans>

### 3. Ergebnisse

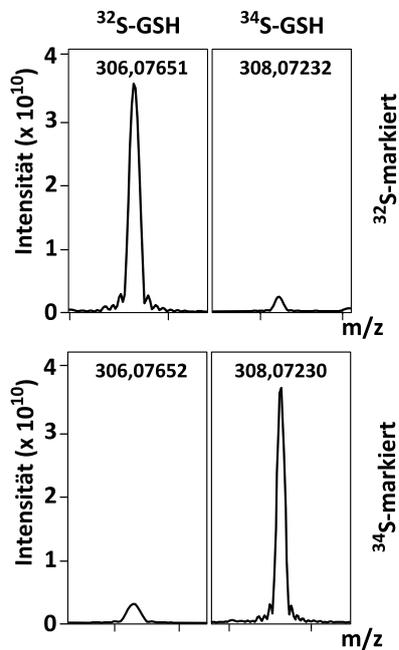
#### 3.1. Detektion schwefelhaltiger Metabolite in *S. cerevisiae*

Die Massenspektrometrie (MS) ermöglicht einen umfassenden Einblick in das Metabolom einer Zelle oder eines Organismus und kann im Gegensatz zur Kernspinresonanzspektroskopie (NMR) auch gering konzentrierte Metabolite detektieren. Die Ionenzyklotronresonanz-Fouriertransformations-Massenspektrometrie (ICR-FT/MS) bietet neben hoher Sensitivität auch eine hohe Präzision mit einem Fehler von weniger als 1 ppm und eine Auflösung von mehr als 100000 und kann somit selbst sich in ihrer Masse ähnelnde Moleküle als getrennte Signale darstellen (Dunn, 2008; Kueger *et al.*, 2012). Durch direkte Injektion (DI) der Proben, ohne eine vorherige chromatographische Auftrennung, können viele Proben in kurzer Zeit analysiert werden und tausende von Metaboliten in einer Messung detektiert werden (Villas-Bôas *et al.*, 2005). DI in Kombination mit ICR-FT/MS wurde zum Beispiel verwendet, um Metabolite in der Erdbeere zu annotieren oder das metabolische Profil von Herbizid-belasteter Arabidopsis zu analysieren (Aharoni *et al.*, 2002; Oikawa *et al.*, 2006). Die ICR-FT/MS ermöglichte dabei mit ihrer hohen Präzision Rückschlüsse auf die chemische Zusammensetzung der detektierten Massen (Aharoni *et al.*, 2002). Dies kann durch die Verwendung von stabilen Isotopen weiter unterstützt werden (Giavalisco *et al.*, 2008; Kind und Fiehn, 2006). Die Markierungen mit mehreren stabilen Isotopen gleichzeitig oder parallel bot eine weitere Möglichkeit, um die chemische Formel einer Masse zuverlässig vorherzusagen (Giavalisco *et al.*, 2011; Hegeman *et al.*, 2007). Stabiler isotope  $^{34}\text{S}$ -Schwefel wurde dabei bisher selten verwendet (Chang *et al.*, 2013; Gläser *et al.*, 2014; Mougous *et al.*, 2002). Bei breit angelegten Studien, die möglichst viele Metabolite erfassen und identifizieren wollen, ist eine alleinige Markierung mit Schwefelisotopen nicht von Vorteil. Sollen jedoch spezifisch nur schwefelhaltige Metabolite, oder wie in der vorliegenden Studie GSH-haltige Metabolite betrachtet werden, ist isotoper Schwefel das Mittel der Wahl.

##### 3.1.1. Schwefelfütterung und Markierung schwefelhaltiger Metabolite in Hefe

Die Markierung mit dem schweren Schwefelisotop  $^{34}\text{S}$  ermöglicht die zuverlässige Identifizierung von schwefelhaltigen Komponenten, da sie zu einer Masseänderung von 1,99579 u pro vorhandenem Schwefelatom führt und mittels MS nachgewiesen werden kann (Gläser *et al.*, 2014; Mougous *et al.*, 2002). Hefe, die entweder in Medium mit leichtem oder mit schwerem Schwefel kultiviert wurde, besitzt somit unterschiedlich markierte Schwefelmetabolite, die anhand der

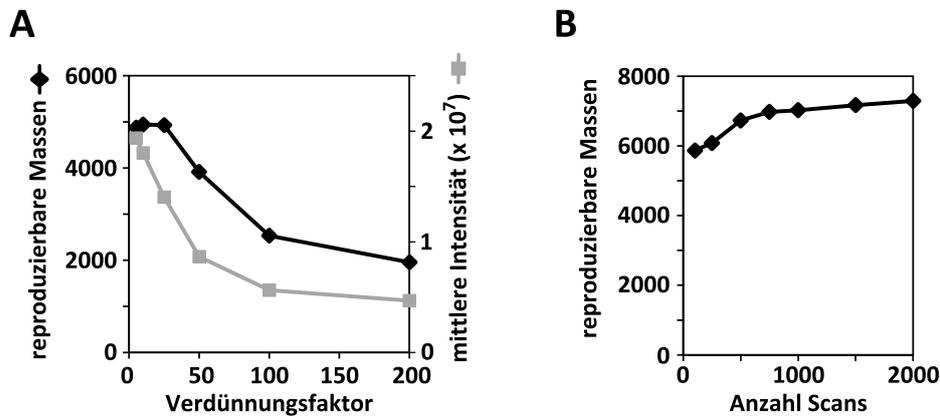
unterschiedlichen Massen beider Proben mittels ICR-FT/MS identifiziert werden können. GSH wurde als hoch abundanter Metabolit in Hefe identifiziert, bei dem in Hefeextrakten, die in  $^{32}\text{S}$ -Medium angezogen wurden, 4 % als  $^{34}\text{S}$ -Isotop vorliegen, was der natürlichen Abundanz von schwerem Schwefel entspricht (Rosman und Taylor, 1998) (Abbildung 3.1).



**Abbildung 3.1**  $^{32}\text{S}$ - und  $^{34}\text{S}$ -Isotope von GSH bei Markierung mit leichtem oder schwerem Schwefel in Hefe. Hefezellen wuchsen entweder in Medium mit  $^{32}\text{SO}_4^{2-}$  oder  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  als einziger Schwefelquelle und die proteinfreien Zellextrakte wurden anschließend mittels ICR-FT/MS analysiert. Anhand von GSH wurde der Einbau des Schwefels in Metabolite der Hefe durch den Massenshift von 1,99579 u und die spezifische Abundanz der Isotope überprüft. Die natürliche Abundanz von  $^{34}\text{S}$ -GSH betrug in der  $^{32}\text{S}$ -markierten Proben 4 %.

Zu Anfang wurden die optimalen Einstellungen für Parameter wie Probenverdünnung und Scananzahl, die Einfluss auf die Qualität des Spektrums und die Anzahl der detektierten Massen haben, ermittelt (Madalinski *et al.*, 2008). Methanolische, proteinfreie Extrakte des Hefe-Wildtyps BY4742 wurden in verschiedenen Verdünnungen in die ICR-FT/MS injiziert und die Qualität des Spektrums anhand der Anzahl der reproduzierbaren Massen und ihrer mittleren Intensität bestimmt (Abbildung 3.2 A). Bis zu einer Verdünnung von 1:25 blieb die Anzahl der reproduzierbaren Massen konstant, nahm mit zunehmender Verdünnung ab und zeigte bei der Verdünnung 1:200 die Hälfte der reproduzierbaren Massen im Vergleich zu der niedrigsten Verdünnung. Auch die mittlere Peakintensität wurde von der Verdünnung der Probe stark beeinflusst. Sie nahm mit zunehmender Verdünnung deutlich ab und war bereits bei einer Verdünnung von 1:50 halbiert im Vergleich zur geringsten Verdünnung 1:5. Ab einer hundertfachen Verdünnung blieb sie auf einem konstant niedrigen Level. Für anschließende Messungen wurde

eine Verdünnung von 1:10 verwendet, da diese die höchste Anzahl an reproduzierbaren Massen und eine hohe mittlere Intensität dieser Massen zuließ.



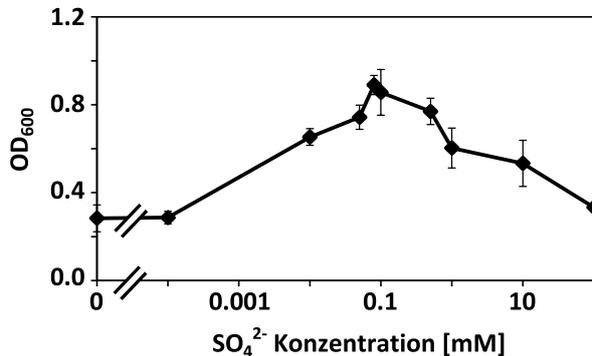
**Abbildung 3.2 Optimierung der ICR-FT/MS-Messung durch Probenverdünnung und Scanzahl.**

Bei der Ermittlung des optimalen Verdünnungsfaktors wurden Extrakte des Wildtyps BY4742 mit 250 Scans gemessen und die Anzahl der reproduzierbaren Massen und ihre mittlere Peakintensität bestimmt (A). Zudem wurden Wildtyp-Proben in einer zehnfachen Verdünnung mit steigender Anzahl von Scans analysiert und die Anzahl der reproduzierbaren Massen ermittelt (B). In beiden Messreihen galt eine Masse als reproduzierbar, wenn sie in drei von sechs Messungen identifiziert werden konnte.

Durch die Akkumulation von Ionen mit der Zeit lassen sich auch schlecht ionisierbare oder in geringer Konzentration vorkommende Substanzen erfassen. Dabei nimmt mit zunehmender Scanzahl die Peakfläche zu, während der Hintergrund konstant bleibt (Qi und O'Connor, 2014). Im Gegensatz zur Verdünnung hatte die Anzahl der Scans einen geringeren Einfluss auf die Detektion reproduzierbarer Massen (Abbildung 3.2 B). Bereits bei 100 Scans konnten 5870 reproduzierbare Massen detektiert werden, dies steigerte sich auf 6731 Massen nach 500 Scans, und blieb, trotz zunehmender Scanzahl, ungefähr auf diesem Level. 500 Scans schienen vollkommen ausreichend zu sein, um eine nahezu maximale Anzahl von Massen zu detektieren. Selbst 250 Scans, was zu einer Halbierung der benötigten Messzeit führte, zeigten ein überzeugendes Ergebnis und sollten für schnelle Screenings von vielen Proben ausreichend sein.

Für die Markierung der Schwefelmetabolite wurde Hefe in synthetischem Minimalmedium ohne schwefelhaltige Komponenten und Zugabe von schwerem  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  angezogen. Die Schwefelkonzentration, bei der ein optimales Wachstum gegeben war, wurde ermittelt indem Hefezellen von Platte in schwefelfreiem Medium resuspendiert und das Medium mit unterschiedlichen Sulfatkonzentrationen supplementiert wurde. Wachstum wurde anhand der  $\text{OD}_{600}$  nach 16 h bestimmt (Abbildung 3.3). Auch in schwefelfreiem Medium wuchs die Hefe bis zu einer  $\text{OD}_{600}$  von 0,3, was auf restlichen Schwefel aus der vorangegangenen Kultivierung oder dem Minimalmedium selbst deutete. Dies Wachstum blieb bis zu einer Konzentration von  $0,1 \mu\text{M SO}_4^{2-}$

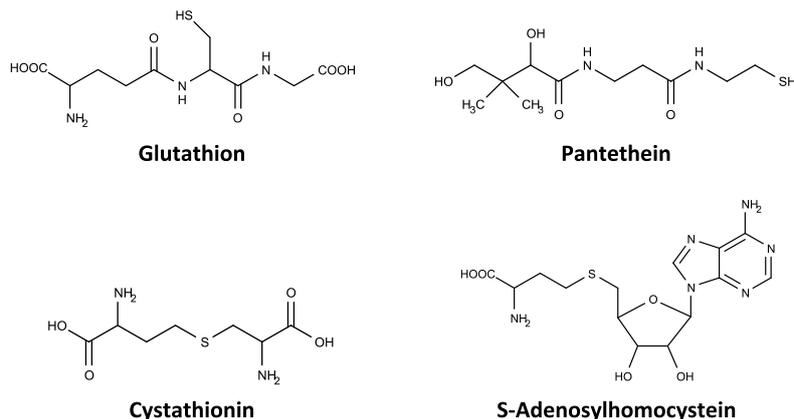
konstant und nahm ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4^{2-}$  zu. Bei 80  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4^{2-}$  war das maximale Wachstum erreicht und nahm mit zunehmender Sulfatkonzentration wieder ab.



**Abbildung 3.3 Hefewachstum in Minimalmedium mit unterschiedlichen Sulfatkonzentrationen.**

Wildtyp BY4742 wurde von Platte in schwefelfreiem Minimalmedium gelöst und in Minimalmedium mit verschiedenen Konzentrationen  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  und 2 % Saccharose auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,03 inokuliert. Jeweils drei Kulturen wurden 16 h bei 200 rpm inkubiert und anschließend das Wachstum anhand der  $\text{OD}_{600}$  bestimmt.

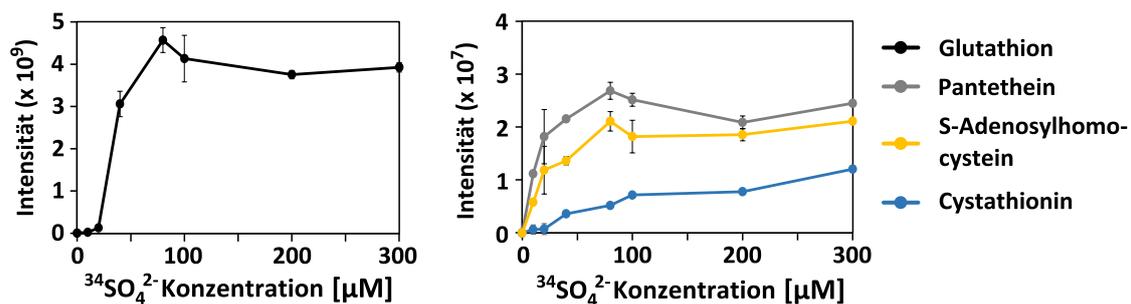
Die Effizienz der Markierung mit schwerem Schwefel wurde mittels ICR-FT/MS ermittelt. Dafür wurden die Massen von vier schwefelhaltigen Metaboliten, die prominente Peaks im Spektrum der Hefe darstellen, genauer analysiert. Es handelte sich um die Ionen von GSH, Pantethein, Cystathionin und S-Adenosylhomocystein (Abbildung 3.4). GSH ist eines der am höchsten konzentrierten Metabolite in einer Zelle. Pantethein ist ein Intermediat der Coenzym A-Biosynthese. Cystathionin ist eine Vorstufe des Cysteins und S-Adenosylhomocystein ist das Reaktionsprodukt, nachdem der Methyl-Donor S-Adosylmethionin seine Methylgruppe verloren hat, und kann zu Homocystein regeneriert werden.



**Abbildung 3.4 Strukturformeln von GSH, Pantethein, Cystathionin, S-Adenosylhomocystein.**

Diese vier schwefelhaltigen Metabolite konnten in Hefeextrakten mittels ICR-FT/MS zuverlässig nachgewiesen werden und wurden als Marker für eine erfolgreiche Markierung mit schwerem Schwefel in Hefe ausgewählt.

Für die Inkorporation von schwerem Schwefel in die vier Metabolite, abhängig von der Sulfatkonzentration, wurde Hefe, wie bereits für die Analyse des schwefelabhängigem Wachstums, in Medium mit unterschiedlichen Sulfatkonzentrationen angezogen und die Extrakte mittels ICR-FT/MS analysiert. Wildtyp BY4742 wurde zunächst in Medium mit  $^{32}\text{SO}_4^{2-}$  über Nacht angezogen, mit schwefelfreiem Medium mehrmals gewaschen und dann für das Inokulieren von Medium mit verschiedenen Konzentrationen von schwerem Schwefel verwendet. Nach 20 h Inkubation wurde die Hefe aufgeschlossen und die Extrakte mittels ICR-FT/MS analysiert (Abbildung 3.5). Das schwere Isotop von GSH konnte selbst in Proben, welche in schwefelfreiem Medium kultiviert wurden, nachgewiesen werden, was auf die hohe Konzentration dieses Metaboliten in der Zelle zurückzuführen ist und auf die vorangegangene Kultivierung in schwefelhaltigem Medium. Mit zunehmender  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ -Konzentration nahm auch die Konzentration von  $^{34}\text{S}$ -markiertem GSH in der Kultur zu und erreichte bei  $80\ \mu\text{M}$   $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  einen Maximalwert, der mehr als dem 400fachen der Intensität bei  $0\ \mu\text{M}$   $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  entsprach und auch mit steigender Konzentration nahezu unverändert blieb.



**Abbildung 3.5 Peakintensität ausgewählter  $^{34}\text{S}$ -Metabolite mit zunehmender  $^{34}\text{S}$ -Sulfatkonzentration.**

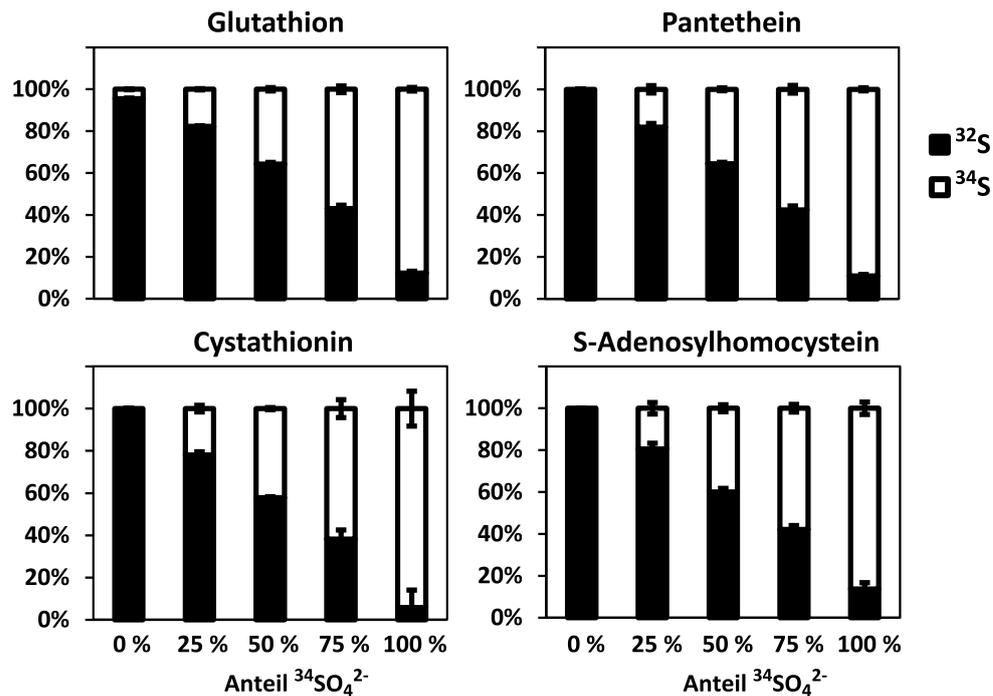
Wildtyp BY4742 wurde in  $^{32}\text{SO}_4^{2-}$ -haltigem Medium vorkultiviert, drei mal mit schwefelfreiem Medium gewaschen und in schwefelfreiem Medium, supplementiert mit unterschiedlichen Konzentrationen von  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ , auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,02 inokuliert. Nach 20 h Inkubation wurde von den verschiedenen Proben die gleiche Menge Hefe geerntet ( $2 \times 10^8$  Zellen), methanolische Extrakte hergestellt und mittels ICR-FT/MS analysiert. Dafür wurden 1:10 Verdünnungen bei 250 Scans gemessen und die Intensität der schweren Isotope von Glutathion, Pantethein, Cystathionin und S-Adenosylhomocystein bestimmt. Betrachtet wurden drei Proben pro Messpunkt.

Die anderen drei untersuchten  $^{34}\text{S}$ -Metabolite, Pantethein, Cystathionin und S-Adenosylhomocystein, konnten bei einer Konzentration von  $0\ \mu\text{M}$   $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  nicht nachgewiesen werden, was an ihrer, im Vergleich zu GSH, deutlich geringeren Abundanz im Spektrum liegt. Bei Pantethein und S-Adenosylhomocystein zeigte sich eine Zunahme der Intensität der  $^{34}\text{S}$ -Massen ab einer Konzentration von  $10\ \mu\text{M}$   $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ , die, wie bei GSH, bei  $80\ \mu\text{M}$   $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  das Maximum erreichte. Die Inkorporation von  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  in Cystathionin war bis zu einer Konzentration von  $20\ \mu\text{M}$   $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  gering und nahm erst ab  $40\ \mu\text{M}$   $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  deutlich zu und stieg bis  $300\ \mu\text{M}$   $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  an. Sowohl das

Hefewachstum als auch die Markierung von schwefelhaltigen Metaboliten ließen den Schluss zu, dass 80  $\mu\text{M}$   $\text{SO}_4^{2-}$  eine optimale Konzentration war, um schwefelhaltige Metabolite in Hefe zu identifizieren.

Die Reinheit des schweren Schwefels und der Einbau von schwerem gegenüber leichtem Schwefel in Metabolite der Hefe sollten analysiert werden, indem Hefekulturen mit unterschiedlichen Anteilen von  $^{32}\text{SO}_4^{2-}$  und  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  versorgt und mittels ICR-FT/MS die Verteilung der korrespondierenden  $^{32}\text{S}$ - und  $^{34}\text{S}$ -Ionen eines Metaboliten ermittelt wurden (Abbildung 3.6). GSH ist so abundant im Spektrum vertreten, dass bei 0 %  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  im Medium 4 % als schweres Isotop detektiert werden konnten, was der natürlichen Abundanz des schweren Schwefels in der Natur entspricht. Die Signale für Pantethein, Cystathionin und S-Adenosylhomocystein waren zu niedrig, sodass die entsprechende natürliche  $^{34}\text{S}$ -Masse in der  $^{32}\text{S}$ -Probe unter dem Detektionslimit lag. Mit zunehmender  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ -Konzentration nahm die Intensität der  $^{34}\text{S}$ -Masse zu und die Intensität des korrespondierenden  $^{32}\text{S}$ -Isotops ab. Das Verhältnis der beiden Massen war jedoch in allen Fällen zugunsten der  $^{32}\text{S}$ -Massen erhöht. Auch wenn ausschließlich  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  im Medium angeboten wurde, wurden bis zu 9 % der entsprechenden  $^{32}\text{S}$ -Masse identifiziert (Abbildung 3.6). Eine mögliche Kontamination des  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  mit  $^{32}\text{SO}_4^{2-}$  konnte ausgeschlossen werden, da das Spektrum von  $\text{Na}_2^{34}\text{SO}_4$  keine entsprechenden leichten Isotope aufwies (nicht gezeigt). Die Detektion der leichten Isotope, trotz ausschließlichen Gebrauch von  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ , könnte auf Kontaminationen mit Schwefel in einer der Komponenten des Mediums zurückgeführt werden. Auch die anfängliche Kultivierung der Hefezellen auf Platten, die nur  $^{32}\text{SO}_4^{2-}$  (und 4 %  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$ ) enthielten, könnte eine Begründung für eine fehlende vollständige Markierung mit schwerem Schwefel sein, auch wenn die Hefe anschließend mehrere Generationen nur in Medium mit  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  wachsen konnte.

Die Anzucht von Hefe in Minimalmedium mit 80  $\mu\text{M}$   $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  ermöglicht die Markierung und anschließende Detektion von schwefelhaltigen Metaboliten mittels ICR-FT/MS und stellte somit eine Grundlage dar, um Schwefelkomponenten im Metabolom der Hefe nachzuweisen.



**Abbildung 3.6 Einbau von leichtem und schwerem Schwefel in ausgewählte Metabolite der Hefe abhängig von der Verfügbarkeit im Medium.**

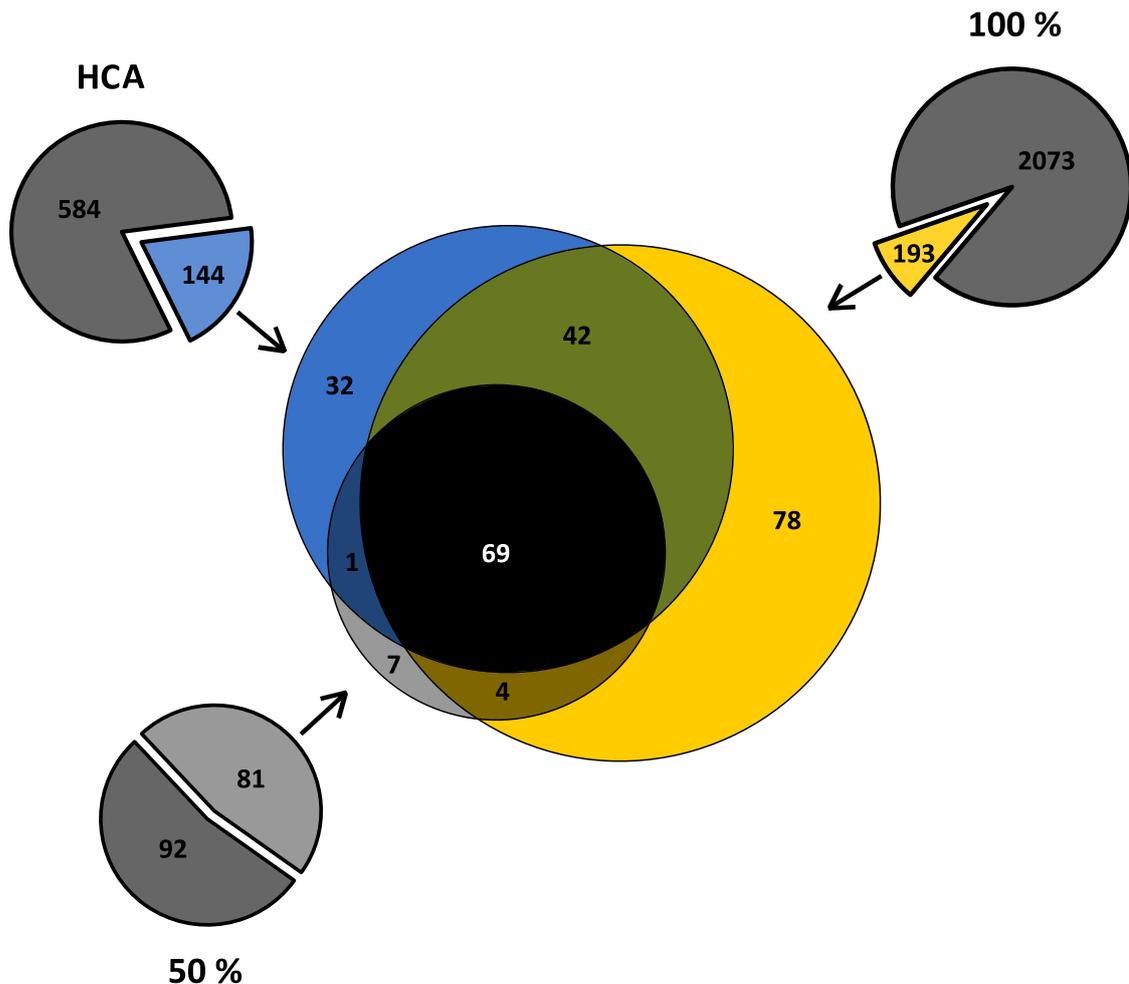
BY4742 wurde in Medium mit gleicher Konzentration  $^{32}\text{SO}_4^{2-}$  und  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  vorinkubiert und anschließend in Medium entweder komplett mit  $^{32}\text{SO}_4^{2-}$ ,  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  oder unterschiedlichen Anteilen der beiden Isotope für 20 h angezogen. Die Endkonzentration entsprach dabei immer  $80 \mu\text{M SO}_4^{2-}$ . Die beiden S-Isotope der schwefelhaltigen Metabolite Glutathion, Pantethein, Cystathionin und S-Adenosylhomocystein wurden in den ICR-FT/MS-Spektren der Proben identifiziert und ihre Intensität ins Verhältnis zueinander gesetzt. Während das  $^{34}\text{S}$ -Isotop von GSH in der  $^{32}\text{S}$ -markierten Proben nachgewiesen wurde, was der natürlichen Abundanz des schweren Schwefels entsprach, lag die Intensität der entsprechenden  $^{34}\text{S}$ -Masse bei 0 %  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  von Pantethein, Cystathionin und S-Adenosylhomocystein unter der Nachweisgrenze. Für die Analysen wurden jeweils drei Extrakte bei 250 Scans und einer 1:10 Verdünnung untersucht.

### 3.1.2. Detektion von Schwefelmassen in *S. cerevisiae* mittels ICR-FT/MS

In früheren Arbeiten wurden schwefelhaltige Metabolite in Hefe ohne die Verwendung von schwerem Schwefel identifiziert (Lafaye *et al.*, 2005; Madalinski *et al.*, 2008; Tanaka *et al.*, 2007). Dies limitierte die Analysen auf bereits annotierte Metabolite. Um unbekannte GSH-Konjugate von Pestiziden spezifisch nachweisen zu können, wurde daher die gezielte Markierung von Schwefelmetaboliten benötigt. Eine Herausforderung war die Selektion der entsprechenden Massen aus den vielen tausend detektierten Metaboliten in einem Spektrum. Für den Nachweis von schwefelhaltigen Massen wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Entweder wurde eine vollständige Markierung der Metabolite mit schwerem Schwefel (100 %) oder eine gleichzeitige Markierung mit schwerem und leichtem Schwefel zu gleichen Teilen (50 %) durchgeführt. Für den ersten Ansatz wurden Kulturen von BY4742 entweder in Medium mit 100 %  $^{32}\text{SO}_4^{2-}$  und parallel mit 100 %  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  angezogen (100 %), sodass die schwefelhaltigen Massen fast

vollständig als  $^{32}\text{S}$ - oder  $^{34}\text{S}$ -Massen vorlagen, vernachlässigt man die natürliche Abundanz des schweren Schwefels in der  $^{32}\text{S}$ -Probe und die oben bereits erwähnte Abweichung in den Proben mit  $^{34}\text{S}$ -Schwefel. Für die  $^{32}\text{S}$ -Probe wurden die putativen  $^{34}\text{S}$ -Schwefelmassen mit einem ( $m/z+1,99579$ ) oder zwei Schwefel ( $m/z+2 \times 1,99579$ ) berechnet und mit den Massen der  $^{34}\text{S}$ -Probe verglichen. Dabei ergaben sich in je zwei unabhängigen Proben zusammen 2266 Übereinstimmungen. Im Spektrum wurden die Peakintensitäten visuell verglichen und resultierten in 193 putative Schwefelmassen, die die Voraussetzungen erfüllten, dass der  $^{34}\text{S}$ -Peak einer Masse in der  $^{34}\text{S}$ -markierten Probe immer größer sein muss als in der  $^{32}\text{S}$ -markierten (Gläser *et al.*, 2014) (Abbildung 3.7). Davon wiesen 77 % eine Intensität von weniger als  $1 \times 10^7$  auf. Die große Diskrepanz zwischen der anfänglich berechneten Anzahl von Schwefelmassen und der tatsächlich verifizierten ließ sich auf den Umstand zurückführen, dass bei der ersten Berechnung die Übereinstimmung mit den Massen der  $^{32}\text{S}$ -Proben als einziges Kriterium für die Identifizierung von putativen Schwefelmassen genutzt wurde. Dies führte zu einer großen Anzahl von falsch positiven Massen, da alle Massen, die dem gesetzten Fehlerrahmen entsprachen, selektiert wurden. Eine hohe Konzentration konnte zudem dazu führen, dass durch die Breite eines Peaks mit sehr hoher Intensität, dieser als mehrere detektiert wurde. Daher blieben nach der weiteren Überprüfung der Massen weniger als 9 % der ursprünglich berechneten übrig.

In der ersten Analyse sollten so wenig Filter wie möglich angelegt werden, um eine möglichst hohe Anzahl Schwefelmassen zu detektieren und eine Idee davon zu bekommen, wie viele Massen Schwefelverbindungen sein könnten. Dadurch sollte die Zahl falsch negativer Ergebnisse möglichst gering gehalten werden. Aufgrund der geringen Effizienz von weniger als 10 % positiv deklarierten Schwefelmassen, war diese Form der Analyse ungeeignet, wenn es darum ging, eine möglichst große Anzahl von Proben zu analysieren. Um die hohe Zahl falsch Positiver zu reduzieren, wurden Analysen mittels hierarchischer Clusteranalyse (HCA), bei der Abundanz und Intensität von Peaks in mehreren Proben verglichen werden, durchgeführt (Seo und Shneiderman, 2004). Mit den bereits manuell analysierten Proben wurde eine Matrix erstellt und versucht die putativen Schwefelmassen mittels HCA zu identifizieren. Die Massen, die in den  $^{32}\text{S}$ -markierten Proben eine höhere Intensität aufwiesen als in den  $^{34}\text{S}$ -markierten Proben und entgegengesetzt, wurden selektiert. Dies resultierte in einer Liste von 728 putativen Schwefelmassen. Von den, auf diese Weise selektierten,  $^{32}\text{S}$ -Massen wurden die putativen  $^{34}\text{S}$ -Massen berechnet und mit den selektierten  $^{34}\text{S}$ -Massen der HCA verglichen. Von den resultierenden 164 Massen wurden nach Überprüfung im Spektrum 144 Massen aufgrund der Isotopenverteilung und der Intensität als Schwefelmasse eingeordnet (Abbildung 3.7).

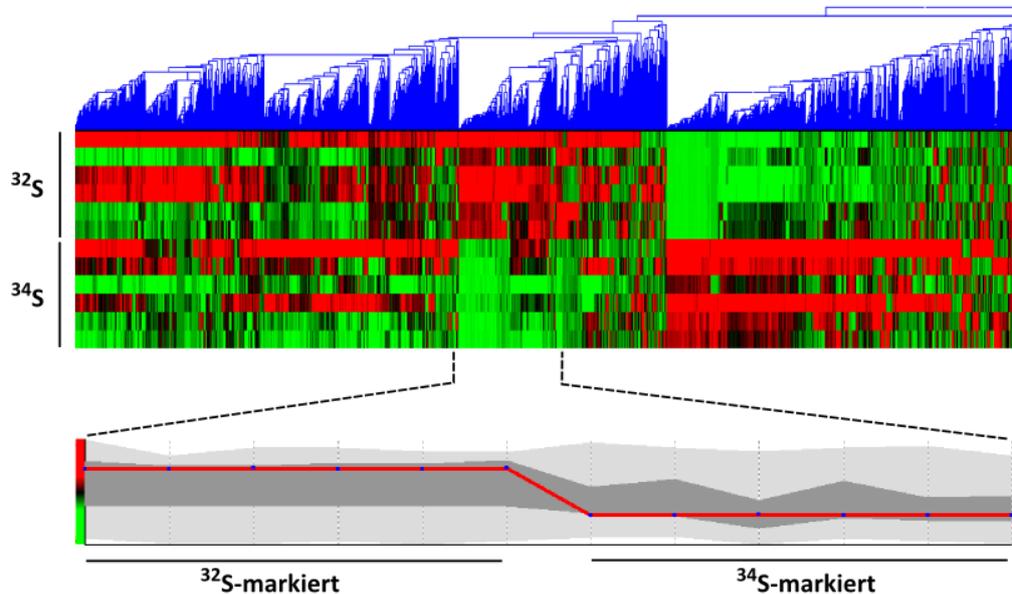


**Abbildung 3.7 Vergleich verschiedener Methoden zum Nachweis von Schwefelmassen in Massenspektren von Hefeextrakten.**

Schwefelmassen aus Hefe wurden vollständig mit  $^{32}\text{SO}_4^{2-}$  oder  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  markiert und die mittels ICR-FT/MS detektierten Massen aufgrund ihrer Änderung von 1,99579 u, die dem Unterschied zwischen  $^{32}\text{S}$  und  $^{34}\text{S}$  entspricht, nachgewiesen (100 %). Nach Abgleich der Intensitäten der einzelnen Peaks wurden von anfangs 2266 Massen, 193 als Schwefelmassen deklariert. Wurden die gemessenen Daten mittels hierarchischer Clusterbildung zusammengefasst und die spezifischen Massen für  $^{32}\text{S}$ - bzw.  $^{34}\text{S}$ -Markierung selektiert, verringerte sich die Zahl der putativen Schwefelmassen auf 728 (HCA). Von diesen konnten 144 durch visuelle Überprüfung im Spektrum als Schwefelmassen detektiert werden. Eine andere Möglichkeit Schwefelmassen nachzuweisen, bestand im Vergleich von Proben, die mit leichtem Schwefel markiert waren, mit Proben, die zu gleichen Teilen mit beiden Isotopen markiert waren (50 %). Dabei konnten 173 putative Schwefelmassen identifiziert werden, von denen nach einer Überprüfung im Spektrum 81 Positive verblieben. Ein Vergleich der Ergebnisse aller drei Nachweismethoden ergab 69 Schwefelmassen, die mit allen drei Methoden detektiert wurden. Besonders bei der vollständigen Markierung mit schwerem Schwefel wurden Massen nachgewiesen, die nur auf diese Weise detektiert werden konnten.

Dies entsprach 20 % der anfangs in der Matrix als putative Schwefelmassen deklarierten Peaks. Mit zunehmender Anzahl der Proben wurde die Effizienz der Identifizierung schwefelhaltiger Massen mittels HCA erhöht, da die zunehmende Stringenz die Anzahl der falsch positiven Massen verringerte. Wurden anstatt vier insgesamt zwölf Proben mittels HCA analysiert, konnten nach der

Berechnung der möglichen schweren Schwefelmassen und einem Abgleich im Spektrum 138 von 238 als positiv verifiziert werden (Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.8 Identifizierung von schwefelhaltigen Massen mittels HCA.**

Jeweils sechs Hefekulturen wurden entweder in Medium mit  $^{32}\text{SO}_4^{2-}$  oder  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  angezogen und ihre Extrakte mittels ICR-FT/MS analysiert. Insgesamt 7310 Massen, die in mindestens drei der sechs Proben vorkamen, wurden mit einem Fehler von 1 ppm zu einer Matrix zusammengefasst und mittels HCA analysiert (Seo und Shneiderman, 2004). Um schwefelhaltige Massen zu identifizieren wurde ein Profil vorgelegt, das Massen mit einer hoher Intensität (rot) in den  $^{32}\text{S}$ -markierten Proben und einer gleichzeitigen niedrigen Intensität (grün) in den  $^{34}\text{S}$ -markierten Proben, selektiert.

Ein zweiter Ansatz zur Identifizierung von Schwefelmassen wurde von Gläser und Kollegen in Arabidopsis-Keimlingen etabliert, bei der eine unvollständige Markierung mit schwerem Schwefel genutzt wurde (Gläser *et al.*, 2014). Eine 100 %  $^{32}\text{S}$ -markierte Probe wurde mit einer 50 %  $^{34}\text{S}$ -markierten Probe verglichen, sodass in der  $^{34}\text{S}$ -Probe gleichzeitig die  $^{32}\text{S}$ - und die  $^{34}\text{S}$ -Masse zuverlässig detektiert werden konnten (50 %). Zunächst wurden alle Massen selektiert, die in der  $^{32}\text{S}$ -markierten Probe eine höhere Intensität aufwiesen als in der  $^{34}\text{S}$ -Probe. Von dieser Auswahl wurde die entsprechende  $^{34}\text{S}$ -Masse berechnet und mit den Massen der  $^{34}\text{S}$ -markierten Probe verglichen. Abschließend werden auch hier die Intensitäten der putativen Schwefelmassen in  $^{32}\text{S}$ - und  $^{34}\text{S}$ -markierter Probe verglichen. Diese Berechnung wurde durch ein MatLab-Skript automatisiert. Aus der Berechnung ergaben sich 173 putative Schwefelmassen, von denen sich 81 nach einer Überprüfung im Spektrum als positiv erwiesen. Diese Methode der Berechnung hatte den Vorteil, dass durch die 50 %-Markierung zwei Kriterien für die Überprüfung in der  $^{34}\text{S}$ -Probe generiert werden. Der Vergleich der Intensitäten der  $^{32}\text{S}$ -Massen in beiden Proben ermöglichte eine wesentlich dezidiere Aussage als die Entscheidungsfrage, die eine 100 %-Markierung mit schwerem Schwefel erlaubte, wodurch die Anzahl der falsch positiven Ergebnisse verringert wurde.

Zudem wurden im ersten Schritt direkt schwefelmarkierungsspezifische Massen selektiert, sodass die Gesamtanzahl der miteinander verglichenen Massen geringer war als bei der HCA. Im Vergleich zu der Clusteranalyse konnte auf diese Weise auch mit wenigen Proben die Anzahl falsch positiver Massen niedrig gehalten werden.

Insgesamt konnten 232 putative Schwefelmassen identifiziert werden, von denen 69 mit allen drei Auswertungsmethoden nachgewiesen wurden (Abbildung 3.7). Obwohl der Datensatz 100 %, der zum einen manuell und zum anderen mittels HCA ausgewertet wurde, identisch war, wurden viele Massen nur mit einer der beiden Methoden nachgewiesen. Im Gegensatz dazu konnten mehr als 90 % aller mit 50 %-Markierung identifizierten Massen auch durch die 100 %-Markierung ermittelt werden. Bei der Auswertung mit 100 % oder HCA wurden viele Massen als Schwefelmasse eingeordnet, die eine geringe Intensität aufwiesen. Die Halbierung einer solchen Signalintensität, wie es bei der 50 %-Markierung bei den  $^{34}\text{S}$ -Massen vorlag, führte dazu, dass viele Massen unter die Detektionsgrenze fielen. Obwohl die Auswertung mit 50 % sehr effizient ist, produziert sie neben einem geringen Anteil falsch positiver auch eine hohe Zahl falsch negativer Ergebnisse, wenn dies in Relation zu der vollständigen Markierung von Proben betrachtet wurde. In Hefe konnten 232 schwefelhaltige Massen nachgewiesen werden, was einem Anteil von 3 % aller detektierten Massen entsprach (Anhang Tabelle 6.6). In einer Studie zu den schwefelhaltigen Metaboliten aus *Arabidopsis* wurden 4 % aller detektierten Massen als S-Metabolite eingestuft (Gläser *et al.*, 2014). Von den insgesamt 232 Massen konnten nach Datenbanksuche 31 einem Metaboliten zugeordnet werden (Tabelle 3.1). Dies entspricht einem Wert von 13 %. Prominente Peaks, wie die Signale von GSH, Cystathionin oder  $\gamma$ -Glutamyl-Cystein, konnten mit allen drei Methoden nachgewiesen werden. Schwefelhaltige Metabolite, wie Cystein, Homocystein oder Methionin, die in anderen Studien in Hefe identifiziert werden konnten, wurden aufgrund des gewählten Messrahmens, der bei 150 u begann, wegen ihrer zu geringen Masse nicht detektiert werden (Lafaye *et al.*, 2005; Madalinski *et al.*, 2008). Diese große Diskrepanz zwischen der Anzahl von bekannten und unbekanntem Massen in ungerichteten Analysen wurde schon häufig beobachtet. In *E. coli* konnten lediglich 25 % aller mittels *flow injection-time of flight/MS* detektierten Massen einer annotierten Substanz zugeordnet werden (Fuhrer *et al.*, 2011). In metabolischen Studien in *Arabidopsis* wurden 4908 Massen detektiert, von denen 25 % einer chemischen Formel zugeordnet werden konnten. Davon waren jedoch nur 211 bisher in *Arabidopsis* annotiert (Giavalisco *et al.*, 2011). Um weitere Aussagen über die unbekanntem Massen treffen zu können, hätte die chemische Komposition der Signale aufgrund der präzisen Messung ermittelt oder anhand von  $\text{MS}^n$  die Struktur des zugrunde liegenden Moleküls vorhergesagt werden können (Kind und Fiehn, 2007; Nikolskiy *et al.*, 2013).

**Tabelle 3.1 Annotierte schwefelhaltige Metabolite, identifiziert in Extrakten aus *S. cerevisiae*.**

BY4742 wurde in schwefelfreiem Medium supplementiert mit  $^{32}\text{SO}_4^{2-}$  bzw.  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  oder einer Mischung beider Isotope kultiviert und die Extrakte mittels ICR-FT/MS analysiert. Die Daten wurden unterschiedlich prozessiert und es wurden insgesamt 232 Schwefelmassen identifiziert. Ein Abgleich mit der Metabolitdatenbank METLIN, bei dem ein Fehlerrahmen von 1 ppm vorgegeben war, identifizierte 31 bekannte schwefelhaltige Metabolite.

| $^{32}\text{S}$<br>[m-H] | $^{34}\text{S}$<br>[m-H] | Summenformel  | Abweichung<br>(ppm) | Identifizierung                               |
|--------------------------|--------------------------|---|---------------------|---|
| 177.03392                | 179.02972                | $\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3\text{S}$                 | 0                   | Cysteinyl-Glycin                              |
| 190.05440                | 192.05011                | $\text{C}_7\text{H}_{13}\text{NO}_3\text{S}$                          | 0                   | N-Acetyl-Methionin                            |
| 221.06015                | 223.05594                | $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$                 | 0                   | Cystathionin                                  |
| 235.07579                | 237.07160                | $\text{C}_8\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$                 | 0                   | Methionyl-Serin                               |
| 249.05507                | 251.05086                | $\text{C}_8\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$                 | 0                   | $\gamma$ -Glutamyl-Cystein                    |
| 263.07074                | 265.06650                | $\text{C}_9\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$                 | 0                   | Acetylcystathionin                            |
| 273.03172                | 275.02742                | $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$                 | 0                   | Cystathioninsulfoxid                          |
| 277.08634                | 279.08201                | $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_5\text{S}$              | 0                   | $\gamma$ -Glutamyl-Methionin                  |
| 277.12275                | 279.11855                | $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$              | 0                   | Pantethein                                    |
| 278.12607                | 280.12185                | $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_4\text{S}$              |                     | $^{13}\text{C}$ -Pantethein                   |
| 306.07652                | 308.07232                | $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$              | 0                   | Glutathion                                    |
| 307.07988                | 309.07568                | $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$              |                     | $^{13}\text{C}$ -Glutathion                   |
| 308.08077                | 310.07658                | $\text{C}_{10}\text{H}_{17}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$              |                     | $^{13}\text{C}_2$ -Glutathion                 |
| 320.09223                | 322.08800                | $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$              | 0                   | S-Methyl-Glutathion                           |
| 321.11259                | 323.10833                | $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$              | 0                   | D-Pantothenoyl-Cystein                        |
| 332.09232                | 334.08804                | $\text{C}_{12}\text{H}_{19}\text{N}_3\text{O}_6\text{S}$              | 0                   | Cys-Pro-Asp*                                  |
| 349.02653                | 351.02228                | $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}$              | 0                   | Met-Gly-OH*                                   |
| 350.10275                | 352.09856                | $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$              | 0                   | S-(2-Hydroxyethyl)glutathion                  |
| 351.10607                | 353.10192                | $\text{C}_{12}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$              |                     | $^{13}\text{C}$ -S-(2-Hydroxyethyl)glutathion |
| 357.08909                | 359.08488                | $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_7\text{PS}$             | 0                   | D-Pantethein-4'-phosphat                      |
| 358.09242                | 360.08827                | $\text{C}_{11}\text{H}_{23}\text{N}_2\text{O}_7\text{PS}$             |                     | $^{13}\text{C}$ -D-Pantethein-4'-phosphat     |
| 363.09794                | 365.09380                | $\text{C}_{12}\text{H}_{20}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$              | 0                   | Glu-Cys-Gly-Gly*                              |
| 364.11848                | 366.11421                | $\text{C}_{13}\text{H}_{23}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$              | 0                   | Ser-Met-Glu*                                  |
| 383.11433                | 385.11013                | $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}$              | 0                   | S-Adenosylhomocystein                         |
| 384.11775                | 386.11342                | $\text{C}_{14}\text{H}_{20}\text{N}_6\text{O}_5\text{S}$              |                     | $^{13}\text{C}$ -S-Adenosylhomocystein        |
| 393.10863                | 395.10411                | $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}$              | 0                   | Glu-Cys-Gly-Ser*                              |
| 399.09967                | 401.09548                | $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_8\text{PS}$             | 0                   | S-Acetylphosphopantethein                     |
| 400.10299                | 402.09884                | $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_8\text{PS}$             |                     | $^{13}\text{C}$ -S-Acetylphosphopantethein    |
| 401.10409                | 403.09967                | $\text{C}_{13}\text{H}_{25}\text{N}_2\text{O}_8\text{PS}$             |                     | $^{13}\text{C}_2$ -S-Acetylphosphopantethein  |
| 406.09278                | 408.08825                | $\text{C}_{14}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_5\text{S}$              | 0                   | S-Succinylglutathion                          |
| 407.12421                | 409.12003                | $\text{C}_{14}\text{H}_{24}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}$              | 0                   | Glu-Cys-Gly-Thr*                              |
| 419.16052                | 421.15630                | $\text{C}_{16}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_7\text{S}$              | 0                   | Glu-Cys-Ala-Val*                              |
| 425.08064                | 429.07205                | $\text{C}_{13}\text{H}_{22}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_2$            | 0                   | Glu-Cys-Gly-Cys*                              |
| 479.14541                | 481.14099                | $\text{C}_{17}\text{H}_{28}\text{N}_4\text{O}_{10}\text{S}$           | 0                   | Glu-Glu-Cys-Thr*                              |
| 481.19180                | 483.18752                | $\text{C}_{25}\text{H}_{30}\text{N}_4\text{O}_4\text{S}$              | 0                   | Phe-Trp-Met*                                  |
| 543.15816                | 547.14808                | $\text{C}_{22}\text{H}_{32}\text{N}_4\text{O}_8\text{S}_2$            | 1                   | Glu-Cys-Met-Tyr*                              |
| 611.14461                | 615.13629                | $\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{N}_6\text{O}_{12}\text{S}_2$         | 0                   | Glutathiondisulfid                            |
| 686.14210                | 688.13751                | $\text{C}_{21}\text{H}_{35}\text{N}_7\text{O}_{13}\text{P}_2\text{S}$ | 0                   | Dephospho-CoA                                 |
| 808.11885                | 810.11438                | $\text{C}_{23}\text{H}_{38}\text{N}_7\text{O}_{17}\text{P}_3\text{S}$ | 0                   | Acetyl-CoA                                    |

- Nur eines von mehreren möglichen Isomeren

### 3.1.3. Markierung von GSH-Konjugaten

Bis heute werden radioaktiv markierte Pestizide eingesetzt, um ihre Metabolisierung nachverfolgen zu können (Anderson und Gronwald, 1991; Cherifi *et al.*, 2001; Frear und Swanson, 1973; Gayler *et al.*, 1995; Gray *et al.*, 1996). Die auf diese Weise nachgewiesenen Metabolite gingen zweifellos aus dem Umsatz des Pestizids hervor. Doch nicht jedes Pestizid war radioaktiv verfügbar und der Aufwand Versuche mit radioaktiven Substanzen durchzuführen war deutlich erhöht. Zwar war durch den Einsatz von MS und NMR die Notwendigkeit der radioaktiven Markierung nicht mehr gegeben, die Identifizierung von metabolisch modifizierten Pestiziden in komplexen biologischen Proben war ohne die eindeutige Zuordnung jedoch erschwert (Brazier-Hicks *et al.*, 2008; Fang *et al.*, 2014; Gunning *et al.*, 2014; Wilson und Nicholson, 2003). In der Arzneimittelentwicklung ist die Identifikation von Modifikationen wichtig, um Änderungen, die Einfluss auf den Metabolismus und die Wirkweise haben könnten, zu untersuchen (Zhou *et al.*, 2005). Dabei wurden die zu testenden Substanzen mit humanen Lebermikrosomen und einer Mischung aus schwerem und leichtem GSH inkubiert und die entstanden Metabolite mittels MS nachgewiesen (Liao *et al.*, 2012). Die Markierung mit Isotopen-markiertem GSH ist dabei grundlegend für die Identifizierung der gebildeten Konjugate.

Um die Schwefelmarkierung in Hefe daraufhin zu testen, ob GSH-Konjugate von Pestiziden identifiziert werden konnten, wurden in der Literatur bereits beschriebene GST-Substrate untersucht. Dazu gehörten ATZ, Fluorodifen, Fenclorim und Benzylisothiocyanat (BITC) (Deng und Hatzios, 2002; Frear und Swanson, 1973; Kolm *et al.*, 1995; Lamoureux *et al.*, 1970). Verglichen wurden die Identifizierung der GSH-Konjugate bei einer 100 %- oder 50 %-Markierung der Schwefelmetabolite und anschließender HCA. Verwendet wurde der Hefestamm BY4741, bei dem das *MET15*-Gen wieder integriert wurde und die drei Gene für den Konjugatkatabolismus, *CIS2*, *CPC* und *CPY* entfernt worden sind (siehe Kapitel 3.2). Bei der 100 %-Markierung wurden die spezifischen Schwefelmassen für eine Belastung durch eine Clusteranalyse für beide Isotope einzeln ermittelt. Aus der Liste der spezifischen  $^{32}\text{S}$ -Massen wurden die putativen  $^{34}\text{S}$ -Massen berechnet und mit der entsprechenden Liste der selektierten  $^{34}\text{S}$ -Massen verglichen. Nach der 50 %-Markierung mit beiden Isotopen folgte zunächst die Detektion der Schwefelmassen mittels eines MatLab-basierten Algorithmus (Gläser *et al.*, 2014). Mit diesen als Schwefelmasse deklarierten Peaks wurde eine Matrix gebildet und die für ein Xenobiotikum spezifischen Massen mittels HCA ermittelt. Die Schwefelmassen, die in beiden Berechnungen identifiziert wurden, wurden mit den postulierten Massen der GSH-Konjugate der eingesetzten Pestizide verglichen. In beiden Fällen konnten die GSH-Konjugate von Fenclorim und BITC in den entsprechenden Proben identifiziert werden. Das Fluorodifen-GSH-Konjugat wurde nur durch eine hundertprozentige Markierung

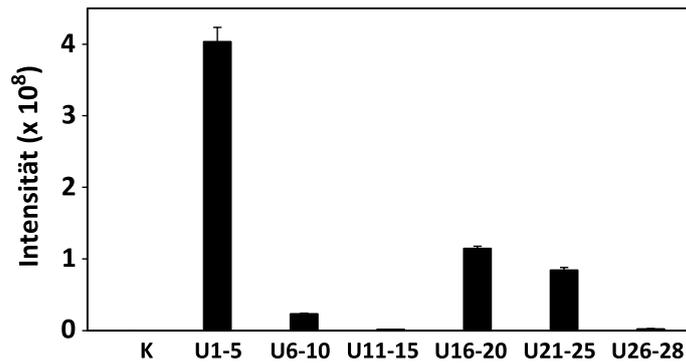
nachgewiesen und die Proben, die mit Atrazin belastet wurden, wiesen keine Masse auf, die auf das GSH-Konjugat dieses Herbizids schließen ließ (Tabelle 3.2).

**Tabelle 3.2 Nachweis von GSH-Konjugaten ausgesuchter Xenobiotika in unterschiedlich schwefelmarkierten Hefeextrakten.**

Schwefelhaltigen Massen im Hefestamm  $\Delta cis2\Delta cpc\Delta cpy+MET15$  wurden entweder mit 100 % oder 50 % schwerem Schwefel markiert und zusätzlich für 24 h mit einem der bekannten GST-Substrate, Atrazin, Fluorodifen, Fenclorim oder Benzylisothiocyanat, inkubiert. Bei der massenspektrometrischen Analyse der proteinfreien Extrakte dieser Kulturen sollten die GSH-Konjugate dieser Substanzen identifiziert werden. Ein positiver Nachweis ist durch (+) markiert, wurde das GSH-Substrat nicht gefunden ist dies mit (-) dargestellt. Der Pfeil zeigte die Position der GSH-Konjugation an.

|                                  | <b>Atrazin</b>        | <b>Fluorodifen</b>       | <b>Fenclorim</b>        | <b>Benzylisothiocyanat</b> |
|----------------------------------|-----------------------|--------------------------|-------------------------|----------------------------|
| <b>Summenformel GSH-Konjugat</b> | $C_{18}H_{30}N_8O_6S$ | $C_{17}H_{19}F_3N_4O_8S$ | $C_{20}H_{22}ClN_5O_6S$ | $C_{18}H_{24}N_4O_6S_2$    |
| <b>monoisotope Masse [m-H]</b>   | <b>485,19363</b>      | <b>495,08029</b>         | <b>494,09065</b>        | <b>455,10645</b>           |
| <b>100 %</b>                     | -                     | +                        | +                       | +                          |
| <b>50%</b>                       | -                     | -                        | +                       | +                          |

Da für ATZ im getesteten Hefestamm kein Konjugat nachgewiesen werden konnte, obwohl diese Substanz in der Literatur als Substrat für GSTs bekannt ist, wurde angenommen, dass BY4741 keine GST besitzt, die ATZ umsetzen kann oder dass in Hefe ein anderer Detoxifizierungsmechanismus als die Konjugation an GSH für dieses Xenobiotikum präferiert wird. Daher wurde in der Hefemutante  $\Delta tef4\Delta gto1\Delta gto2\Delta gto3\Delta cis2\Delta cpc\Delta cpy$  (siehe Kapitel 3.2.2), die GSTs aus Arabidopsis exprimierten, die Konjugation von ATZ an GSH getestet. Ausgewählt wurden GSTs der Tau-Klasse, da diese primär am Umsatz von Xenobiotika beteiligt sind (Krajewski *et al.*, 2013; McGonigle *et al.*, 2000). In einer Probe wurden fünf Hefestämme, die jeweils eine AtGST exprimierten, kultiviert und gemeinsam mit ATZ belastet. Dabei konnte das GSH-Konjugat von ATZ in allen getesteten Gruppen nachgewiesen werden, in der Kontrolle, die nur den Leervektor enthielt, jedoch nicht. Die Intensitäten der entsprechenden Konjugatpeaks in den einzelnen Gruppen waren sehr unterschiedlich (Abbildung 3.9). Die höchste Intensität wurde in den Probe, die GSTU1, GSTU2, GSTU3, GSTU4 und GSTU5 exprimierten, detektiert und betrug mehr als das 250fache im Vergleich zu den Proben mit der geringsten Intensität, GSTU11 bis GSTU15. Die Expression von Arabidopsis GSTs führte in BY4741 zu einem Umsatz von ATZ und wiesen dabei eine deutliche Varianz der GSTs der Tau-Klasse gegenüber diesem Pestizid auf.



**Abbildung 3.9 Umsatz von ATZ in vereinigten GST-exprimierenden Hefeproben.**

Kulturen, die je fünf AtGSTU-exprimierende Hefestämme der Mutante  $\Delta tef4\Delta gto1\Delta gto2\Delta gto3\Delta cis2\Delta cpc\Delta cpy$  enthielten, wurden mit 50  $\mu\text{M}$  ATZ für 24 h belastet und die gewonnenen proteinfreien Extrakte mittels ICR-FT/MS auf die Anwesenheit des Atrazin-GSH-Konjugates überprüft. Als Kontrolle (K) dienten Hefekulturen, die den Leervektor enthielten. Messungen wurden in Triplikaten erstellt.

Das Zusammenführen von mehreren AtGST-exprimierenden Stämmen hatte dabei den Vorteil, die Anzahl von Proben, die mittels ICR-FT/MS analysiert werden sollten, zu reduzieren. Auf diese Weise konnten jedoch keine Rückschlüsse auf die Aktivität einzelner GSTs gemacht werden und dies war daher nur als erster Screen von AtGSTs mit verschiedenen Substraten geeignet.

Die Schwefelmarkierung in Hefe ermöglichte die Detektion von spezifischen GSH-Konjugaten. Der Umsatz von Xenobiotika wurde in drei von vier Fällen bereits in Wildtyp-Hefe beobachtet. Durch eine zusätzliche Expression von Arabidopsis-GSTs, wobei die Analyse von mehreren GSTs in einer Probe einen zeitlichen Vorteil bot, konnte das vierte GSH-Konjugat positiv nachgewiesen werden.

### 3.2. Optimierung der Schwefelmarkierung von GSH-Konjugaten durch Manipulation des Hefegenoms

Hefe besitzt verschiedene Proteine, die eine GST-Aktivität aufweisen. Gtt1p, Gtt2p, Grx1p und Grx2p sind als zentrale GSTs in Hefe beschrieben (Choi *et al.*, 1998; Collinson und Grant, 2003). Die Deletion dieser vier Gene hat einen Einfluss auf die endogene GST-Aktivität von Hefe (Collinson und Grant, 2003). Zusätzlich gibt es drei GSTs, die der Omega-Klasse zugeordnet werden, Gto1p, Gto2p und Gto3p (Garcerá *et al.*, 2006). In *in vitro*-Studien konnte bei diesen drei GSTs keine Konjugationsaktivität mit CDNB nachgewiesen werden, aber sie wiesen eine Aktivität als Thioltransferasen mit  $\beta$ -Hydroxyethylsulfid als Substrat auf. Trotzdem hat die Deletion dieser drei GSTs einen vergleichbaren Effekt auf die GST-Aktivität von Hefe gegenüber CDNB wie die Entfernung der vier Proteine Grx1p, Grx2p, Gtt1p und Gtt2p (Krajewski *et al.*, 2013). Ein weiteres Protein mit GST-Aktivität ist die Untereinheit  $\beta$  des Transkriptionselongationsfaktors  $\gamma$ -EF1, Tef4p. Neben dem C-terminalen Teil des Proteins, welcher für die Transkriptionselongation zuständig ist,

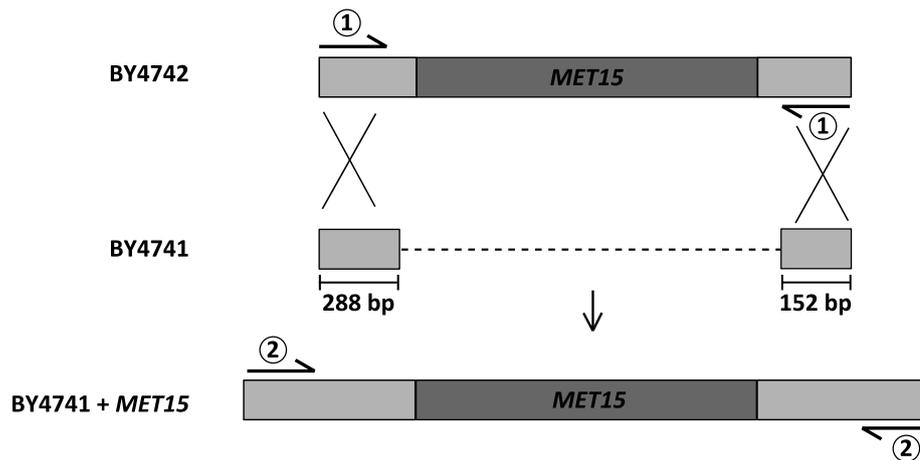
hat das Protein eine GST-Domäne im N-Terminus (Jeppesen *et al.*, 2003; Koonin *et al.*, 1994). In Reis zeigte das Homolog dieses Proteins eine deutliche GST-Aktivität (Kobayashi *et al.*, 2001). Die Deletion dieses Gens führte zu einer deutlichen Reduktion der GST-Aktivität in *S. cerevisiae* (Krajewski *et al.*, 2013).

Der Katabolismus von GSH-Konjugaten wird in Hefe maßgeblich von drei Proteinen umgesetzt, Cis2p, Cpc und Cpy. Cis2p katalysiert den Schritt der  $\gamma$ -Glu-Abspaltung, während Cpc und Cpy das Glycin von dem restlichen Konjugat trennen (Wünschmann *et al.*, 2010). Der Schritt zum Cystein-Konjugat ist bisher unbekannt. Deletiert man alle drei Gene wird der Konjugatabbau verhindert und das primäre GSH-Konjugat akkumuliert (Wünschmann *et al.*, 2010).

### 3.2.1. Integration von *MET15* in das Genom von BY4741 und entsprechenden Mutanten

Die Deletionen  $\Delta gtt1\Delta gtt2\Delta grx1\Delta grx2$  und  $\Delta cis2\Delta cpc\Delta cpy$  wurden im BY4741-Background erstellt (Wünschmann *et al.*, 2010). In diesem Hefestamm war das *MET15*-Gen (YLR303W) deletiert, was eine Markierung mit schwerem Sulfat aufgrund der Methionin-Auxotrophie nicht möglich macht, wenn nicht Plasmide mit Methionin-Marker verwendet werden (Brachmann *et al.*, 1998). Um in möglichst vielen Konjugatmetabolismus- und -katabolismusmutanten eine Schwefelmarkierung mit  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  zu ermöglichen, wurde *MET15* mittels homologer Rekombination in das Genom des Wildtyps BY4741 und der darauf basierenden Deletionsmutanten eingebracht.

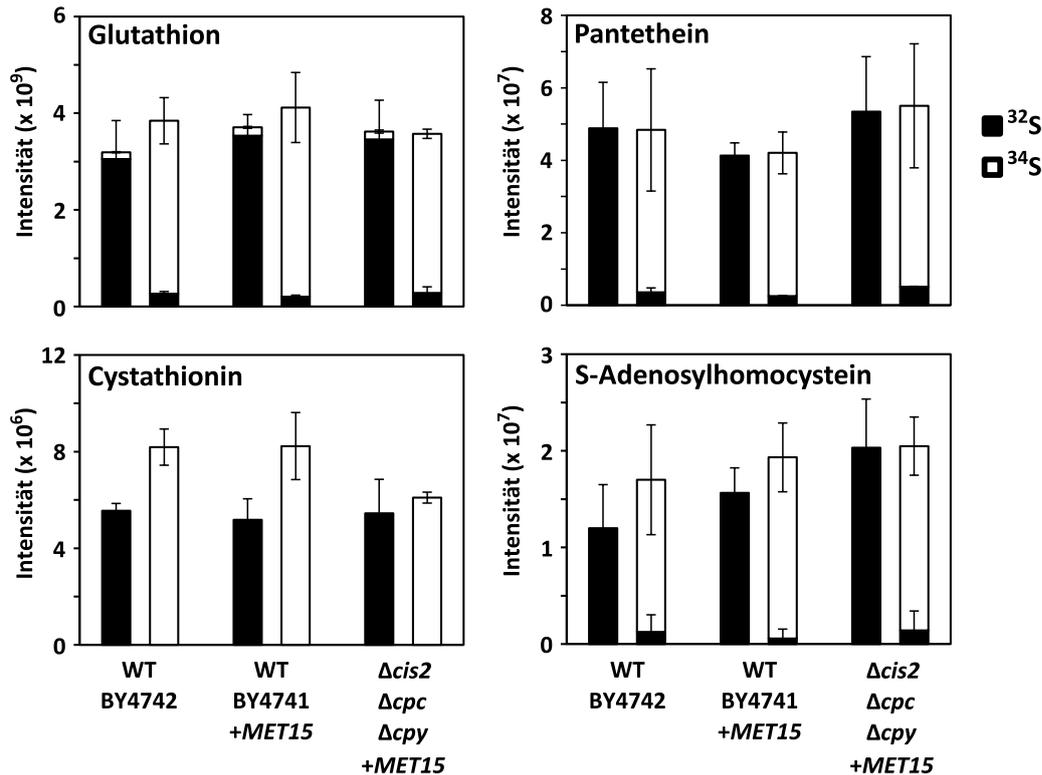
Im Stamm BY4742 ist *MET15* vorhanden. BY4741 und BY4742 haben den gleichen Ursprung und unterscheiden sich nur in der Deletion der Selektionsmarker *MET15* bzw. *LYS2*, daher sind die flankierenden Sequenzen des *MET15*-Gens im BY4742-Genom identisch mit denen im Genom von BY4741. Das Gen wurde 288 bp *upstream* und 152 bp *downstream* aus dem Genom von BY4742 mittels PCR amplifiziert, sodass eine ausreichend lange Sequenz, die identisch zum Genom von BY4741 war, eine erfolgreiche Rekombination ermöglichen sollte. Das PCR-Produkt wurde in BY4741 eingebracht und durch homologe Rekombination an der Position des zuvor deletierten *MET15* in das Genom integriert (Abbildung 3.10). Die erfolgreiche Insertion wurde mittels PCR und Wachstum auf methioninfreiem Medium überprüft.



**Abbildung 3.10 Schema der *MET15*-Insertion in das Genom von BY4741.**

Das *MET15*-Gen wurde mit Primern, die sowohl im Genom von BY4742 als auch BY4741 identische Sequenzen hatten (1), aus dem Genom von BY4742 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in BY4741 und Mutanten, die auf diesem Stamm basierten, eingebracht und mittels homologer Rekombination in das Genom integriert. Eine positive Rekombination resultierte in der erfolgreichen Selektion auf methioninfreiem Medium. Mit einem zweiten Primerpaar, welches außerhalb der Rekombinationssequenzen gebunden hat (2), wurde die Integration zusätzlich überprüft.

Die vier Schwefelmetabolite GSH, Pantethin, Cystathionin und S-Adenosylhomocystein wurden mittels Isotopenmarkierung in BY4741+*MET15* und in der daraus entstandenen Deletionsmutante  $\Delta cis2\Delta cpc\Delta cpy+MET15$  nachgewiesen und zeigten im Vergleich zum WT BY4742 kaum Unterschiede in ihrer Abundanz (Abbildung 3.11). Die Insertion von *MET15* hatte keinen Effekt auf schwefelhaltige Massen in *S. cerevisiae*. Durch die erfolgreiche Integration konnten alle vorhandenen Mutanten für die Markierung mit schwerem Schwefel verwendet werden.

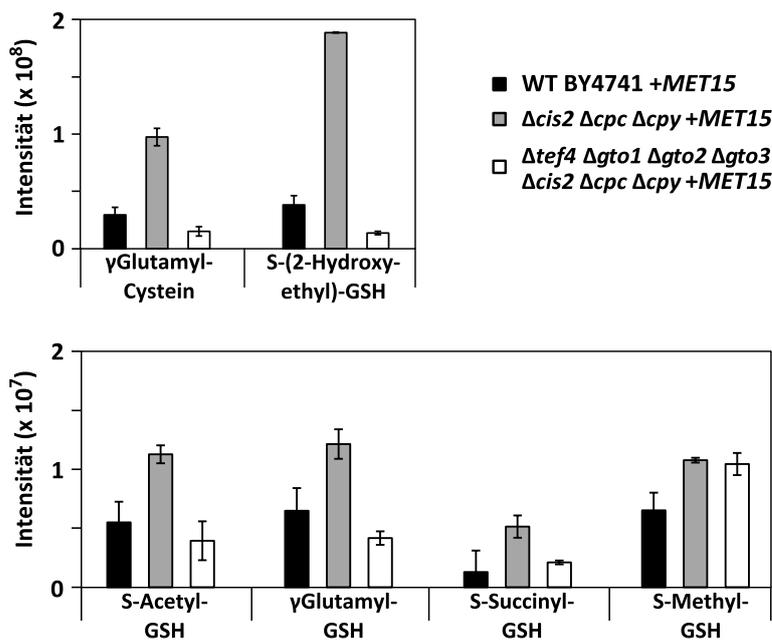


**Abbildung 3.11** Markierung von schwefelhaltigen Massen mit leichtem und schwerem  $\text{SO}_4^{2-}$  nach Integration des Gens *MET15*.

BY4741 und die auf diesem Stamm basierende Mutante  $\Delta cis2 \Delta cpc \Delta cpy$  wurden nach der Integration des Gens *MET15* auf die Eigenschaft der Schwefelmarkierung untersucht. Dafür wurden proteinfreie Extrakte von Kulturen, die in schwefelfreiem Medium supplementiert mit  $^{32}\text{SO}_4^{2-}$  oder  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  angezogen wurden, mittels ICR-FT/MS, mit 250 Scans und einer 1:10 Verdünnung der Extrakte, analysiert. Die Schwefelmetabolite GSH, Pantethein, Cystathionin und S-Adenosylhomocystein wurden als Marker für eine erfolgreiche Markierung ausgewählt. Als Kontrolle diente der WT BY4742, welcher *MET15* enthält. Die Standardabweichung stellte Messungen aus drei unabhängigen Proben dar.

Durch das Einbringen des *MET15*-Gens und die damit ermöglichte Schwefelmarkierung konnten in der Mutante  $\Delta cis2 \Delta cpc \Delta cpy$  spezifische Schwefelmassen nachgewiesen werden, bei denen es sich, aufgrund des fehlenden Katabolismus, um GSH-Konjugate handeln könnte. Verglichen mit dem WT BY4741+*MET15* wiesen insgesamt 90 Schwefelmassen in der Deletionsmutante eine höhere Intensität auf. Mit einer Abweichung von 0,5 ppm wurde diesen Massen eine Summenformel zugeordnet und vorausgesetzt, dass es sich bei diesen Massen um GSH-Konjugate handelte, wurde die Summenformel von GSH abgezogen (siehe Abschnitt 3.3) und die verbleibende Formel in der PubChem-Datenbank identifiziert. Von insgesamt 80 Massen, die einer Summenformel zugeordnet wurden, wurden sechs der Massen als bekannte, GSH-assoziierte Metabolite, S-Methyl-GSH, S-Acetyl-GSH, S-(2-Hydroxyethyl)-GSH, S-Succinyl-GSH,  $\gamma$ -Glutamyl-GSH und  $\gamma$ -Glutamylcystein, identifiziert (Anhang Tabelle 6.7). Der Vergleich mit dem Hefestamm, in dem zusätzlich zu den Katabolismogenen auch die Gene für vier GSTs, *TEF4*, *GTO1*, *GTO2* und *GTO3*, deletiert wurden (siehe Abschnitt 3.2.2), ergab, dass die Abundanz von S-Acetyl-GSH, S-(2-Hydroxyethyl)-GSH, S-

Succinyl-GSH,  $\gamma$ -Glutamyl-GSH und  $\gamma$ -Glutamylcystein ein zum WT vergleichbares oder geringeres Level erreichte (Abbildung 3.12). Eine Beteiligung der deletierten GSTs an der Bildung dieser GSH-Konjugate sollte daher in Betracht gezogen werden. Im Gegensatz dazu wurde Methyl-GSH in vergleichbarer Menge in den beiden untersuchten Deletionsmutanten detektiert, was einen Einfluss der deletierten GSTs nicht nahelegte. Zum einen könnte es sich um eine GST-unabhängige Reaktion handeln, bei der Methyl-GSH als Produkt entstand, und zum anderen könnten auch die vier anderen GSTs, Gtt1p, Gtt2p, Grx1p und Grx2p, für die Konjugation verantwortlich sein.



**Abbildung 3.12 Spezifische GSH-Konjugate, die in der Mutante  $\Delta cis2 \Delta cpc \Delta cpy + MET15$  angereichert waren.** Schwefelhaltige Metabolite wurden durch die Markierung mit  $^{32}\text{S}$  oder  $^{34}\text{S}$  in 1:10 verdünnten, proteinfreien Extrakten von verschiedenen *S. cerevisiae*-Stämmen mittels ICR-FT/MS detektiert. Analysiert wurden die *MET15*-supplementierten Stämme BY4741,  $\Delta cis2 \Delta cpc \Delta cpy$  und  $\Delta tef4 \Delta gto1 \Delta gto2 \Delta gto3 \Delta cis2 \Delta cpc \Delta cpy$ . Die, im Vergleich zum WT BY4741+*MET15*, für die Mutante  $\Delta cis2 \Delta cpc \Delta cpy + MET15$  spezifischen Schwefelmassen wurden mittels HCA ermittelt und allen Massen, die größer als 306 u waren, wurde eine mögliche Summenformel im Rahmen einer Varianz von 0,5 ppm zugeordnet. Darunter waren sechs Massen, die in der Datenbank PubChem als GSH-Konjugate identifiziert wurden. Um den Einfluss von GSTs auf die Formation dieser GSH-Konjugate zu untersuchen, wurde zusätzlich die Mutante  $\Delta tef4 \Delta gto1 \Delta gto2 \Delta gto3 \Delta cis2 \Delta cpc \Delta cpy$  analysiert. Die Messung erfolgte in Triplikaten.

Die Analyse von  $\Delta cis2 \Delta cpc \Delta cpy + MET15$  ermöglichte die Detektion von endogenen GSH-Konjugaten. Unter den 90 hoch abundanten Schwefelmassen in der Mutante könnte es weitere GSH-Konjugate geben, die bisher unbekannt waren. Durch die Kombination mit den vorhandenen Deletionsmutanten der GSTs könnte zudem die Beteiligung spezifischer GSTs, durch die Expression eines einzelnen Enzymes, untersucht werden.

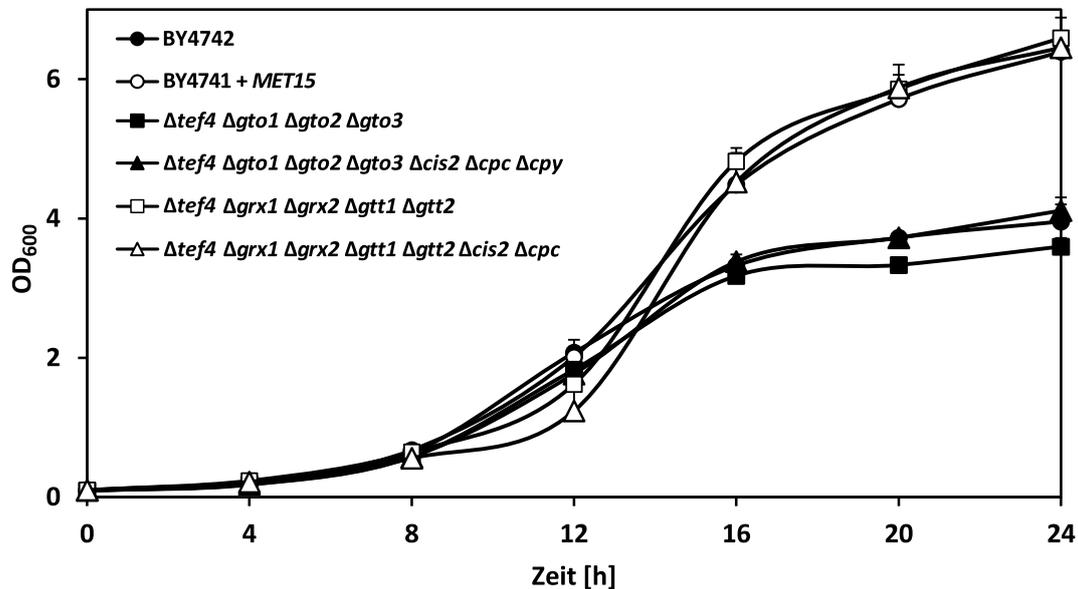
### 3.2.2. Deletion von *TEF4* und Genen des GSH-Katabolismus in GST-defizienter *S. cerevisiae*

Die Deletion von GSTs in *S. cerevisiae* führte zu einem verminderten Umsatz von GST-Substraten *in vivo* (Krajewski *et al.*, 2013). Dabei zeigte Tef4p den größten Einfluss auf die endogene GST-Aktivität der Hefe. Um das Spektrum von verfügbaren GST-Deletionsmutanten mit einer möglichst niedrigen endogenen GST-Aktivität zu erweitern, wurde in der Mutante  $\Delta grx1\Delta grx2\Delta gtt1\Delta gtt2+MET15$  die DNA-Sequenz, die für das Protein Tef4p kodiert, deletiert. Die Aktivität wurde in Relation zu den Aktivitäten der Einzelmutante  $\Delta tef4$  und der Mehrfachmutante  $\Delta tef4\Delta gto1\Delta gto2\Delta gto3$  gesetzt, die die niedrigste GST-Aktivität zeigte und als Stamm für die Expression von AtGSTs verwendet wurde (Krajewski *et al.*, 2013). Die Einführung von AtGSTs in diesen Hefestamm führte zu einer teilweisen Wiederherstellung der GST-Aktivität und ermöglichte die Bestimmung der Aktivität der pflanzlichen Enzyme. In der Analyse mittels ICR/FT-MS zeigte sich, dass das Glutathionkonjugat des Fungizids Anilazin in der Hefe weiter abgebaut wird. Der Grad der weiteren Metabolisierung schien dabei nicht direkt abhängig von der Aktivität der eingebrachten AtGST zu sein. Eine zuverlässige Quantifizierung des primären GSH-Konjugates war erschwert, da ein ständiger, ungleichmäßiger Abbau dieses Konjugates bestand. Durch die Arbeit von Wünschmann und Kollegen ist bekannt, dass drei Enzyme an dem Abbau von GSH-Konjugaten in *S. cerevisiae* beteiligt sind, die Carboxypeptidasen CPC und CPY und die  $\gamma$ -Glutamyltransferase Cis2p. Die Deletion dieser drei Gene hatte zur Folge, dass GSH-Konjugate nicht mehr abgebaut wurden und in der Hefe akkumulierten (Wünschmann *et al.*, 2010). Eine Kombination der GST-defizienten Mutanten und der Deletion des Konjugatkatabolismus hätte den Vorteil, die Aktivität der Arabidopsis-GSTs zuverlässig quantifizieren und vergleichen zu können. Daher sollten die drei Gene *CPC*, *CPY* und *CIS2* in den Mutanten  $\Delta tef4\Delta grx1\Delta grx2\Delta gtt1\Delta gtt2+MET15$  und  $\Delta tef4\Delta gto1\Delta gto2\Delta gto3$  entfernt werden.

Die Deletion der Tef4p-kodierenden Sequenz und der drei Konjugatkatabolismus involvierten Gene erfolgte durch Marker-gestützte Deletion mittels homologer Rekombination (Güldener *et al.*, 1996; Güldener *et al.*, 2002). Nach der erfolgreichen Selektion auf das Rekombinationsereignis wurde der Marker durch die Expression der Cre-Rekombinase wieder entfernt. Dies ermöglichte die aufeinander folgende Deletion mehrerer Gene. Auf diese Weise wurden die Mutanten  $\Delta tef4\Delta grx1\Delta grx2\Delta gtt1\Delta gtt2+MET15$ ,  $\Delta tef4\Delta grx1\Delta grx2\Delta gtt1\Delta gtt2\Delta cis2\Delta cpc$  und  $\Delta tef4\Delta gto1\Delta gto2\Delta gto3\Delta cis2\Delta cpc\Delta cpy$  generiert.

Das Entfernen der Gene hatte keinen Einfluss auf das Wachstum der Zellen (Abbildung 3.13). Wachstumsunterschiede zeigten sich lediglich aufgrund der beiden genetisch unterschiedlichen Hintergründe der Wildtypen. Es wurde bereits früher beobachtet, dass BY4742 in Minimalmedium im Vergleich zu BY4741 ein geringeres Wachstum aufwies (Hanscho *et al.*, 2012). Die Stämme

zeigten ab zwölf Stunden ein unterschiedliches Wachstum, wobei BY4741+*MET15* und die entsprechenden Mutanten in der stationären Phase eine höhere Zelldichte erreichten als BY4742 und die auf diesem Stamm basierenden Mutanten. Wachstumsunterschiede, die auf die Gendeletionen zurückzuführen waren, wurden nicht festgestellt.

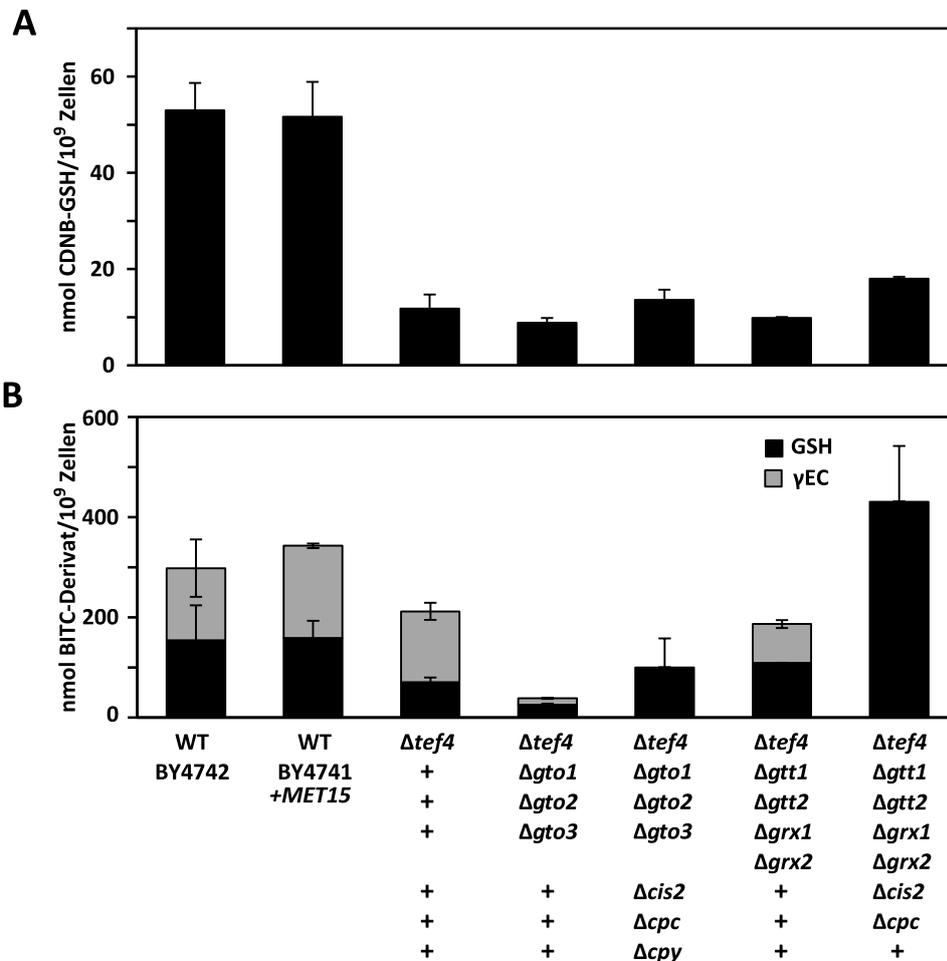


**Abbildung 3.13 Wachstum der GST-defizienten und GST- und Katabolismus-defizienten Hefemutanten.**

Untersucht wurde das Wachstum von dem WT BY4742 und darauf basierenden Mutanten (schwarz) und BY4741+*MET15* als WT und den basierend auf diesem Stamm generierten Mutanten (weiß). Wildtyp und Deletionsmutanten wurden von Platte in Minimalmedium mit Saccharose auf eine OD<sub>600</sub> von 0,1 angeimpft und bei 30 °C und 200 rpm kultiviert. Das Wachstum wurde alle 4 h anhand der zunehmenden optischen Dichte bei 600 nm bestimmt und erfolgte in Triplikaten.

Um die enzymatische Auswirkung der Deletionen auf den Umsatz und die Akkumulation von GSH-Konjugaten zu bestimmen, wurden die Deletionsmutanten mit den GST-Substraten CDNB oder BITC für 4 h inkubiert. Der Nachweis der Konjugate erfolgte mittels HPLC, zur Detektion der Abbauprodukte der beiden GST-Substrate wurde zusätzlich die ICR-FT/MS verwendet. In der HPLC konnte für CDNB das GSH-Konjugat und für BITC sowohl das GSH-Konjugat als auch das  $\gamma$ -Glutamylcystein-Derivat ( $\gamma$ EC) detektiert werden. Der WT BY4742 und der mit *MET15* komplementierte WT BY4741+*MET15* wiesen eine vergleichbare Aktivität auf. Wie bereits von Krajewski und Kollegen beobachtet, führte die Deletion von *TEF4* zu einer deutlich erniedrigten Aktivität im Vergleich zum WT (Krajewski *et al.*, 2013). Das Ausmaß war stark abhängig vom untersuchten Substrat. So war die Auswirkung auf die endogene GST-Aktivität gegenüber CDNB durch die Deletion von *TEF4* deutlich größer und betrug 20 % im Vergleich zum WT. Dies wurde durch die Deletion weiterer Gene, die für Proteine mit GST-Aktivität kodierten, nur geringfügig verstärkt (Abbildung 3.14 A). Wurde BITC als GST-Substrat verwendet, war die  $\Delta\text{tef4}$ -Aktivität nur

um die Hälfte reduziert im Vergleich zum WT. Diese konnte durch die Deletion der drei Omega-GSTs Gto1p, Gto2p und Gto3p noch einmal halbiert werden, während das zusätzliche Entfernen von Grx1p, Grx2p, Gtt1p und Gtt2p zu einer geringen weiteren Abnahme der GST-Aktivität führte und die Menge des primären GSH-Konjugats in dieser Mutante im Vergleich zu der Einzelmutante  $\Delta tef4$  sogar erhöht war (Abbildung 3.14 B).

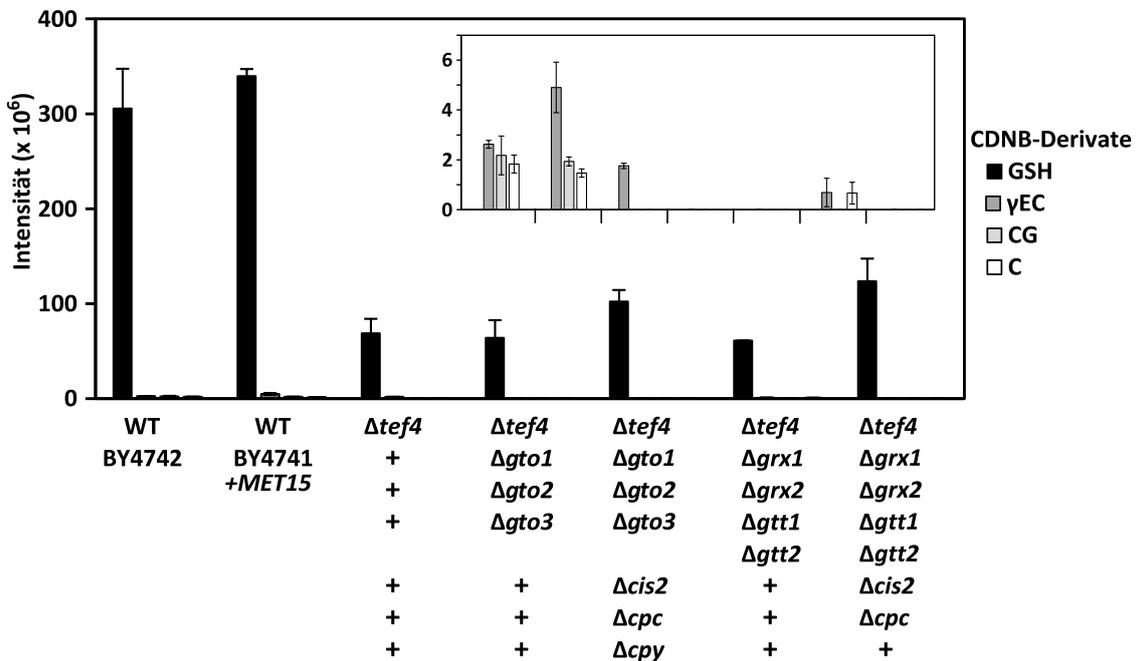


**Abbildung 3.14 Aktivität GST- und Katabolismus-defizienter Hefemutanten.**

Verschiedene Hefemutanten wurden in Flüssigkultur mit Galaktose als Kohlenstoffquelle und 10  $\mu$ M CDNB (A) oder 10  $\mu$ M BITC (B) 4 h lang belastet. Von allen Proben wurde die gleiche Menge Zellen geerntet und die proteinfreien Extrakte im Anschluss mittels HPLC auf die gebildeten Konjugate hin untersucht. Die Detektion erfolgte bei 340 nm für das CDNB-Konjugat und 254 nm für den Nachweis der BITC-Derivate mit GSH (schwarz) und  $\gamma$ -Glutamylcystein (grau). Die Standardabweichung ergab sich aus drei Proben. (+) steht für das WT-Gen an der entsprechenden Stelle.

Die Deletion der Katabolismusgene der GSH-Konjugate führte in den untersuchten Mehrfachmutanten zu einem leichten Anstieg der CDNB-GSH-Mengen (Abbildung 3.14 A). Mittels ICR-FT/MS wurden in den Proben der beiden Wildtypen alle drei möglichen Abbauprodukte, die Derivate von CDNB mit  $\gamma$ -Glutamylcystein ( $\gamma$ EC), Cysteinylglycin (CG) und Cystein (C), nachgewiesen (Abbildung 3.15). Die Mutanten  $\Delta tef4$  und  $\Delta tef4 \Delta grx1 \Delta grx2 \Delta gtt1 \Delta gtt2$  wiesen neben dem GSH-

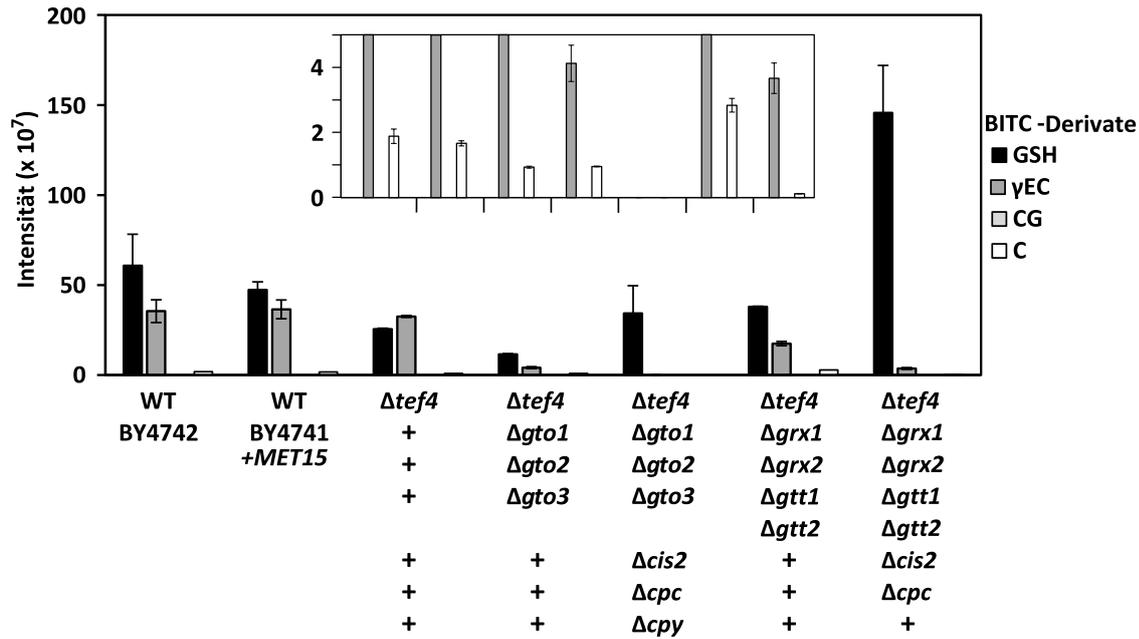
Konjugat die entsprechenden Verbindungen mit  $\gamma$ -Glutamylcystein bzw.  $\gamma$ -Glutamylcystein und Cystein auf. In den Extrakten aller weiteren untersuchten Mutanten konnte nur das GSH-Konjugat von CDNB nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.15 Massenspektrometrische Analyse der CDNB-GSH-Konjugate und deren Abbauprodukte in verschiedenen Hefemutanten.**

Extrakte, die bereits mittels HPLC analysiert wurden, wurden hinsichtlich der Abbauprodukte der GSH-Konjugate mit CDNB mittels ICR-FT/MS untersucht. Die CDNB-Derivate  $\gamma$ -Glutamylcystein ( $\gamma$ EC), Cysteinylglycin (CG) und Cystein (C), die als Abbauprodukte des primären GSH-Konjugats bekannt sind, wurden detektiert und in dem eingefügten Diagramm nochmals vergrößert dargestellt. Die Analyse erfolgte in Triplikaten. (+) markiert ein vorhandenes WT-Allel im Vergleich zu den Deletionsmutanten.

Die Akkumulation des primären GSH-Konjugates war mit BITC als Substrat in den Katabolismusmutanten höher als mit CDNB. Im Vergleich zu den entsprechenden GST-defizienten Mutanten zeigte eine zusätzliche Deletion der Katabolismogene einen vierfachen Anstieg der Konjugatmenge. Im Fall von  $\Delta te f 4 \Delta g r x 1 \Delta g r x 2 \Delta g t t 1 \Delta g t t 2 \Delta c i s 2 \Delta c p c$  war die Konjugatmenge sogar höher als im WT. Mittels HPLC konnte in diesen Mutante das  $\gamma$ -Glutamylcystein-Abbauprodukt nicht mehr nachgewiesen werden (Abbildung 3.14 B). Der sensitivere Nachweis mittels ICR-FT/MS belegte einen vollständigen Verlust des Konjugatkatabolismus in der Mutante  $\Delta te f 4 \Delta g t o 1 \Delta g t o 2 \Delta g t o 3 \Delta c i s 2 \Delta c p c \Delta c p y$ . In der Mutante  $\Delta te f 4 \Delta g r x 1 \Delta g r x 2 \Delta g t t 1 \Delta g t t 2 \Delta c i s 2 \Delta c p c$  wurden die Abbauprodukte  $\gamma$ -Glutamylcystein-BITC und Cystein-BITC nachgewiesen, die Mengen waren im Vergleich zu der ursprünglichen GST-Mutante  $\Delta te f 4 \Delta g r x 1 \Delta g r x 2 \Delta g t t 1 \Delta g t t 2$  jedoch deutlich reduziert und ließen sich auf die verbleibende Aktivität von CPY in dieser Mutante zurückführen (Abbildung 3.16).



**Abbildung 3.16** Massenspektrometrische Analyse der BITC-GSH-Konjugate und deren Abbauprodukte in verschiedenen Hefemutanten.

Extrakte, die bereits mittels HPLC analysiert wurden, wurden hinsichtlich der Abbauprodukte der GSH-Konjugate mit BITC mittels ICR-FT/MS untersucht. Die BITC-Derivate  $\gamma$ -Glutamylcystein ( $\gamma$ EC) und Cystein (C), die als Abbauprodukte des primären GSH-Konjugats bekannt sind, wurden detektiert. Das Cysteinylglycin-Derivat (CG) konnte in keiner der gemessenen Proben nachgewiesen werden. In dem eingefügten Diagramm wurden die Abbauprodukte noch einmal in Vergrößerung gezeigt. Die Analyse erfolgte in Triplikaten. (+) markiert ein vorhandenes WT-Allel im Vergleich zu den entsprechenden Deletionsmutanten.

Durch die Deletion des Katabolismus wurde die Menge der generierten Abbauprodukte von GSH-Konjugaten deutlich reduziert. In der Mutante, in der alle drei Gene, die für die Degradation verantwortlich sind, entfernt wurden, wurde bei beiden getesteten Substraten nur das primäre GSH-Konjugat detektiert. In der Mutante  $\Delta tef4\Delta grx1\Delta grx2\Delta gtt1\Delta gtt2\Delta cis2\Delta cpc$  wurden mit BITC als Substrat, aufgrund der verbleibenden Aktivität der CPY, die entsprechenden  $\gamma$ -Glutamylcystein- und Cystein-Derivate mittels ICR-FT/MS detektiert.

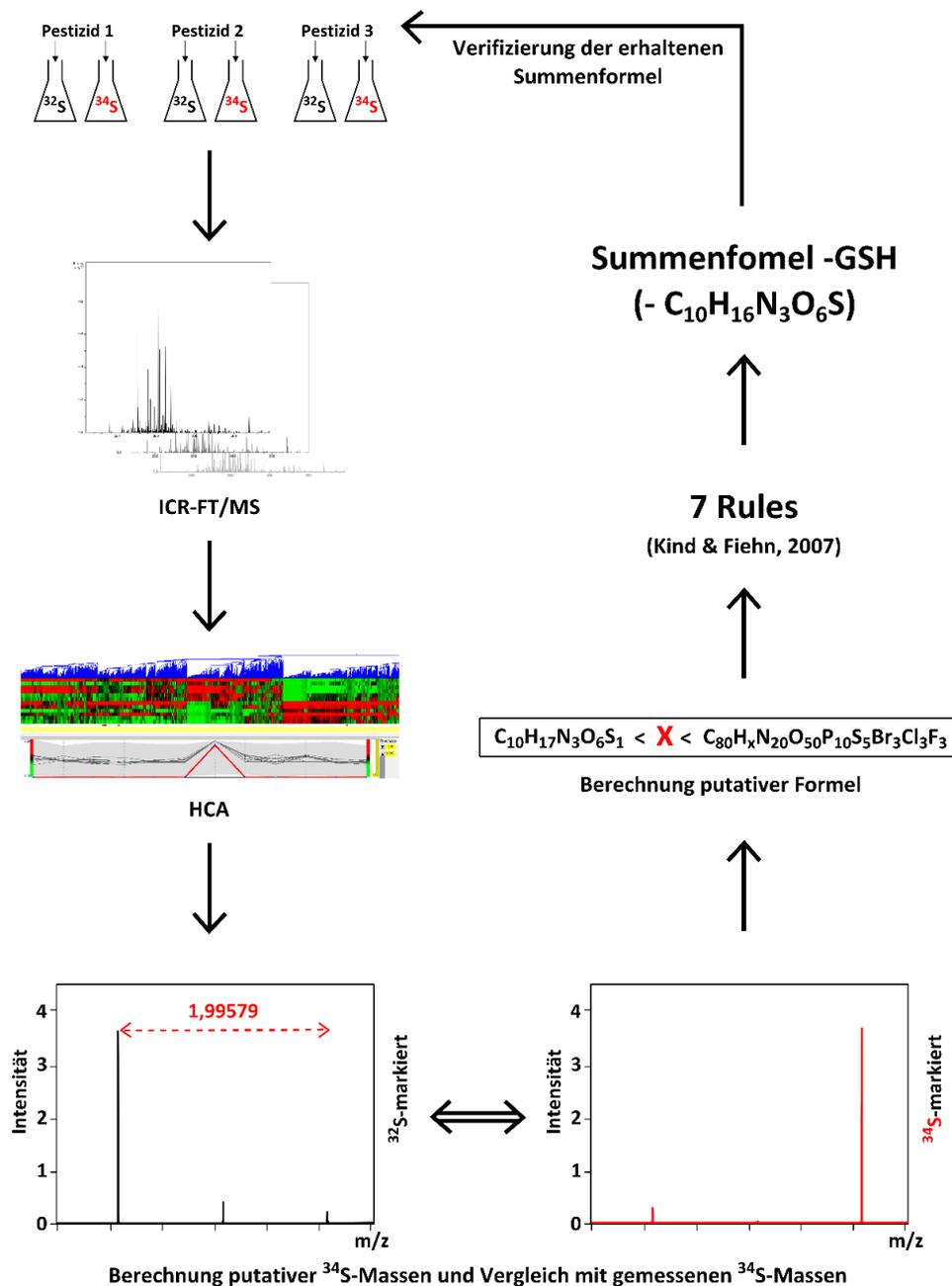
Die Verwendung der Katabolismusmutanten für die Untersuchung der AtGST-Aktivität bot den Vorteil, die Aktivität der GSTs, die eine geringe Aktivität aufweisen, durch die Akkumulation des GSH-Konjugats bestimmen zu können. Bei Substraten, die sehr schnell umgesetzt und weiter metabolisiert werden, konnte durch den Verlust der katabolischen Metabolite, die Quantifizierung des GSH-Konjugats und somit der Vergleich der Arabidopsis-GSTs erleichtert werden.

### 3.3. Identifizierung von GST-Substraten

Mit der Kombination von Schwefelmarkierung und fehlendem Konjugatabbau wurde in *S. cerevisiae* ein System entwickelt, in dem es möglich war, *in vivo* nach GST-Substraten zu suchen. Die Anzucht von Hefekulturen in unterschiedlich supplementierten Schwefelmedien ermöglichte eine erfolgreiche Markierung von schwefelhaltigen Metaboliten, die massenspektrometrisch aufgrund des sich ergebenden Massenunterschiedes detektiert wurden. In Hefeextrakten wurden mittels ICR-FT/MS und HCA Massen, die spezifisch für eine Xenobiotika-Belastung waren, selektiert und führten zusammen mit der isotopen Schwefelmarkierung zur Identifizierung von GSH-Konjugaten (siehe 3.1.3). Dieser Ansatz wurde verwendet, um in *S. cerevisiae*, in welcher der Katabolismus von GSH-Konjugaten durch die Deletion der Gene *CIS2*, *CPC* und *CPY* ausgeschaltet war, Pestizide auf eine mögliche Konjugation mit GSH zu testen und so neue Einblicke in das Substratspektrum von GSTs zu erhalten.

#### 3.3.1. Nachweis von GSH-Konjugaten

Pestizide bieten, je nach Struktur, oftmals mehr als einen möglichen Angriffspunkt für die GSH-Konjugation oder weitere Modifikationen wie Hydroxylierung und N-Dealkylierung (Brazier-Hicks *et al.*, 2008; Huber *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2014). Um eine Idee davon zu bekommen, an welcher Stelle eines Moleküls es zur GSH-Konjugation kam und ob vorherige Modifikationen stattfanden, wurde versucht, den selektierten Schwefelmassen der HCA eine Summenformel zuzuordnen (Abbildung 3.17). Mittels HCA wurden meist mehrere spezifische Schwefelmassen einer Pestizidbelastung detektiert. Von diesen wurden solche, die eine Masse größer als 306 u aufwiesen, was der Masse von konjugiertem GSH ( $GS^-H^+$ ) entspricht, selektiert. Die hohe Auflösung der ICR-FT/MS ermöglichte es dabei, präzise Rahmenbedingungen zu setzen, wodurch die Anzahl der putativen Summenformeln niedrig gehalten wurde. Diesen Massen wurden Summenformeln zugeordnet, die ausgehend von der Summenformel von GSH als Minimum und den Summenformeln der eingesetzten Pestizide, eine Komposition von  $C_{10-80}H_nN_{3-20}O_{6-50}P_{0-10}S_{1-5}Cl_{0-5}Br_{0-3}F_{0-3}$  haben konnten und mit einer Varianz von 0,5 ppm mit den selektierten Massen übereinstimmten. Die errechneten Summenformeln basierten dabei lediglich auf der vorgegebenen molekularen Komposition und der Bindigkeit der Elemente und wurden daher im Weiteren auf ihre Plausibilität hin untersucht. Kind und Fiehn haben sieben Regeln aufgestellt, die natürliche Komposition einer Summenformel zu überprüfen, was die Anzahl der putativen Ergebnisse zusätzlich reduzierte (Kind und Fiehn, 2007).



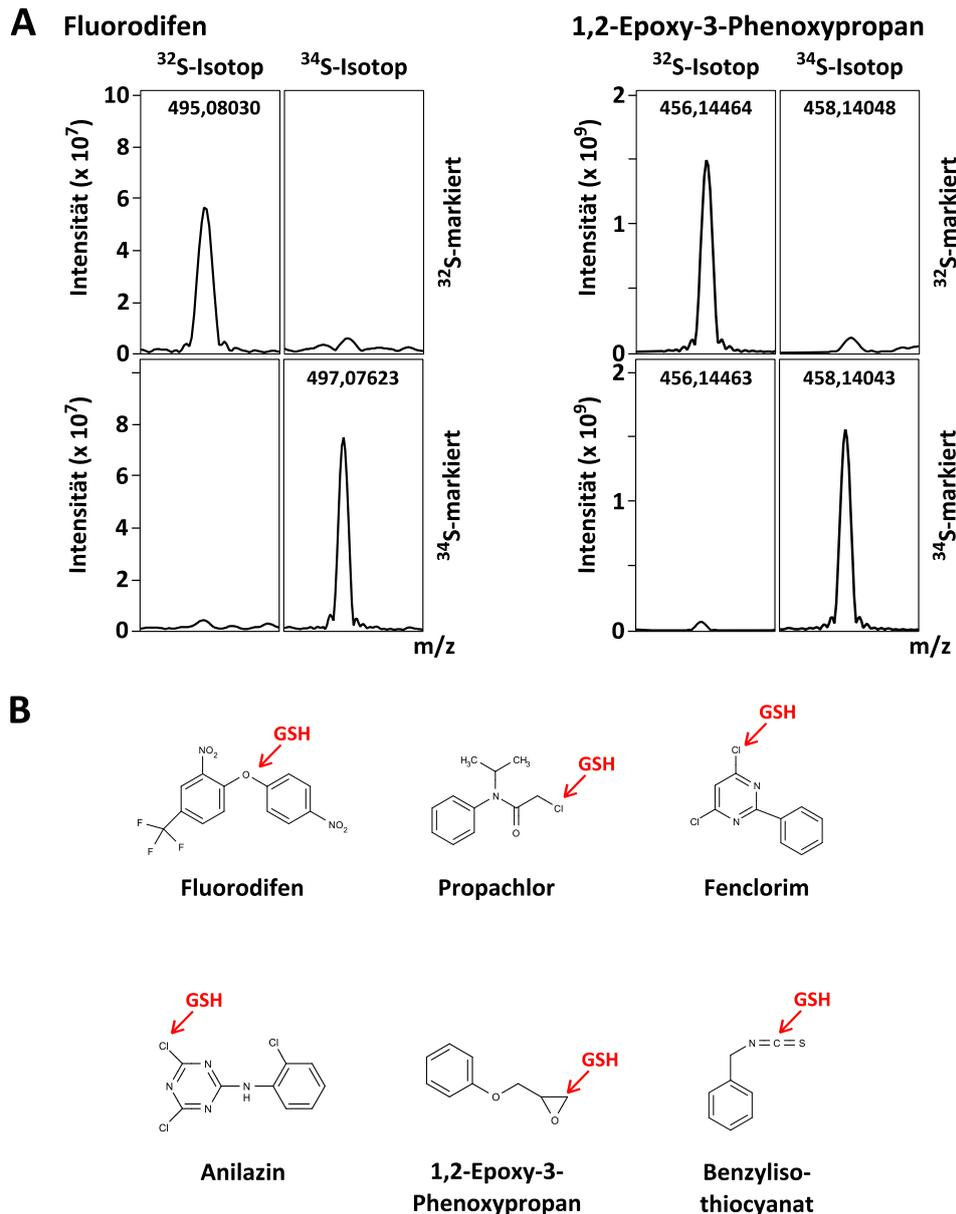
**Abbildung 3.17 Schematisch dargestellter Ablauf der Identifizierung von GST-Substraten in *S. cerevisiae*.** Hefekulturen des Stammes  $\Delta cis2\Delta cpc\Delta cpy+MET15$  wurden entweder in Medium mit  $^{32}\text{SO}_4^{2-}$  oder  $^{34}\text{SO}_4^{2-}$  kultiviert und mit 1-10  $\mu\text{M}$  Xenobiotika für 1 h belastet. Die proteinfreien Extrakte wurden mittels ICR-FT/MS bei einer zehnfachen Verdünnung und 250 Scans massenspektrometrisch analysiert und die, für eine Belastung spezifischen Massen durch HCA ermittelt. Dabei wurden  $^{32}\text{S}$ -Proben und  $^{34}\text{S}$ -Proben separat behandelt. Ausgehend von der Liste der spezifischen Massen der  $^{32}\text{S}$ -Proben wurden ihre entsprechenden putativen  $^{34}\text{S}$ -Massen berechnet und mit der HCA-Liste der  $^{34}\text{S}$ -Proben verglichen. Die erhaltenen putativen Schwefelmassen, die eine Masse größer als 306 u hatten, wurden im Spektrum verifiziert und es wurde ihnen eine Summenformel, die die Voraussetzung  $\text{C}_{10-80}\text{H}_n\text{N}_{3-20}\text{O}_{6-50}\text{P}_{0-10}\text{S}_{1-5}\text{Cl}_{0-5}\text{Br}_{0-3}\text{F}_{0-3}$  im Rahmen von 0,5 ppm erfüllte, zugeordnet. Nachdem die Formeln mit den Regeln von Kind und Fiehn überprüft wurden, wurde die Summenformel von GSH abgezogen und mit dem ursprünglich eingesetzten Substrat verglichen (Kind und Fiehn, 2007).

Von den bestimmten Formeln wurde die Summenformel von konjugiertem GSH ( $C_{10}H_{16}N_3O_6S$ ) abgezogen und die verbleibende Summenformel mit der Formel des eingesetzten Pestizides verglichen. So konnte der Teil der chemischen Komposition des Konjugates, der von dem Pestizid stammt, ermittelt werden und ermöglichte Rückschlüsse auf die Konjugation. Blieb mehr als eine putative Formel nach dem Prozess übrig, wurde die mit dem geringsten Fehler als wahrscheinlichste Variante eingestuft und zugeordnet. Vor allem einfache Konjugate, wie solche mit ATZ, Metolachlor und Alachlor, bei denen es zu einer einfachen Substitution mit GSH kommt, sollten mit dieser Methode schnell und zuverlässig identifiziert werden. Wurde GSH nur an einen Teil des Pestizides konjugiert oder wurden neben der Konjugation weitere Modifikationen eingeführt, mussten die erhaltenen Summenformeln dezidiert betrachtet werden.

### 3.3.2. Identifizierung von GSH-Konjugaten

Für den Nachweis von GSH-Konjugaten wurden schwefelmarkierte Hefekulturen mit 1-10  $\mu$ M Xenobiotikum belastet und die erhaltenen Extrakte mittels ICR-FT/MS analysiert. Die spezifischen Schwefelmassen einer Exposition wurden mit HCA herausgefiltert und ihre putative Summenformel ermittelt. Insgesamt wurden 42 mögliche Substrate auf ihre Konjugation mit GSH in *S. cerevisiae* hin untersucht (Anhang Tabelle 6.8). Bei 14 konnten spezifische Schwefelmassen nachgewiesen werden, bei denen in sechs Fällen ein GSH-Konjugat identifiziert wurde (Abbildung 3.18 A, Anhang Tabelle 6.9). Die Konjugate von GSH mit Fluorodifen, Propachlor, Fenclorim, Anilazin, 1,2-Epoxy-3-Pehnoxypropan (EPP) und BITC wurden auf diese Weise detektiert (Abbildung 3.18 B).

Zu den als negativ getesteten Substanzen, bei denen kein GSH-Konjugat nachgewiesen wurde, gehörten auch bekannte GST-Substrate wie ATZ, Metolachlor und Alachlor (Hatton *et al.*, 1996; Lamoureux *et al.*, 1970; Leavitt und Penner, 1979). Am Beispiel von ATZ wurde bereits aufgezeigt, dass die endogenen GSTs der Hefe nicht immer ausreichend waren, um das angebotene Substrat umzusetzen und es zu keinem positiven Nachweis bei der Analyse kommen konnte (siehe Abschnitt 3.1.3).



**Abbildung 3.18** In *S. cerevisiae* durch Schwefelmarkierung identifizierte GSH-Konjugate.

Mit  $^{32}\text{S}$  oder  $^{34}\text{S}$  markierte Hefekulturen wurden mit Xenobiotika für 1 h belastet und die proteinfreien Extrakte anschließend mittels ICR-FT/MS analysiert. Durch HCA wurden für eine Belastung spezifische Schwefelmassen identifiziert. Beispielhaft wurden die entsprechenden Peaks für zwei Xenobiotika, bei denen GSH-Konjugate nachgewiesen wurden, dargestellt (A). Die Analyse der Daten erfolgte wie zuvor beschrieben (siehe 3.3.1.). Auf diese Weise wurden die GSH-Konjugate von Fluorodifen, Propachlor, Fenclorim, Anilazin, 1,2-Epoxy-3-Phenoxypropan und Benzylisothiocyanat identifiziert (B). Bei Fenclorim und Anilazin ist nur eines von mehreren möglichen Stereoisomeren aufgezeigt.

Es ist bekannt, dass Xenobiotika in verschiedenen Organismen unterschiedlich abgebaut werden (Hutson, 1998; Rossini *et al.*, 1996). Ausgehend von den Ergebnissen der ICR-FT/MS-Analyse musste davon ausgegangen werden, dass Hefe entweder die getesteten Substanzen nicht mittels GSH-Konjugation detoxifiziert oder die dafür benötigten, endogenen GSTs unter den getesteten Bedingungen nicht exprimiert wurden. Dies setzte natürlich eine Aufnahme des Xenobiotikums

vorraus. Im Fall von 2,4-D ist der pH des Mediums entscheidend für die Aufnahme in die Zellen (Cabral *et al.*, 2003). Bei negativer Ionisierung, welche für den Nachweis von metabolisch modifizierten Pestiziden geeignet war, jedoch nicht für die Detektion aller ursprünglich eingesetzten Pestizide (Reemtsma *et al.*, 2013), wurden 17 von 42 getesteten Ausgangssubstanzen in den Zellextrakten nachgewiesen.

Darüber hinaus stellten die Hefeextrakte eine komplexe biologische Matrix dar, die tausende Signale enthielt. Eine Auswertung könnte aufgrund der Komplexität und der daraus resultierenden Matrixeffekte, wie Ionensuppression, erschwert gewesen sein. Madalinski und Kollegen haben gezeigt, dass die Detektion von bestimmten Metaboliten in Hefeextrakten durch direkte Injektion der Proben in eine Orbitrap-MS, ohne eine vorherige chromatographische Auftrennung, deutlich reduziert werden konnte (Madalinski *et al.*, 2008).

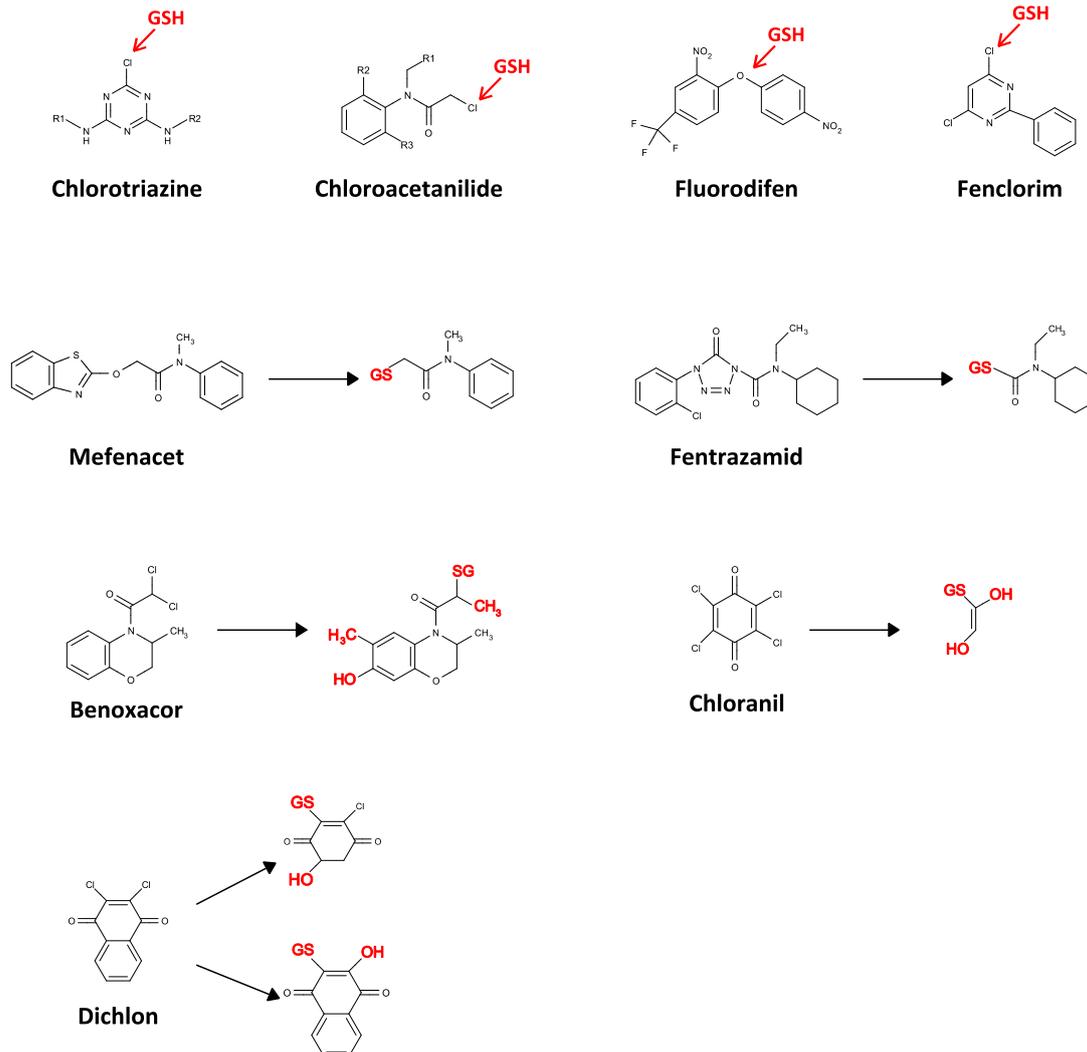
Bei der Suche nach GST-Substraten handelte es sich um ein schnelles, erstes Screening nach potentiellen Kandidaten. Daher wurde die Analyse von GST-Pools, die im Fall von ATZ zu positiven Ergebnissen geführt hat, aufgrund der deutlich erhöhten Probenanzahl, oder eine zeitaufwändige vorherige chromatographische Auftrennung, nicht präferiert. Folglich wurden alternativ zwei weitere Ansätze genutzt, um mögliche GSH-Konjugate von Pestiziden mit Hilfe der hohen Auflösung der ICR-FT/MS nachzuweisen. Zum einen wurden Konjugate nicht-enzymatisch generiert und zum anderen wurden Extrakte von Arabidopsis-Keimlingen aus Flüssigkulturen verwendet, die mit verschiedenen Pestiziden belastet wurden.

GSTs katalysieren die Reaktion von Xenobiotika mit GSH indem sie den  $pK_a$  herabsetzen, das Thiolatanion stabilisieren und den Angriff auf eine reaktive Gruppe des Substrates ermöglichen. Dies konnte chemisch durch die Mischung von Substrat und GSH und der Erhöhung des pH-Werts nahe des natürlichen  $pK_a$  von Glutathion ( $pK_a$  9) imitiert werden (Clarke, 1998). Pestizid und ein Überschuss von GSH wurden bei einem pH von 10 für 24 h inkubiert und anschließend mittels ICR-FT/MS analysiert. So konnten durch die Konjugation *in vitro* Proben schnell und einfach generiert werden und aufgrund der limitierten Anzahl eingesetzter Substanzen war die Matrix weniger komplex, als es bei biologischen Proben der Fall ist.

Während in *S. cerevisiae* die Schwefelmarkierung verwendet wurde, um Schwefelmassen zuverlässig nachweisen zu können, wurde sowohl bei den *in vitro*-Ansätzen als auch bei den Analysen der Arabidopsis-Keimlinge die natürliche Abundanz des Schwefels, die 4 % betrug, genutzt. Die anschließende Auswertung der massenspektrometrischen Daten erfolgte kongruent. Mittels HCA wurden Schwefelmassen, die spezifisch für eine Belastung waren, selektiert und diesen eine putative Formel zugewiesen und Massen mit einer Intensität, wie sie der natürlichen Verteilung der Schwefelisotope entsprechen, wurden als putative spezifische Schwefelmassen

eingestuft. Diesen Massen wurde eine mögliche Summenformel zugeordnet, wie es bereits bei den Proben aus Hefe der Fall war, um Rückschlüsse auf das Konjugat ziehen zu können.

Von 44, in der nicht-enzymatischen Reaktion mit GSH getesteten, Pestiziden konnten bei 29 spezifische Schwefelmassen identifiziert werden (Anhang Tabelle 6.10). Bei 16 Pestiziden wurde dabei das GSH-Konjugat identifiziert (Abbildung 3.19). Darunter fielen alle getesteten Pestizide aus den Klassen der Chlorotriazine und Chloroacetanilide. Zusätzlich zu diesen wurden GSH-Konjugate von Fluorodifen, Fenclorim, Mefenacet, Fentrazamid, Benoxacor, Chloranil und Dichlon identifiziert. Im Fall der Chlorotriazine, Chloroacetanilide und Fenclorim kam es zu der erwarteten Substitution durch GSH bzw. der Spaltung der Etherbindung im Fall von Fluorodifen. Auch bei Mefenacet konnten die Spaltung der Etherbindung und die Konjugation von GSH an den Acetanilid-Teil des Moleküls nachgewiesen werden. Bei Fentrazamid wurde das Molekül am Tetrazol gespalten, um die Konjugation an GSH zu ermöglichen. Eine einfache Substitution des Chloratoms durch GSH wurde auch bei Benoxacor, Chloranil und Dichlon erwartet. Schwefelmassen, die diesen Konjugaten entsprachen, wurden jedoch nicht nachgewiesen. Dafür wurden Massen identifiziert, die bei Dichlon auf eine zusätzliche Oxidation bzw. Oxidation und Methylierung bei Benoxacor, neben der Konjugation an GSH, deuteten. Bei Dichlon und Chloranil konnte zusätzlich zur GSH-Konjugation und Oxidation eine Spaltung des ursprünglichen Moleküls in Betracht gezogen werden. Diese Strukturen basierten lediglich auf den detektierten Massen und der vorausgesetzten Annahme, dass das vollständige GSH-Molekül gebunden war, und sollten durch MS<sup>n</sup> überprüft werden. Ob die Modifikationen für die Konjugation wichtig waren und auch *in vivo* stattfanden oder ob es sich dabei um eine unspezifische Reaktion aufgrund des hohen pHs in der Lösung handelte, wurde durch weitere Untersuchung dieser Substrate *in vivo* nicht verifiziert.



**Abbildung 3.19** Mögliche *in vitro* generierte GSH-Konjugate.

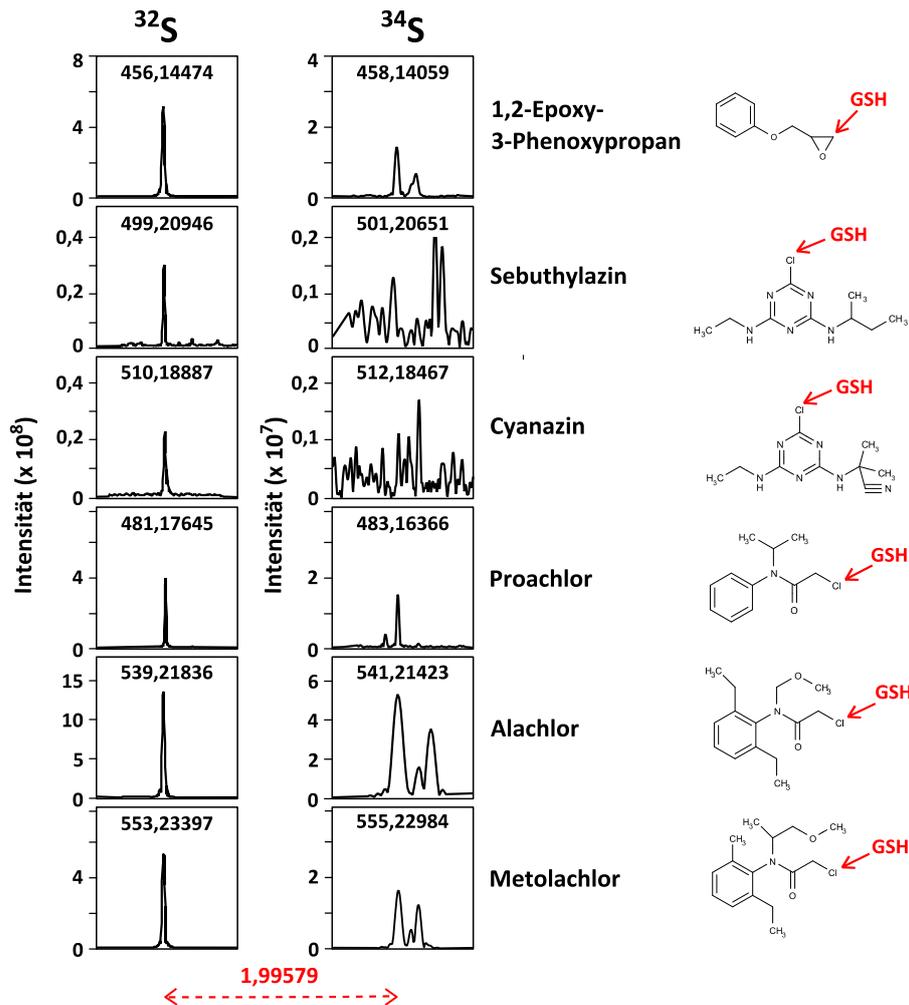
Massenspektrometrisch konnten schwefelhaltige Produkte der Inkubation von Pestizid und GSH anhand einer Masseänderung von 1,99579 u und der natürlichen Abundanz des schweren Schwefels von 4 % nachgewiesen werden. Während bei allen getesteten Chlorotriazinen, Chloroacetaniliden, Fluorodifen und Fenclorim die erwarteten Konjugate nachgewiesen wurden, kam es bei Dichlon, Benoxacor und Chloranil noch zu weiteren Modifikationen. Auch die Konjugate von Mefenacet und Fentrazamid waren vorher nicht beschrieben. Bei allen angegebenen Strukturen handelt es sich lediglich um Vorschläge, wie ein GSH-Konjugat, basierend auf der nachgewiesenen Masse, aussehen könnte, und berücksichtigt nur eine mögliche isomere Form.

Die Ergebnisse wiesen die nicht-enzymatische *in vitro*-Reaktion als geeignete Screeningmethode aus, um erste Hinweise auf mögliche GSH-Konjugate zu erhalten und im Weiteren zu analysieren. Zwei Dinge sollten dabei jedoch Beachtung finden: zum einen können die negativen Ergebnisse sowohl auf die Nachweisgrenze zurückzuführen sein, da das GSH-Konjugat ein starkes Signal ergeben musste, damit der korrespondierende Peak des schweren Isotopes nachweisbar war. Zum anderen konnten chemische Modifikationen, die *in vivo* vorkommen, *in vitro* unter den Bedingungen nicht simuliert werden. Somit bedeutet ein negatives Ergebnis im *in vitro*-Assay nicht

zwangsläufig, dass ein Xenobiotikum *in vivo* nicht als GST-Substrat verwendet wird. Auch positive Ergebnisse ließen nicht direkt auf ein GST-Substrat *in vivo* schließen, da in der lebenden Zelle die Konjugation an GSH nicht zwingend die bevorzugte Reaktion für die Substanz sein muss.

Der Nachweis der GSH-Konjugation von Pestiziden in *A. thaliana* stellte eine zusätzliche Methode zur Identifizierung von GST-Substraten dar. Arabidopsis ist in der Lage ein breites Spektrum von Substraten umsetzen können, woran maßgeblich die 57 GSTs dieser Pflanzenspezies beteiligt sein sollen (Dixon *et al.*, 2009; Krajewski *et al.*, 2013; Wagner *et al.*, 2002). Zur Überprüfung des möglichen Substratspektrums der GSTs aus Arabidopsis wurden Keimlinge in Flüssigkultur mit verschiedenen Xenobiotika, in einer Konzentration von 100 µM, 8 h lang belastet. Von 17 getesteten Pestiziden konnten bei 14 spezifische Schwefelmassen nachgewiesen werden (Anhang Tabelle 6.11). Das entsprechende GSH-Konjugat wurde dabei nach einer Belastung mit Sebuthylazin, Cyanazin, Alachlor, Metolachlor, Propachlor und EPP nachgewiesen (Abbildung 3.20). Bei der Belastung mit Fenclorim konnte zwar eine schwefelhaltige Masse, die dem GSH-Konjugat entspricht (494,09093) nachgewiesen werden, aufgrund der zu hohen Masse-Abweichung wurde in den nachfolgenden Berechnung dieser Masse jedoch nicht die entsprechenden Summenformel zugeordnet.

Die Identifizierung von GSH-Konjugaten der untersuchten Pestizide deutete auf eine Aktivität der pflanzlichen GSTs gegenüber den Xenobiotika hin. Negative Ergebnisse ließen jedoch keine unmittelbaren Rückschlüsse zu, da viele GSTs stark reguliert werden und nur durch bestimmte Stimuli induziert werden (DeRidder und Goldsbrough, 2006). So konnte in Hefe durch die Expression von AtGSTs das GSH-Konjugat von ATZ nachgewiesen werden (siehe Abschnitt 3.1.3), *in planta* wurde dieses jedoch nicht identifiziert.



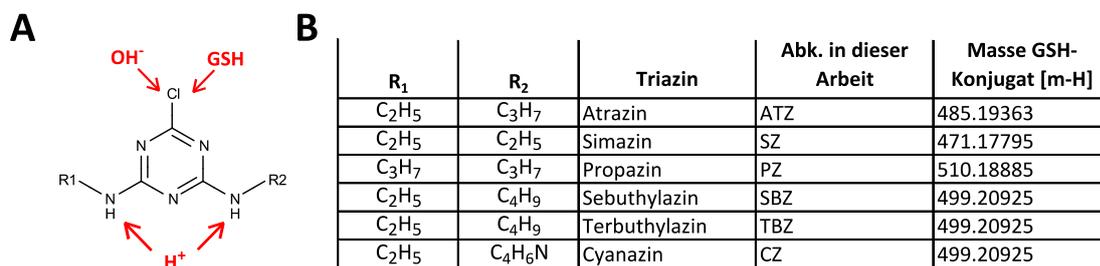
**Abbildung 3.20** Substrate, deren GSH-Konjugate nach Inkubation von Flüssigkulturen von *A. thaliana*, massenspektrometrisch nachgewiesen wurden.

Arabidopsis-Keimlinge wurden 10 d auf MS-Platten angezogen, je 15 Stück für 24 h in flüssigem  $\frac{1}{4}$  MS geschüttelt und anschließend mit einem Xenobiotikum in einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  für 8 h belastet. Die Extrakte wurden in der ICR-FT/MS in einer 1:20 Verdünnung bei 250 Scans gemessen und für eine Belastung spezifische Massen wurden mittels HCA nachgewiesen. Die natürliche Abundanz des spezifischen  $^{34}\text{S}$ -Isotops, welche 4 % betrug, wurde verwendet, um Schwefelmassen zu selektieren. Mögliche GSH-Konjugate wurden durch die Zuordnung von putativen Summenformeln identifiziert.

Jedes der drei vorgestellten Systeme hatte spezifische Vor- und Nachteile und keines konnte umfassende Ergebnisse liefern. Besonders die Analysen mit den beiden *in vivo*-Methoden resultierten häufig in negativen Ergebnissen, auch bei Substraten, deren GSH-Konjugate bereits beschrieben waren. Im Vergleich dazu konnten bei den nicht-enzymatischen *in vitro*-Reaktionen häufig GSH-Konjugate nachgewiesen werden. Auf diese Weise positiv geteste Substanzen mussten jedoch daraufhin überprüft werden, als Substrat für GSTs zu fungieren. Chloroacetanilide und Chlorotriazine wurden sowohl *in vitro* als auch in *A. thaliana* als GST-Substrate identifiziert und die Spezifität der einzelnen AtGSTs gegenüber diesen beiden Herbizidklassen sollte durch heterologe Expression in Hefe untersucht werden.

### 3.4. Aktivität von AtGSTs gegenüber Chlorotriazinen

ATZ war das erste Pestizid, bei dem die Glutathionylierung als Detoxifikationsprozess in der Pflanze beschrieben wurde (Lamoureux *et al.*, 1970; Shimabukuro *et al.*, 1970). Zu diesem Zeitpunkt wurden ATZ und weitere Chlorotriazine, wie Simazin und Chlorazin, bereits seit mehr als einem Jahrzehnt als Herbizide im Mais-Anbau verwendet (LeBaron *et al.*, 2008). Es war bekannt, dass ATZ und andere Derivate über N-Dealkylierung und Oxidation abgebaut werden (Shimabukuro *et al.*, 1966) (Abbildung 3.21). Dass die Konjugation an GSH jedoch der Grund für die Selektivität des Herbizides in Mais und Sorghumhirse war, wurde erst in den darauffolgenden Jahren klar (Shimabukuro *et al.*, 1971). In Mais wurde vermutet, dass ZmGSTI das zentrale Enzym der ATZ-Glutathionylierung ist (Timmerman, 1989). *In vitro*-Studien zeigten die höchste Aktivität des rekombinant exprimierten Proteins, jedoch gab es auch Untersuchungen, die die prominente Rolle der GSTI aus *Z. mays* nicht bestätigen konnten (Holt *et al.*, 1995; McGonigle *et al.*, 2000). Die Analyse aller GSTs aus *Arabidopsis* im Hefesystem ermöglichte detaillierte Einblicke in die Aktivität und Spezifität einzelner pflanzlicher GSTs gegenüber Chlorotriazinen.



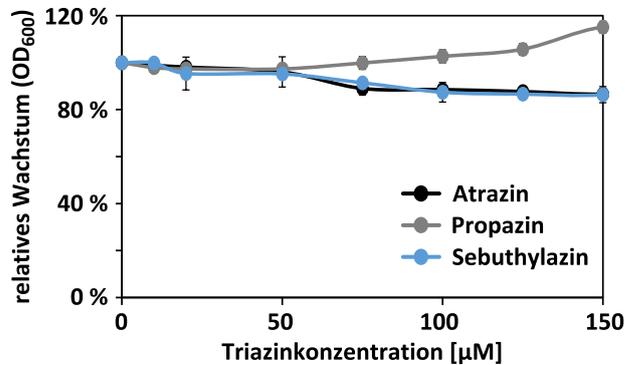
**Abbildung 3.21 Allgemeine Struktur und Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Chlorotriazine.**

Grundlegend gemeinsam war allen Triazinen ein 1,3,5-Triazinring. An diesen waren bei den Chlorotriazinen ein Chloratom und zwei Aminogruppen gebunden. Die einzelnen Chlorotriazine unterschieden sich in den Alkyl-Resten der Aminogruppen (B). Die Detoxifizierung dieser Substanzen in Pflanzen konnte durch Oxidation oder Glutathionylierung am Chloratom oder durch N-Dealkylierung an einer oder beiden Aminogruppen erfolgen (A). Die in der Arbeit verwendeten Abkürzungen und die zu erwartende Masse des entsprechenden GSH-Konjugats sind der Tabelle zu entnehmen (B).

#### 3.4.1. Aktivität von AtGSTs gegenüber Chlorotriazinen in Hefe

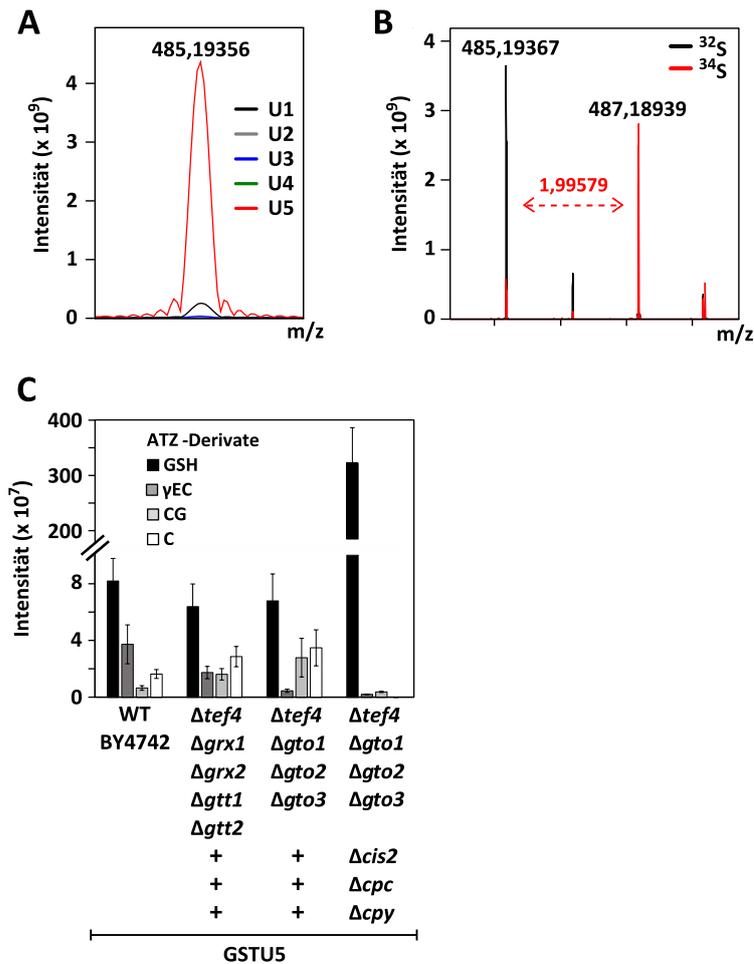
Eine Voraussetzung für die Analyse aller 57 AtGSTs in *S. cerevisiae* war eine ausreichende Resistenz des verwendeten Hefestammes gegenüber dem Pestizid. Auch wenn Chlorotriazine gegen das Photosystem II der Pflanzen gerichtet sind, konnten negative Effekte aufgrund sekundärer Reaktionen in Hefe nicht ausgeschlossen werden. Das Wachstum der generierten Deletionsmutante  $\Delta tef4\Delta gto1\Delta gto2\Delta gto3\Delta cis2\Delta cpc\Delta cpy$  veränderte sich in Medium, welches mit unterschiedlichen Konzentrationen von Chlorotriazinen versetzt war, geringfügig (Abbildung 3.22).

Das gleiche galt für den WT und andere untersuchte Deletionsmutanten (Daten nicht gezeigt). In diesen Versuchen zeigte sich jedoch, dass ATZ ab einer Konzentration von 100  $\mu\text{M}$  im Medium ausfiel, bei Propazin und Sebuthylazin lag diese Grenze bei 150  $\mu\text{M}$ .



**Abbildung 3.22 Wachstum von *S. cerevisiae* in unterschiedlich konzentriertem Triazin-haltigem Medium.**  $\Delta\text{tef4}\Delta\text{gto1}\Delta\text{gto2}\Delta\text{gto3}\Delta\text{cis2}\Delta\text{cpc}\Delta\text{cpy}$ , transformiert mit einem Leervektor, wurde in Minimalmedium mit 2 % Saccharose von Platte angeimpft und über Nacht inkubiert. Aus dieser Vorkultur wurde Medium mit Galaktose auf eine  $\text{OD}_{600}$  von 0,06 angeimpft und nach 4 h Kultivierung für weitere 20 h mit verschiedenen Konzentrationen Atrazin, Propazin und Sebuthylazin versetzt. Die Endkonzentration des Lösungsmittels DMSO betrug dabei immer 0,05 %. Das Wachstum wurde durch die Messung der  $\text{OD}_{600}$  bestimmt. Die Lösungsmittelkontrolle ohne Triazinherbizid wurde auf 100 % gesetzt. Die Standardabweichung setzte sich aus drei unabhängigen Proben zusammen.

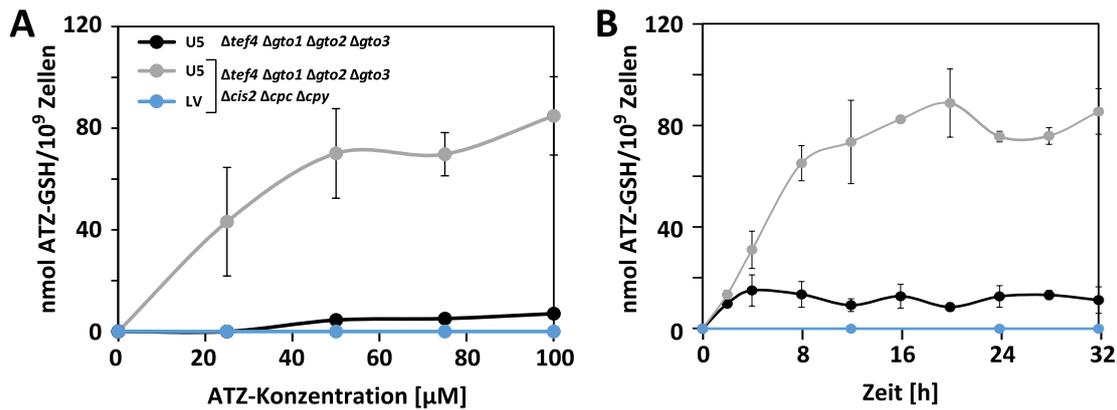
Da in den vorangegangenen massenspektrometrischen Untersuchungen klar wurde, dass die endogenen GSTs aus *S. cerevisiae* nicht die GSH-Konjugation von ATZ katalysieren, wurde für die anfänglichen Versuche ein Hefestamm, der eine ATZ-aktive AtGST exprimiert, verwendet (Abbildung 3.23). Die Analyse der Einzelmutanten aus dem Pool der AtGSTs U1 bis U5 (Abbildung 3.9) ergab, neben einer geringen Aktivität der GSTU1, eine deutliche Aktivität der GSTU5 (Abbildung 3.23 A). Durch die Schwefelmarkierung der Hefekultur, die die GSTU5 exprimiert, wurde in der ICR-FT/MS nachgewiesen, dass es sich bei der Masse 485,19367 um einen Metaboliten mit einem Schwefelatom handelte (Abbildung 3.23 B). Diese Masse war spezifisch für die Belastung mit ATZ und entsprach zudem der vorhergesagten Masse des ATZ-GSH-Konjugates. Die Expression der GSTU5 in verschiedenen Deletionsmutanten der Hefe zeigte einen leicht verminderte Konjugation durch die Deletion der Hefe-eigenen GSTs im Vergleich zum WT, die durch die zusätzliche Deletion der Katabolismogene zu einer mehr als zehnfachen Akkumulation von ATZ-GSH und einem fast vollständigen Verlust der assoziierten Abbauprodukte führte (Abbildung 3.23 C).



**Abbildung 3.23 Nachweis des ATZ-GSH-Konjugats in GST-exprimierender *S. cerevisiae*.**

Massenspektrometrisch wurde das Konjugat ATZ-GSH in Extrakten von Hefemutanten *Δtef4Δgto1Δgto2Δgto3Δcis2ΔcpcΔcpy*, die jeweils eine Tau-GST, U1, U2, U3, U4 oder U5, exprimierten, nachgewiesen (A). Dass es sich tatsächlich um das Konjugat handelte, wurde durch den Massenunterschied aufgrund des Wachstums der GSTU5-exprimierenden *S. cerevisiae* in ATZ-haltigem Medium mit <sup>32</sup>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> bzw. <sup>34</sup>SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> nachgewiesen (B). Die Expression der GSTU5 in verschiedenen Mutanten ergab ein spezifisches Muster des ATZ-Konjugatabbaus (C). Für alle Proben wurden drei Hefekulturen mit 50 μM ATZ für 24 h belastet und die methanolischen Extrakte in einer 1:10 Verdünnung für 250 Scans in der ICR-FT/MS analysiert.

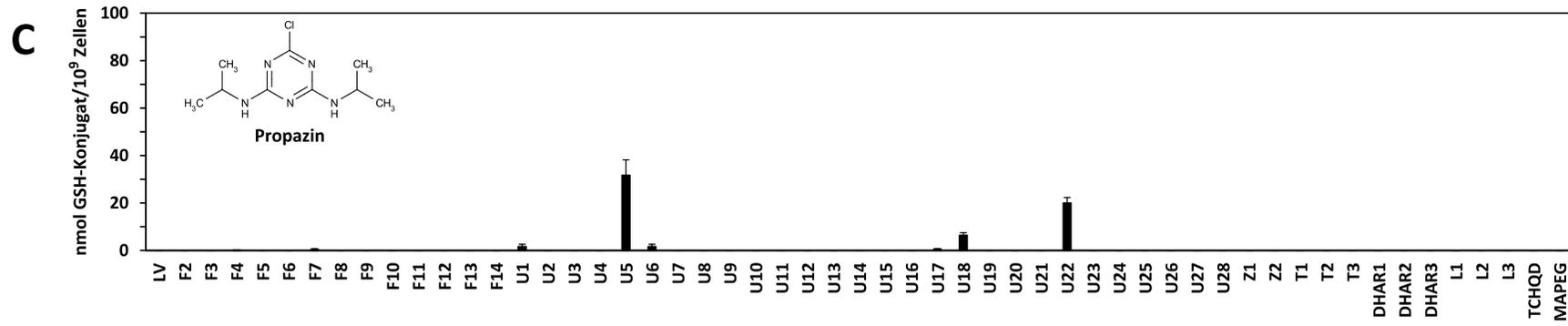
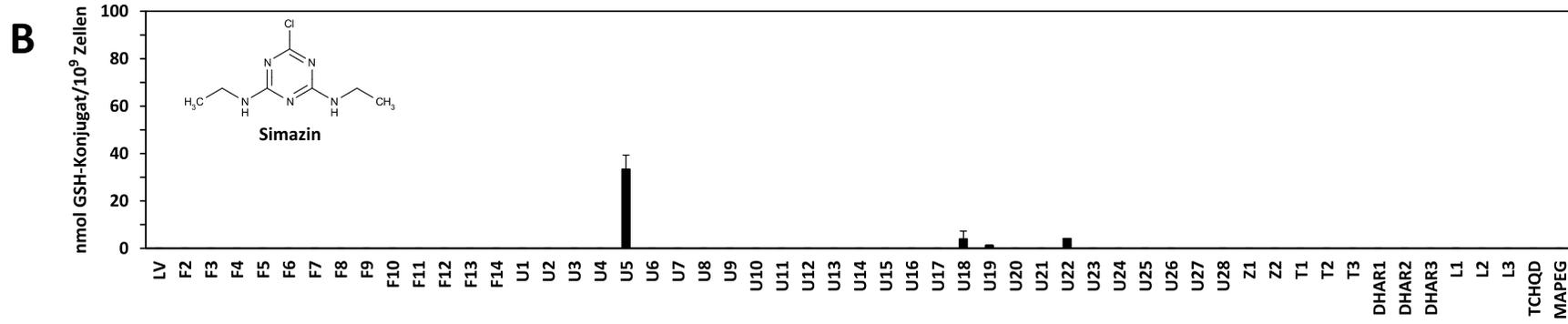
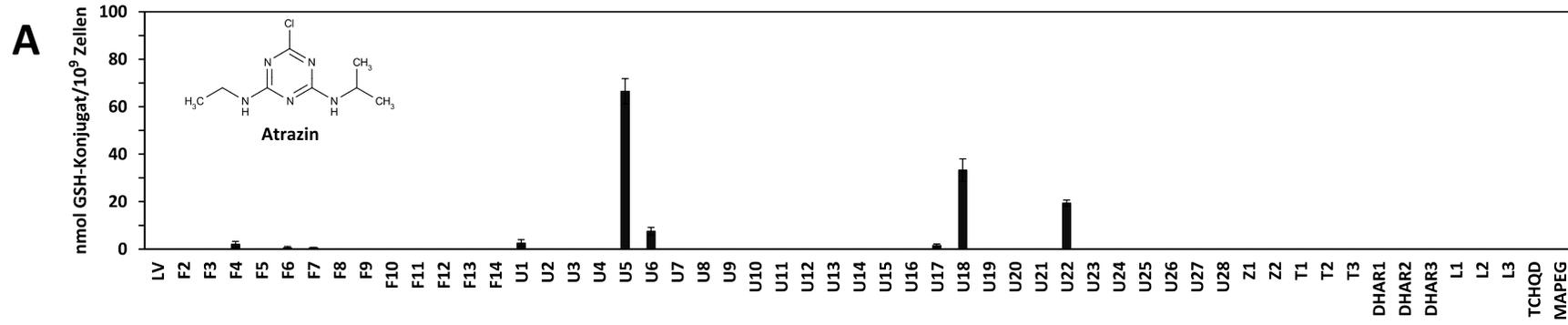
Der GSTU5 exprimierende Stamm *Δtef4Δgto1Δgto2Δgto3Δcis2ΔcpcΔcpy* diente auch der anschließenden Optimierung des HPLC-Laufes und der Bestimmung von Belastungskonzentration und -dauer (Abbildung 3.24). Als Kontrollen dienten hier zum einen der Leervektor und zum anderen die Expression der GSTU5 in *Δtef4Δgto1Δgto2Δgto3*. Ausgehend von diesen Vorversuchen wurden 54 AtGSTs für 24 h mit einer Konzentration von 50 μM Chlorotriazin belastet. Während die Klasse der GHRs nicht mit einbezogen wurde, da in vorangegangenen Versuchen keine GST-Aktivität in Hefe nachgewiesen werden konnte (A. Kutschera, unveröffentlicht), wurde MAPEG aus Arabidopsis analysiert.

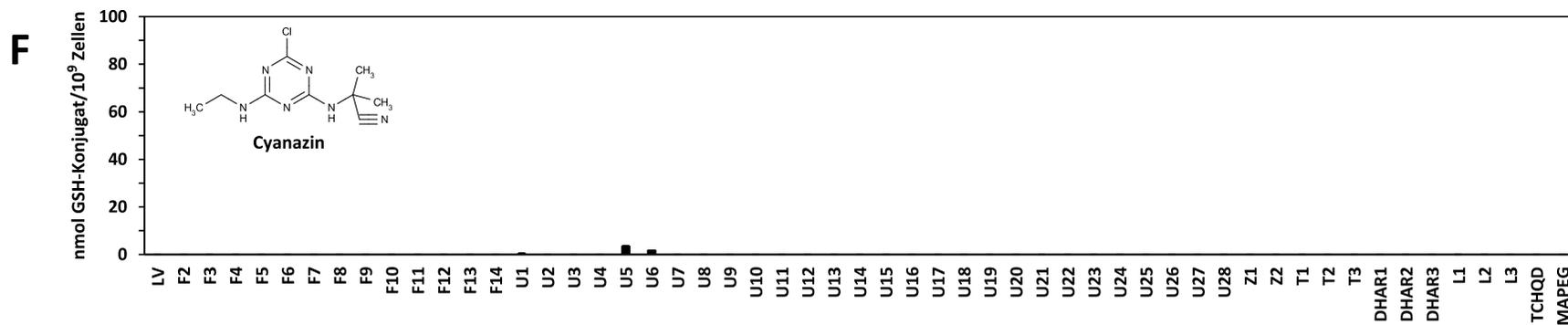
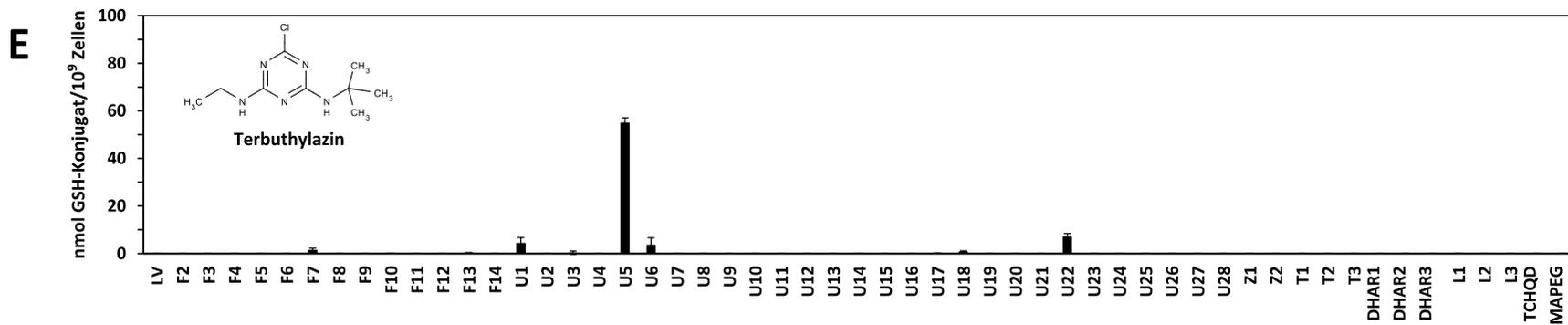
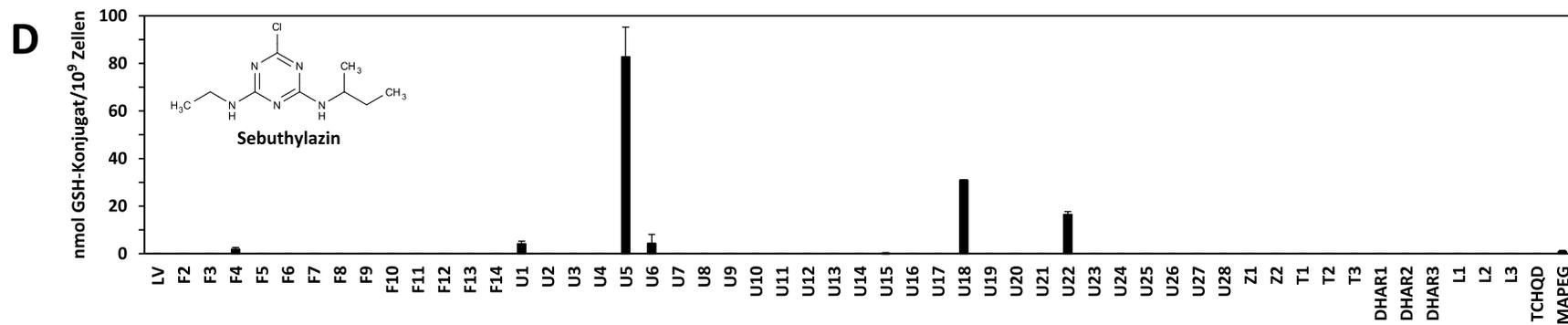


**Abbildung 3.24 Bestimmung von Belastungsdauer und -konzentration der Chlorotriazine in Hefe.**

Die gegenüber ATZ aktive GSTU5 wurde in den Hefemutanten  $\Delta tef4 \Delta gto1 \Delta gto2 \Delta gto3$  und  $\Delta tef4 \Delta gto1 \Delta gto2 \Delta gto3 \Delta cis2 \Delta cpc \Delta cpy$  auf die Menge des gebildeten ATZ-GSH-Konjugates abhängig von ATZ-Konzentration (A) und Zeit (B) hin untersucht. Als Kontrolle diente der Leervektor (LV) im  $\Delta tef4 \Delta gto1 \Delta gto2 \Delta gto3 \Delta cis2 \Delta cpc \Delta cpy$ -Hintergrund. Je drei Proben pro Konzentration wurden nach vierstündiger Vorinkubation in Minimalmedium mit Galaktose für weitere 24 h mit ATZ belastet. Für die Zeitreihe wurde eine über Nacht-Kultur in Minimalmedium mit Galaktose auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 verdünnt und je drei Proben pro Zeitpunkt mit 50 µM ATZ so belastet, dass die Gesamtkultivierung jeder Probe 32 h betrug. Das gebildete Konjugat in den Proben wurde mittels HPLC bei 264 nm quantifiziert.

Neben ATZ wurden auch die verwandten Strukturen Simazin (SZ), Propazin (PZ), Sebuthylazin (SBZ), Terbutylazin (TBZ) und Cyanazin (CZ) auf die Konjugationsaktivität der AtGSTs hin untersucht (Abbildung 3.25). Der Nachweis von Konjugaten in methanolischen Extrakten belasteter Hefezellen mittels HPLC wurde durch Vergleich eines synthetisierten Standards und MS-Analyse der isolierten HPLC-Peaks verifiziert. Dabei ergab sich ein ungewöhnlich stringentes Aktivitätsmuster der pflanzlichen GSTs. Lediglich drei Tau-GSTs zeigten eine deutliche Aktivität gegenüber Chlorotriazinen, GSTU5, GSTU18 und GSTU22. Dabei war die GSTU5 gegenüber allen sechs untersuchten Chlorotriazinen unter allen 55 AtGSTs stets die GST, bei der die höchste Menge Konjugat nachgewiesen wurde. Im Gegensatz dazu war die Aktivität von GSTU18 und GSTU22 variabel und vom jeweiligen Substrat abhängig. So war die Glutathionylierung von ATZ und SBZ durch die Aktivität von GSTU18 deutlich höher als durch GSTU22, während im Fall von PZ und TBZ als Substrat die GSTU22 die höhere Aktivität aufwies. GSTU1 und GSTU6 zeigten bei allen Substraten, mit Ausnahme von SZ, Aktivität. GSTU17 wies lediglich bei Belastung mit ATZ und PZ einen geringen Umsatz auf. GSTF4 und GSTF7 waren die einzigen GSTs der Phi-Klasse, durch deren Expression in Hefe eine Glutathionylierung von Chlorotriazinen nachgewiesen wurde. Bei einem Großteil der getesteten GSTs aus *A. thaliana* konnte mit keinem der getesteten Substrate ein GSH-Konjugat nachgewiesen werden. Die Nachweisgrenze lag dabei zwischen 0,05 und 0,1 nmol.

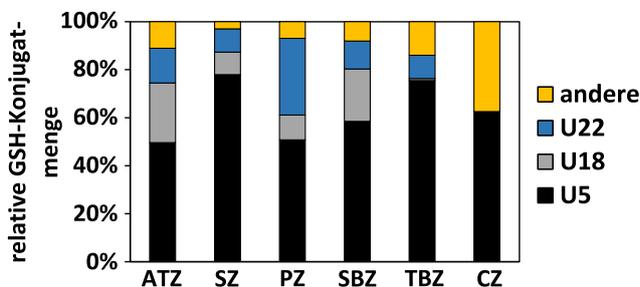




**Abbildung 3.25 Aktivität von, in Hefe exprimierten, AtGSTs gegenüber Chlorotriazinen.**

AtGSTs wurden unter einem Galaktose-induzierbarem Promotor in der Hefemutante *Δtef4Δgto1Δgto2Δgto3Δcis2ΔcpcΔcpy* exprimiert und die Kulturen nach einer vierstündigen Phase in Galaktose-haltigem Medium mit 50 μM Chlorotriazin für 24 h belastet. Bei den getesteten Herbiziden handelte es sich um die Chlorotriazine Atrazin (A), Simazin (B), Propazin (C), Sebuthylazin (D), Terbutylazin (E) und Cynazin (F). Die Metabolite der Hefezellen wurden durch methanolischen Aufschluss gewonnen und die GSH-Konjugate der einzelnen Herbizide in der HPLC bei 264 nm quantifiziert. Die Nachweisgrenze betrug dabei 0,1 nmol bei ATZ, SBZ, TBZ und CZ bzw. 0,05 nmol bei SZ und PZ. Als Kontrolle diente der Leervektor (LV). Die Analyse erfolgte in unabhängigen Triplikaten.

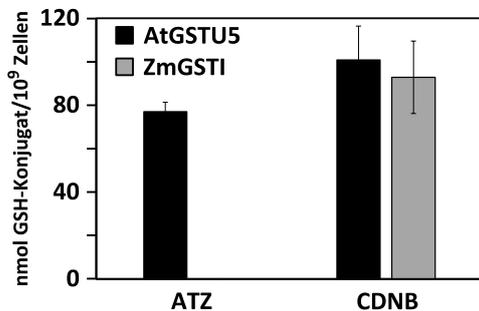
Die GSH-Konjugate von ATZ und SBZ konnten in vergleichbaren Mengen in *S. cerevisiae* nachgewiesen werden, während die umgesetzte Menge von PZ und TBZ lediglich etwa die Hälfte betrug. Der Umsatz von SZ und CZ war noch einmal geringer. Eine schlechtere Aufnahme dieser Substanzen in die Zellen konnte dabei nicht vollständig ausgeschlossen werden. Die geringe Aktivität von Cyanazin könnte mit der Reaktivität der Cyanogruppe zusammenhängen. Der prozentuale Anteil der GSTs U5, U18 und U22 an der Gesamtaktivität aller AtGSTs betrug bei allen Substraten, mit Ausnahme von CZ, mehr als 85 % (Abbildung 3.26). Dabei zeigte sich eine Parallele im Aktivitätsmuster zwischen ATZ und SBZ, bei denen ca. 50 % der Gesamtaktivität durch die GSTU5 gedeckt wurden, 25 % auf die GSTU18 zurückzuführen waren und lediglich ca. 10 % auf GSTU22 entfielen. Im Fall von SZ und TBZ war die GSTU5 deutlich aktiver, mehr als 75 % der Gesamtaktivität gegenüber diesen beiden Herbiziden entfiel auf diese GST.

**Abbildung 3.26 Anteil der GSTs U5, U18 und U22 an der Gesamtaktivität aller AtGSTs gegenüber Chlorotriazinen.**

Der Anteil der aktiven GSTs U5, U18 und U22 an der aufsummierten Aktivität aller AtGSTs gegenüber den einzelnen Chlorotriazinen wurde aus den Daten der Einzelaktivitäten (Abb. 3.23) ermittelt, um eine bessere Vergleichbarkeit der Aktivitätsmuster gegenüber verschiedenen Chlorotriazinherbiziden zu generieren.

Die GSTI aus *Z. mays* wurde häufig als die zentrale GST, die für die natürliche Resistenz von Mais gegenüber ATZ verantwortlich ist, beschrieben (Timmerman, 1989). *In vitro* Studien haben gezeigt, dass heterolog exprimierte ZmGSTI unter zwölf untersuchten Mais-GSTs die höchste Aktivität gegenüber ATZ aufweist (McGonigle *et al.*, 2000). Um die Aktivität der GSTU5 aus Arabidopsis einordnen zu können, wurde die ZmGSTI kloniert, im Hefesystem getestet und die Aktivitäten der beiden GSTs verglichen. Es konnte keine Glutathionylierung von ATZ durch die ZmGSTI nachgewiesen werden, während die Aktivität der GSTU5 erneut reproduziert werden konnte

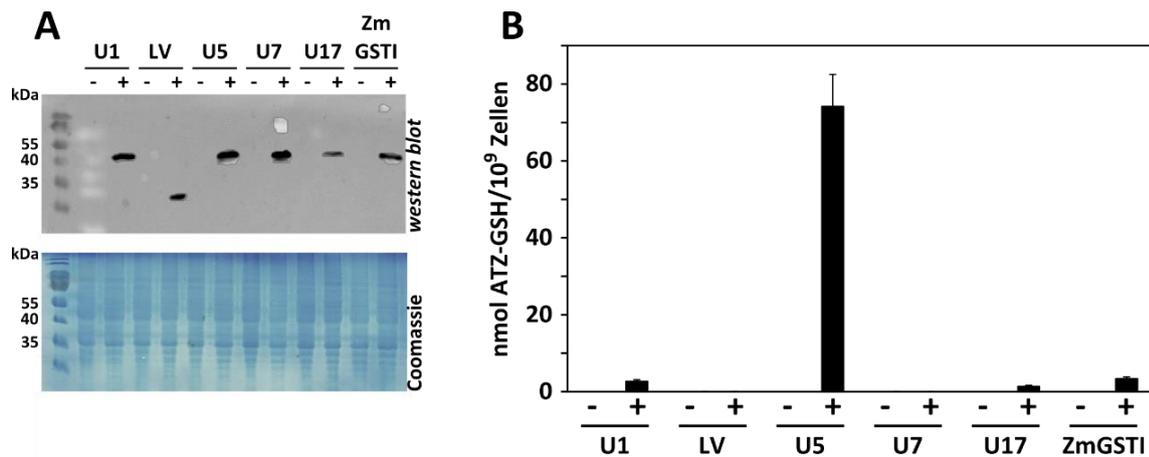
(Abbildung 3.27). Durch die Belastung der GST-exprimierenden Hefestämme mit dem Standardsubstrat CDNB wurde die Funktionalität der ZmGSTI sichergestellt. Dabei zeigte sich ein vergleichbarer Umsatz durch die Enzyme aus Mais und Arabidopsis.



**Abbildung 3.27 Vergleich der Aktivität von AtGSTU5 und ZmGSTI.**

Die Konjugation von ATZ und CDNB an GSH durch die Expression von AtGSTU5 bzw. ZmGSTI in *S. cerevisiae* wurde analysiert. Die Belastung erfolgte mit einer Konzentration von 50  $\mu$ M für 24 h mit ATZ bzw. 2 h mit CDNB. Menge des gebildeten GSH-Konjugates wurde mittels HPLC bei 264 nm (ATZ) und 340 nm (CDNB) bestimmt. Die Analyse erfolgte in Triplikaten.

Varianzen aufgrund unterschiedlich stark exprimierter GSTs, sowohl bei den einzelnen AtGSTs untereinander als auch im Vergleich zur ZmGSTI, wurden ausgeschlossen, indem die GSTs als GFP-Fusionsproteine in *S. cerevisiae* exprimiert und getestet wurden. Das während des methanolischen Aufschlusses erhaltene Zellpellet wurde für einen *western blot* mit GFP-Antikörpern verwendet, sodass synchron sowohl die Menge an GFP-markierter GST als auch die Menge von gebildetem Konjugat in einer Probe bestimmt wurden (Abbildung 3.28). Alle untersuchten Proteine konnten unter induzierenden Bedingungen mittels GFP-Antikörper nachgewiesen werden, wobei die Signale der Fusionsproteine von GSTU17 und ZmGSTI schwächer waren als bei den anderen vier Proben (Abbildung 3.28 A). Das Signal des Leervektors (LV) zeigte wie erwartet das kleinere GFP-Protein, die anderen Proben das GFP:GST-Fusionsprotein. Im Saccharose-haltigem Medium, in denen keine Galaktose vorhanden war, wurden keine Fusionsproteine nachgewiesen. Das vollständige Fehlen der pflanzlichen GSTs in Saccharose-Medium wurde auch bei der Analyse der proteinfreien Extrakte der Proben, die die gebildeten GSH-Konjugate enthielten, deutlich. Neben allen Proben, die mit Saccharose als Kohlenstoffquelle kultiviert wurden, wurde auch in den Galaktose-induzierten Proben des Leervektors und der GSTU7 kein Konjugat nachgewiesen (Abbildung 3.28 B). Die Fusionsproteine von GSTU1, GSTU5 und GSTU17 zeigten die gleiche Menge gebildetes ATZ-GSH wie die in Hefe exprimierten Proteine ohne GFP (Abbildung 3.25). Im Gegensatz zu den vorangegangenen Versuchen konnte durch die Expression von GFP:ZmGSTI eine geringe Menge GSH-Konjugat nachgewiesen werden, welche jedoch deutlich geringer war als bei GSTU5. Es blieb unklar, ob die Fusion der ZmGSTI an GFP zu einer erhöhten Transkription oder Stabilität des Proteins beitrug.

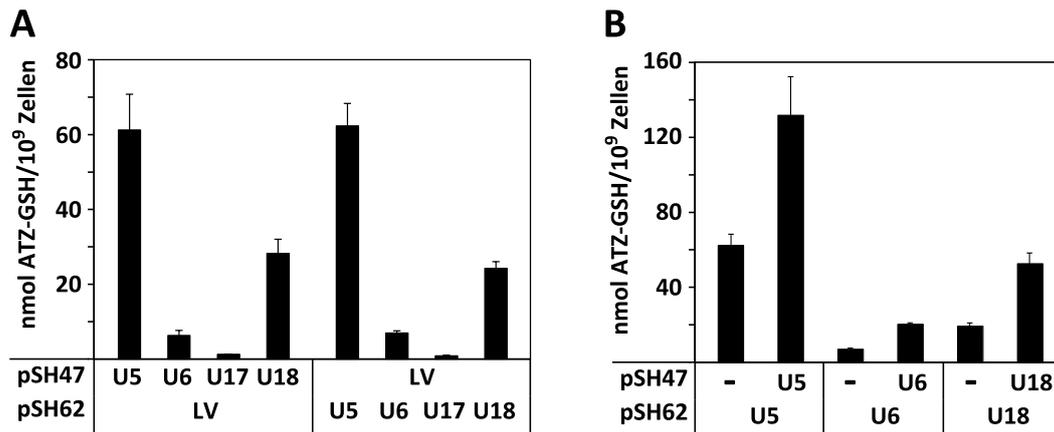


**Abbildung 3.28 Proteinnachweis und Aktivität von GSTs gegenüber ATZ in *S. cerevisiae*.**

GSTs wurden als C-terminale Fusionsproteine mit GFP in Hefe unter Galaktose-induzierbarem Promotor exprimiert. Hefezellen wurden in Minimalmedium mit Saccharose (-) oder mit Galaktose (+) kultiviert und für 24 h mit 50  $\mu$ M ATZ belastet. Es wurde bei allen Proben die gleiche Menge Hefe geerntet ( $4,6 \times 10^8$  Zellen). Nach der methanolischen Extraktion der Proben wurde die im Zellpellet enthaltenen Proteine mittels SDS-Page aufgetrennt und die Fusionsproteine anhand des GFP-Antikörpers und eines sekundären Maus-Antikörpers im anschließenden *western blot* nachgewiesen (A). Die aufgetragene Gesamtproteinmenge entsprach 20 mg ( $\pm 2$  mg) und wurde auf einer separaten SDS-Page mittels Coomassie-Färbung überprüft. Der methanolische Überstand der Extrakte wurde in der HPLC auf das Vorkommen des ATZ-GSH-Konjugates hin untersucht (B). Der Leervektor (LV), welcher nur für GFP kodierte, diente als Kontrolle. Für den *western blot* wurde eine von drei Proben analysiert.

#### 3.4.2. Aktivität coexprimierter AtGSTs in *S. cerevisiae*

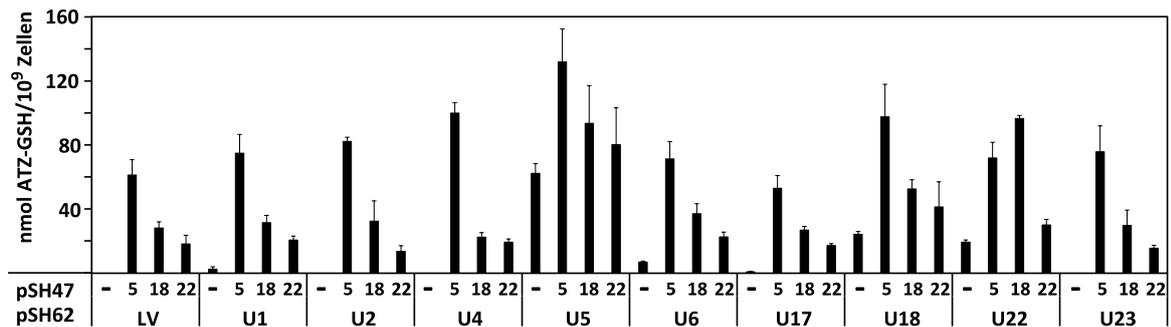
Die Dimerisierung kann eine wichtige Rolle bei der Aktivität von GSTs spielen. Die Aktivität der GSTs kann durch ihre Heterodimerisierung variiert werden (Dixon *et al.*, 1997). Im Fall von GSTII aus *Z. mays* zeigte die Heterodimerisierung eine höhere Aktivität als die Aktivität der entsprechenden Homodimere vermuten ließe (Sommer und Böger, 1999). Die Möglichkeit der Coexpression mehrerer pflanzlicher GSTs in *S. cerevisiae* ermöglichte es, den Effekt einer möglichen Heterodimerisierung zu untersuchen (Kilili *et al.*, 2004). Als Beispiel diente die Aktivität der GSTU5, GSTU18 und GSTU22 gegenüber ATZ in Kombination mit weiteren GSTs aus *A. thaliana*. Für die Selektion beider Enzyme in Hefe wurden die zu untersuchenden GSTs in den Vektor pSH47 umklontiert. Die Aktivität der einzelnen GST gegenüber ATZ war unabhängig von dem Vektor, auf welchem das Gen kodiert war (Abbildung 3.29 A). Wurde *S. cerevisiae* mit zwei Vektoren, die die Sequenz für die gleiche GST enthielten, transformiert, wurde die doppelte Menge ATZ-Konjugat im Vergleich zu den Zellen, die nur ein Plasmid trugen, nachgewiesen (Abbildung 3.29 B).



**Abbildung 3.29** Auswirkung der Coexpression von ausgewählten GSTs auf die Aktivität gegenüber ATZ in Hefe.

Untersucht wurde zum einen die Abhängigkeit der GSH-Konjugation von ATZ durch die Verfügbarkeit der kodierenden Sequenz auf zwei verschiedenen Vektoren, pSH47 (*URA3*-Marker) und pSH62 (*HIS3*-Marker) (A). Dafür wurde *S. cerevisiae* mit einem entsprechendem Leervektor (LV) und einer GST im jeweils anderen Vektor transformiert. Zum anderen wurde der Effekte der Coexpression einer GST von zwei verschiedenen Vektoren auf die Menge des gebildeten ATZ-GSH untersucht (B). Als Vergleich diente hier die einfach transformierte Hefekultur, bei der nur der pSH62 und kein pSH47 (-) vorhanden war. Für die Analyse wurden je drei unabhängige Hefekulturen in Minimalmedium mit Galaktose kultiviert und nach vierstündiger Inkubation für 24 h mit 50  $\mu$ M ATZ belastet. Das gebildete ATZ-GSH wurde in den methanolischen Extrakten der Proben mittels HPLC bei 264 nm quantifiziert.

So wurden die aktiven GSTs U5, U18 und U22 jeweils mit einer weiteren GST exprimiert und die Menge glutathionyliertes ATZ mittels HPLC bestimmt. Als coexprimierende Enzyme wurden zum einen die aktiven GSTs selbst als auch nah verwandte GSTs bzw. GSTs, die eine geringe Aktivität im Einzelnachweis zeigten, wie die GSTU1, GSTU6 und GSTU17, ausgewählt (Abbildung 3.25). Die Analyse erfolgte nur mit GSTs der Klasse Tau, da eine Dimerisierung mit GSTs einer anderen Klasse ausgeschlossen wurde (Frova, 2006). Dabei zeigten sich bei fast allen getesteten Kombinationen additive Effekte der beiden exprimierten GSTs (Abbildung 3.30). Ausnahmen bildeten die Proben bei denen GSTU5 beteiligt war und die Kombination der GSTU18 mit GSTU22. Die zweifache Expression der GSTU5 wies die erwartete Verdopplung der ATZ-GSH-Menge auf, während alle weiteren Coexpressionen mit GSTU5, mit Ausnahme der GSTU17, tendenziell eine höhere Aktivität aufwiesen als es durch die Einzelaktivitäten der zweiten GST erwartet wurde. Außerdem sollte die Coexpression der GSTU22 im Vektor pSH62 genauer betrachtet werden. Die Expression dieser GST zusammen mit der GSTU5 bzw. GSTU22 zeigten eine geringere ATZ-Konjugation als erwartet, während die Expression dieser GST zusammen mit der GSTU18 eine deutlich höhere Aktivität aufwies. Da dies in der umgekehrten Kombinationen, in denen die GSTU5 bzw. GSTU18 im pSH62 vorlagen, nicht der Fall war, sollte dies erneut analysiert werden, um sicher zu stellen, dass es sich hierbei um reproduzierbare Ergebnisse handelte.



**Abbildung 3.30 Coexpression zweier AtGSTs in *S.cerevisiae*.**

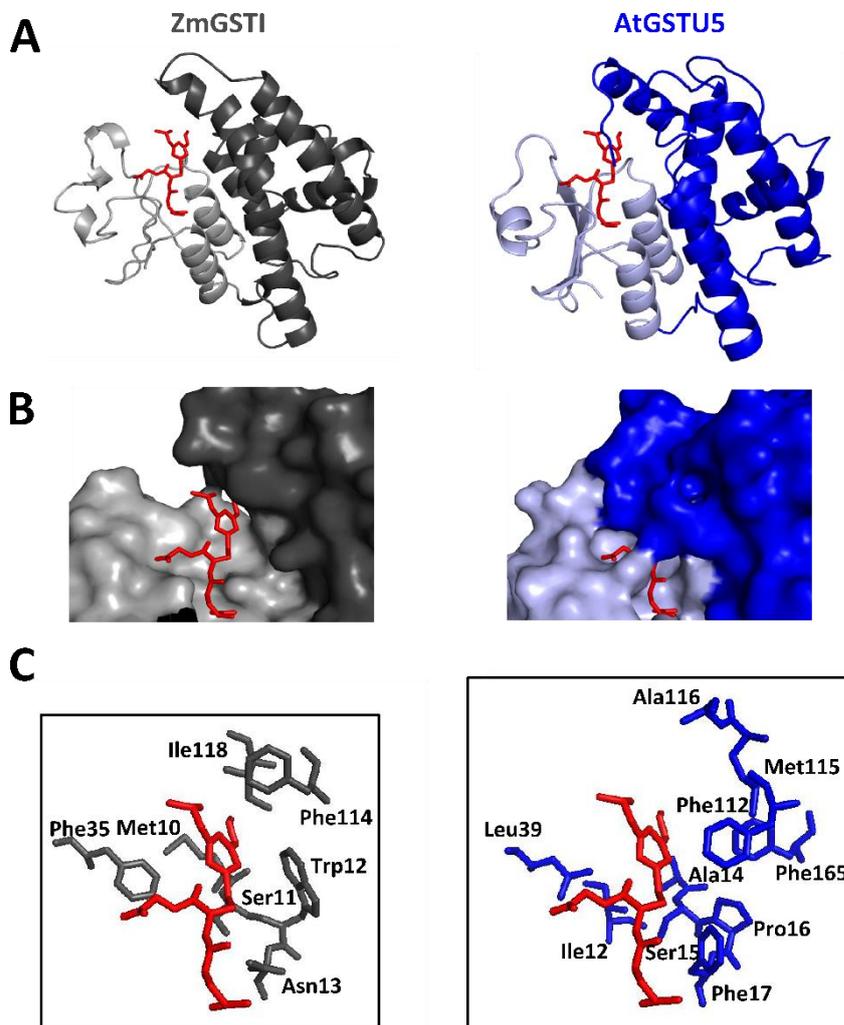
AtGSTs wurden entweder im pSH47 (*URA3*-Marker) oder im pSH62 (*HIS3*-Marker) in die *S. cerevisiae*-Mutante  $\Delta tef4\Delta gto1\Delta gto2\Delta gto3\Delta cis2\Delta cpc\Delta cpy$  eingebracht. Beide Plasmide ermöglichen eine Galaktose-induzierbare Expression der GSTs. Die Hefekulturen wurden nach einer vierstündigen Wachstumsphase mit 50  $\mu$ M ATZ für 24 h belastet. Die proteinfreien methanolischen Extrakte wurden in der HPLC bei 264 nm auf die Menge des gebildeten ATZ-GSH-Konjugates hin untersucht. Die Standardabweichungen ergaben sich aus drei unabhängigen Proben.

### 3.4.3. An der ATZ-Bindung beteiligte Aminosäuren der GSTU5

Durch die prominente Resistenz von Mais gegenüber Chlorotriazinen aufgrund der erhöhten Glutathionylierung dieser Substanzen wurden vor allem die GSTs dieser Spezies intensiv erforscht. Die verfügbare Kristallstruktur von ZmGSTI mit gebundenem ATZ-GSH-Molekül ermöglichte detaillierte Einblicke in die Struktur der Bindetasche (Prade *et al.*, 1998). Auf Grundlage dieser Arbeit konnten einzelne Aminosäuren bestimmt werden, die einen entscheidenden Einfluss auf die Bindung von ATZ bzw. Auswirkung auf die Konjugation an GSH haben (Labrou *et al.*, 2004; Neufeind *et al.*, 1997).

Die Kristallstruktur von ZmGSTI zeigte ein Homodimer, welches ein sehr großes, offenes aktives Zentrum hat, in dem ATZ gebunden ist (Prade *et al.*, 1998) (Abbildung 3.31 A). Neben den Aminosäuren, die für die Bindung von GSH zuständig waren, Ser11, Arg16, His40, Lys41, Gln53 und Ser67, waren vor allem Met10, Trp12, Asn13, Phe35, Phe114 und Ile118 entscheidend bei der Konjugation von ATZ an GSH in ZmGSTI beteiligt (Labrou *et al.*, 2001; Prade *et al.*, 1998). Der Austausch von Trp12, Phe35 und Ile118 reduzierte die Affinität des Enzyms gegenüber ATZ (Labrou *et al.*, 2005). Mit Hilfe der Software Phyre2 konnte auf Grundlage aller bisherigen GST-Kristallstrukturen eine mögliche dreidimensionale Struktur der GSTU5 vorhergesagt werden (Kelley *et al.*, 2015). Im Vergleich zur ZmGSTI zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Zugänglichkeit des aktiven Zentrums (Abbildung 3.31 B). Während in ZmGSTI das Reaktionszentrum eine offene Lücke bildete, war dieses in der GSTU5 durch den C-Terminus des Proteins abgeschirmt (Abbildung 3.31 B). Der Vergleich dieser putativen Struktur mit der bekannten ZmGSTI-Struktur und die Betrachtung der Aminosäuren nahe des katalytisch aktiven Ser15 in GSTU5 ergab folgende, putativ

an der Bindung von ATZ beteiligten Aminosäuren: Ile12, Ala14, Ser15, Pro16, Phe17, Leu39, Phe112, Met115, Ala116 und Phe165.



**Abbildung 3.31** An der Bindung von ATZ beteiligte Aminosäuren in ZmGSTI und potentielle Aminosäuren in AtGSTU5.

ZmGSTI wurde zusammen mit dem Konjugat ATZ-GSH (rot) (1BYE) kristallisiert und hier als Monomer dargestellt (Prade1998). Das Modell der putativen Kristallstruktur der AtGSTU5, die anhand der Software Phyre2 vorhergesagt wurde, wurde daneben in blau dargestellt (Kelley *et al.*, 2015) (A). Der N-terminale Teil der Proteine wurde dabei in einem helleren Ton und der C-terminale Teil in einem dunkleren Ton gefärbt. Die Oberflächendarstellung zeigte die große, leicht zugängliche Bindetasche für ATZ in der ZmGSTI (B). Im Gegensatz dazu wurde die Bindestelle in dem vorhergesagten Modell der AtGSTU5 durch den C-Terminus des Proteins verdeckt. Die an der Bindung von ATZ in der ZmGSTI beteiligten Aminosäuren und die Aminosäuren im aktiven Zentrum der AtGSTU5, die, basierend auf dem Vergleich mit der Struktur der ZmGSTI, potentiell an der Bindung von ATZ beteiligt sein könnten, wurden aufgezeigt (C).

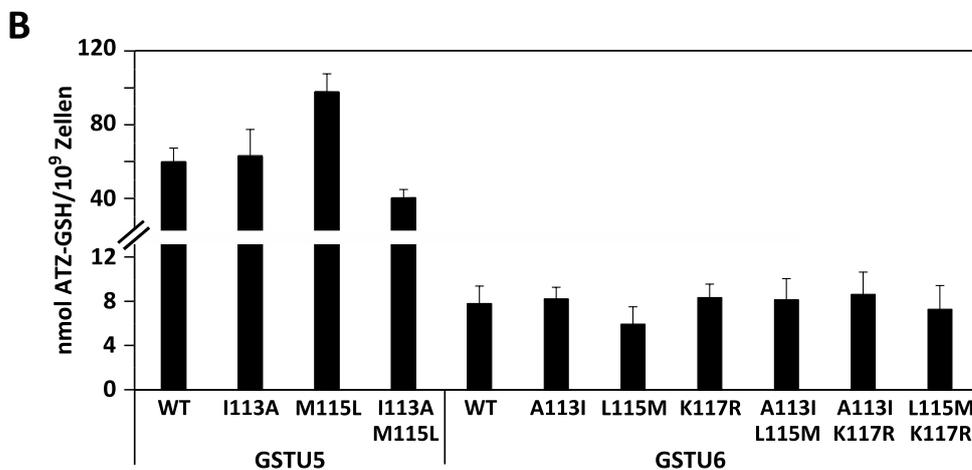
Die nächste, am engsten mit GSTU5 verwandte GST in Arabidopsis ist GSTU6 (Abbildung 1.7). Die Aktivität dieser beiden Enzyme gegenüber Chlorotriazinen wich jedoch stark voneinander ab. So betrug die Menge an gebildetem GSH-Konjugat bei den Analysen mit GSTU6 im Durchschnitt

lediglich 5 % der durch GSTU5-Aktivität produzierten Konjugate. Der Vergleich der beiden Proteinsequenzen ergab 78 % Übereinstimmung. Die Aminosäuren, die zuvor aufgrund ihrer Lage als putativ wichtig für die Bindung von ATZ bestimmt wurden, waren bis auf eine Ausnahme in beiden Enzymen identisch (Abbildung 3.32 A). Differentiell war lediglich Met115; die zu Met115 benachbarten Aminosäuren waren im Vergleich zu dem restlichen Protein auffällig unterschiedlich. Durch den Austausch der differentiellen Aminosäuren in dieser Region der beiden Proteine, sollte ihre Beteiligung an der Glutathionylierung von ATZ ermittelt werden. Die Aminosäuren Ile113, Met115 und Lys117 der aktiven GSTU5 sollten mittels PCR-basierter Mutation durch die entsprechenden Aminosäuren Ala113, Leu115 und Arg117 der weniger aktiven GSTU6 ausgetauscht werden und anders herum. Zusätzlich sollten durch zweifache Mutationen additive Effekte erforscht werden. Die Mutation K117R in GSTU5 war als einzige nicht erfolgreich.

Die Aktivität der mutierten GSTs gegenüber ATZ in *S. cerevisiae* ergab in den meisten Fällen ein zum Wildtyp des Enzyms vergleichbares Niveau. Nur die Änderung der Aminosäure an Position 115 in beiden GSTs zeigte eine leicht veränderte – und unerwartete – Aktivität (Abbildung 3.32 B). So war die Menge an gebildetem ATZ-GSH in der GSTU5, die ein Lysin anstatt des Methionins an dieser Stelle hatte, leicht erhöht, während in der GSTU6-Mutante Lys115Met eine leicht geringere Glutathionylierung von ATZ nachgewiesen wurde. Zusätzlich zeigte die zweifache Änderung der Aminosäuren Ile113 und Met115 in der GSTU5 eine leicht reduzierte Aktivität. Dies wurde auf umgekehrte Weise in der GSTU6 jedoch nicht beobachtet. Die erwartete Reduktion der Aktivität durch das Einbringen von Aminosäuren der GSTU6 an den entsprechenden Positionen in der GSTU5 führte jedoch nicht zu der erwarteten, geringen Aktivität. Auch umgekehrt konnte der Umsatz der GSTU6, durch das Einbringen von GSTU5-abstammenden Aminosäuren, nicht erhöht werden. Andere Regionen der Proteine müssen zusätzlich zu der hohen Aktivität der GSTU5 beitragen.

**A**

|           |            |  |            |                          |            |
|-----------|------------|--|------------|--------------------------|------------|
| AtGSTU5   | MAEKEEVKLL | GIWASPF <sup>▼</sup> SRR               | VEMALKLKI  | PYEVVEE <sup>▼</sup> ILE | NKSPLLLALN |
| AtGSTU6   | MGNKEEVKLL | GIWASPF <sup>▼</sup> SRR               | IEMALKLKV  | PYEYLEDLE                | NKSSLLLALS |
| Consensus | *.:*****   | *****                                  | :*****:    | ****:* **                | ***.***.   |
|           |            |  |            |                          |            |
| AtGSTU5   | PIHKVPVLV  | HNGKTILE <sup>▼</sup> SH               | VILEYIDETW | PQNPILQDP                | YERSKARFFA |
| AtGSTU6   | PIHKIPVLV  | HNGKTIESH                              | VILEYIDETW | KHNPILQDP                | FORSKARVLA |
| Consensus | *****:***  | *****:***                              | *****      | :*****                   | :*****:*   |
|           |            |  |            |                          |            |
| AtGSTU5   | KLVDEQIMNV | GFI <sup>▼</sup> SMAR <sup>▼</sup> ADE | KGREVLAEQV | RELIMYLEKE               | LVGKDYFGGK |
| AtGSTU6   | KLVDEKIVNV | GFA <sup>▼</sup> SLAK <sup>▼</sup> T-E | KGREVLIEQT | RELIMCLEKE               | LAGKDYFGGK |
| Consensus | *****:***  | * * . * . *                            | ***** *    | ***** *                  | *.*****    |
|           |            |  |            |                          |            |
| AtGSTU5   | TVGFLDFVAG | SLIPFCLER <sup>▼</sup> G               | WEGIGLEVIT | EKFPEFKRW                | VRNLEKVEIV |
| AtGSTU6   | TVGFLDFVAG | SMIPFLERA                              | WEGMGVEMIT | EKKFPEYNKW               | VKKLKEVEIV |
| Consensus | *****      | *:*****.                               | ***:*.***  | *:*****:.*               | *:*.***    |
|           |            |  |            |                          |            |
| AtGSTU5   | KDCVPPREEH | VEHMNYMAER                             | VRSS       |                          |            |
| AtGSTU6   | VDCIPLREKH | IEHMNNMAEK                             | IRSA       |                          |            |
| Consensus | **:* **:*  | :**** **:                              | :**:       |                          |            |



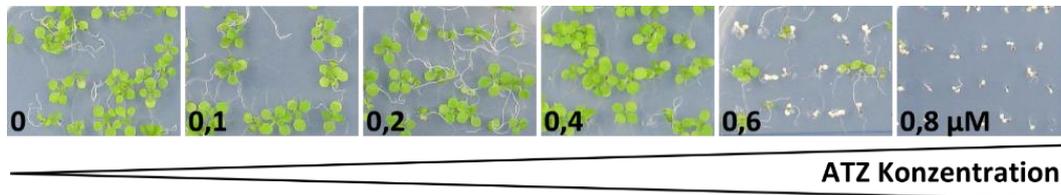
**Abbildung 3.32** Differentielle Aminosäuren der GSTU5 und GSTU6 und ihre Auswirkung auf die Konjugation von ATZ.

Das Alignment der Proteinsequenzen von GSTU5 und GSTU6 zeigte große Homologien zwischen den beiden Enzymen (A). GSH-bindende Aminosäuren, die die *G-site* bilden, wurden markiert (roter Pfeil). Aminosäuren, die auf Grundlage der putativen Kristallstruktur der GSTU5 in der Bindetasche lagen und an der Bindung des zweiten Substrates beteiligt sein könnten, waren grün gekennzeichnet (grüner Pfeil). Die Region, in der diese ausgewählten Aminosäuren zwischen den beiden GSTs unterschiedlich waren, wurde markiert (grauer Kasten). Die drei differentiellen Aminosäuren in dieser Region, Ile113, Met115 und Lys117 (rot) in der GSTU5, wurden mittels PCR zu der entsprechenden Aminosäuren an der Position in der GSTU6 mutiert; und umgekehrt. Diese mutierten GSTs wurden erneut in Hefe eingebracht und ihre Aktivität gegenüber ATZ durch Belastung der Hefekulturen und anschließender Analyse der proteinfreien Extrakte mittels HPLC ermittelt (B). Die Analyse erfolgte in Triplikaten.

#### 3.4.4. Einfluss der GSTU5, GSTU18 und GSTU22 auf den Chlorotriazinumsatz *in planta*

Anhand der Ergebnisse, die mit Hilfe des Hefesystems gewonnen wurden, konnte die prominente Rolle der GSTU5, GSTU18 und GSTU22 unter allen GSTs aus *Arabidopsis* gegenüber den Herbiziden der Chlorotriazin-Klasse ermittelt werden. Die Relevanz dieser Enzyme *in planta* wurde durch die Analyse von *knock out*-Linien (KO) und Linien, die diese GSTs überexprimierten (OE), untersucht.

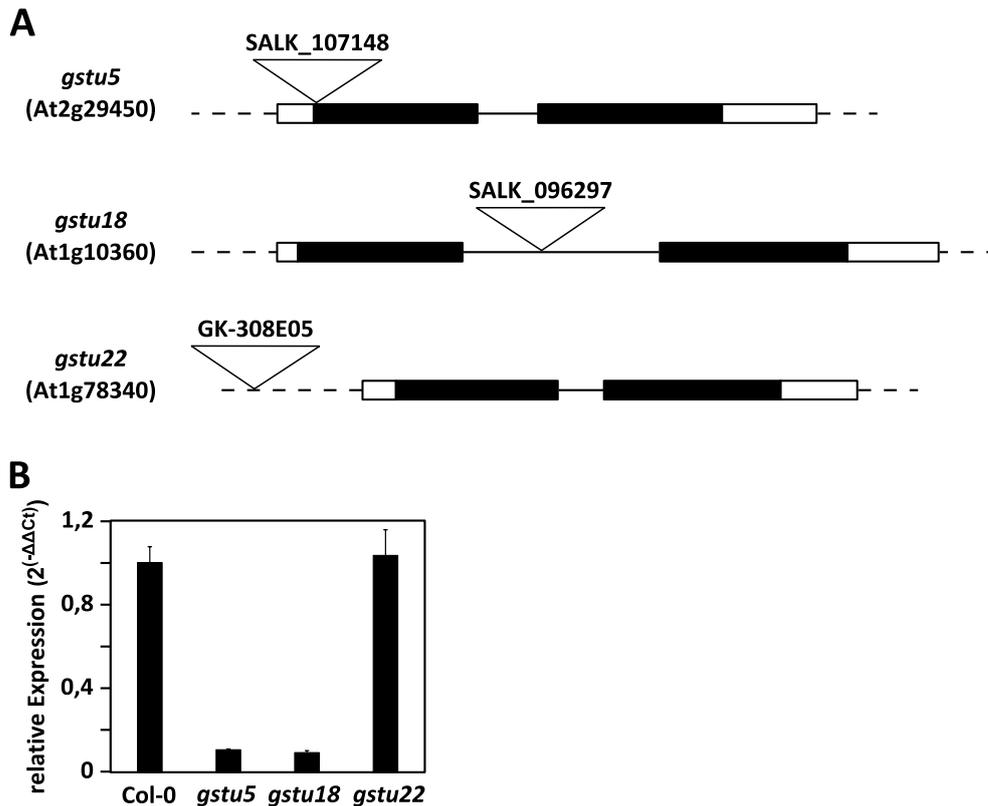
Analysen des Wildtyps Col-0 ergaben ein konzentrationsabhängiges Ausbleichen der Kotyledonen, wenn die Pflanzen auf ATZ-haltigem Medium wuchsen (Abbildung 3.33). Dabei zeigte sich zudem eine licht-abhängige Reaktion, da Pflanzen, die weiter von der Lichtquelle entfernt waren, geringere Schäden durch das Herbizid aufwiesen.



**Abbildung 3.33 Einfluss von ATZ auf Keimlinge von *A. thaliana*.**

WT Col-0 wurde auf Medium mit verschiedenen Konzentrationen ATZ ausgebracht und für 11 d bei 22 °C unter Langtagbedingungen (16 h Licht,  $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) kultiviert.

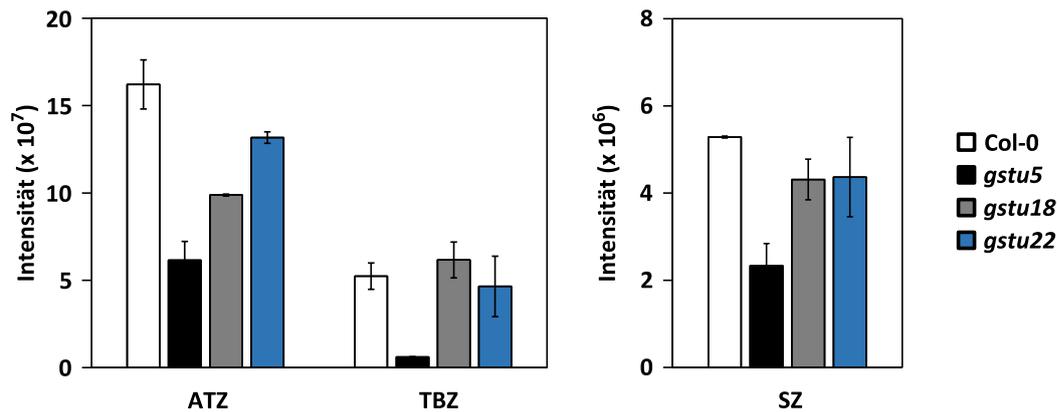
Für die Untersuchungen der KO-Linien wurden die T-DNA-Insertionslinien SALK\_107148 (*gstu5*), SALK\_096297 (*gstu18*) und GK-308E05 (*gstu22*) verwendet (Abbildung 3.34 A). Die Insertion der T-DNA-Kassette wurde durch PCR bestätigt und die Expression der Gene mittels qPCR untersucht (Abbildung 3.34 B). Die Lage der T-DNA-Insertion in *GSTU22*, die ca. 280 bp vor dem Startcodon im Promotorbereich liegt, führte zu einer WT-vergleichbaren Expression dieses Gens. Die Insertionen in die beiden anderen Gene wiesen eine deutliche Reduktion der Expression auf.



**Abbildung 3.34 Genstruktur und Expression verwendeter KO-Linien.**

Die in dieser Arbeit verwendeten T-DNA-Insertionslinien der drei ATZ-aktiven AtGSTs von *A. thaliana* wurden schematisch dargestellt (A). Die proteinkodierende Sequenz wurde in schwarz dargestellt, untranslatierte Bereiche der mRNA waren weiß und Introns ein Strich. Die Expression der jeweiligen Gene wurde durch qPCR im Vergleich zum WT Col-0, der auf 1 gesetzt wurde, in 11 d alten Keimlingen überprüft (B). Als Referenzgen diente *UBC9*. Die Analyse erfolgte in drei technischen Replikaten.

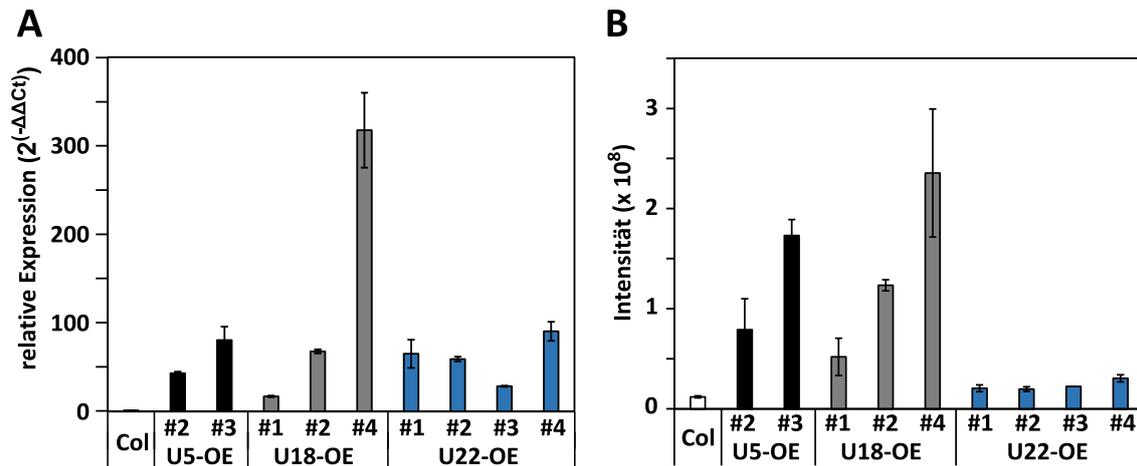
Die Pflanzen dieser Linien zeigten, trotz fehlender GST, keinen optischen Unterschied zum Wildtyp Col-0, wenn sie auf ATZ-haltigem Medium angezogen wurden (Anhang Abbildung 6.1). Wurde jedoch die Fähigkeit zur Glutathionylierung von ATZ betrachtet, ergaben sich deutliche Unterschiede zwischen KO-Linien und WT (Abbildung 3.35). Die zuvor auf MS-Festmedium angezogenen und in Flüssigkultur belasteten Keimlinge konnten durch die Sensitivität der ICR-FT/MS im Hinblick auf die Menge des gebildeten ATZ-GSH untersucht werden. Die Reduktion der Konjugatmenge in den jeweiligen Linien entsprach dabei der ermittelten Aktivität der AtGST in *S. cerevisiae*. Für die Substrate TBZ und SZ ergab sich daher nur bei der Belastung von *gstu5* eine im Vergleich zum WT verminderte Konjugatmenge. In der Linie *gstu22*, die keine Änderung der Genexpression im Vergleich zum WT aufwies, war die Konjugatmenge bei allen drei Substraten vergleich mit Col-0. Die Deletion von *GSTU18* führte lediglich zu einem verminderten Umsatz von ATZ. Der größte Unterschied zwischen WT und KO-Linie zeigte sich bei mit TBZ belasteten Keimlingen der *gstu5*, die eine ca. zehnfache Reduktion der Konjugatmenge aufwiesen.



**Abbildung 3.35 GSH-Konjugate ausgewählter Chlorotriazine in Arabidopsis WT und KO-Mutanten.**

70 mg ( $\pm$  8 mg) Keimlinge wurden 10 d auf Platten angezogen, in Flüssigkultur überführt und nach 24 h mit 100  $\mu$ M Triazinlösung für weitere 24 h bei Dauerlicht exponiert. Die methanolischen Extrakte des aufgeschlossenen Pflanzenmaterials wurden in der ICR-FT/MS im Hinblick auf das gebildet GSH-Konjugat hin untersucht. Dafür wurden die methanolischen Extrakte 1:10 verdünnt und bei 250 Scans jeweils zwei technische zweier biologischer Replikate gemessen.

Für die Überexpression von GSTs in Arabidopsis wurde die proteinkodierende Sequenz unter die Kontrolle des 35S-Promotors des Blumenkohl-Mosaikvirus gestellt und durch *A. tumefaciens* in Col-0 eingebracht. Dabei wurden neben den in Hefe aktiven GSTs, U5, U18 und U22, weitere, nah verwandte, aber in Hefe inaktive, GSTs (GSTF8, GSTU1, GSTU7, GSTU8, GSTU17, GSTU23, GSTU25) als Kontrolle untersucht. Zudem wurden Pflanzen generiert, die den Leervektor (LV) bzw. GSTI aus *Z. mays* in das Genom integriert hatten. Die Stärke der Überexpression unterschied sich in den verschiedenen Linien zum Teil deutlich (Abbildung 3.36 A, Anhang Abbildung 6.2). Die ATZ-Konjugatmenge, die in diesen Linien nachgewiesen wurde, spiegelte auf der einen Seite diese Unterschiede in der Expression wieder (Abbildung 3.36 B). So wurde in den Keimlingen der Linie U18-OE #4, welche die höchste Transgen-Expression zeigte, das meiste ATZ-Konjugat nachgewiesen. Auf der anderen Seite stimmten die Daten auch mit den Aktivitäten der einzelnen GSTs, die in Hefe ermittelt worden sind, überein. So führte die Überexpression von *GSTU22* lediglich zu einer Verdopplung der ATZ-Konjugatmenge im Vergleich zum WT. Diese Ergebnisse sollten jedoch erneut in homozygoten Linien verifiziert werden.

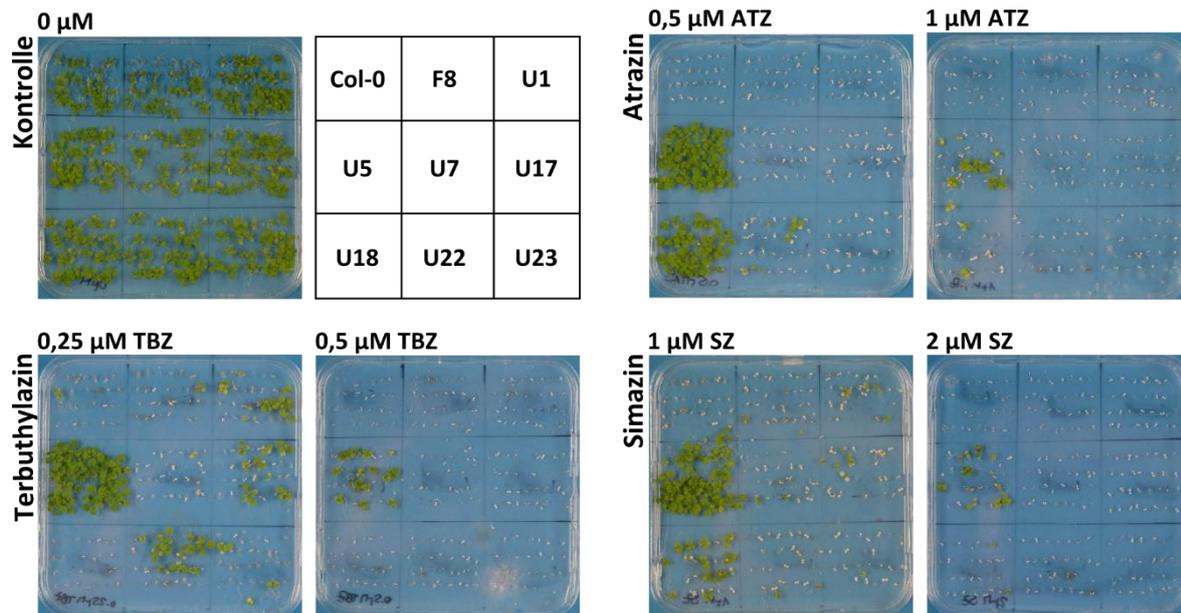


**Abbildung 3.36 Expressionsanalyse und ATZ-Belastung von Überexpressionslinien aktiver GSTs in *A. thaliana*.**

Die im Hefesystem als aktiv identifizierte GSTs wurden unter der Kontrolle des 35S-Promotors stabil in *A. thaliana* eingebracht. Die Expression der Transgene *GSTU5*, *GSTU19* und *GSTU22* der segregierenden T2-Generation wurde in unabhängigen Linien mittels qPCR mit den entsprechenden genspezifischen Primern überprüft (A). Dabei wurde die Expression des jeweiligen Gens in der Kontrolle Col-0 auf 1 gesetzt. Als Referenzgen zur Normalisierung wurde *UBC9* verwendet. Die Analyse erfolgte in drei technischen Replikaten. Parallel dazu wurden je 20 Keimlinge dieser Linien, die zuvor 10 Tage auf MS-Platten wuchsen, in Flüssigkultur mit 100  $\mu$ M ATZ für 24 h belastet und die Extrakte in der ICR-FT/MS analysiert (B). Es wurden Extrakte von zwei biologischen Replikaten zehnfach verdünnt und in zweifachen, technischen Wiederholungen bei 250 Scans gemessen.

Der deutlich erhöhte Umsatz von ATZ führte zu einer effizienteren Detoxifizierung des Herbizides, was sich als Resistenz bei Wachstum auf ATZ-haltigem Medium darstellte (Abbildung 3.37). Auch in diesem Fall zeigte sich eine deutliche Übereinstimmung mit den Daten, die zuvor in Hefe generiert wurden. So war die Linie, die die *GSTU5* überexprimierte, bei höheren Konzentrationen von ATZ optisch weniger beeinträchtigt als die anderen untersuchten OE-Linien. Die *GSTU5*-OE war auch als einzige Linie gegenüber hohen Konzentrationen SZ und TBZ resistent. Bei geringeren Konzentrationen zeigten auch *GSTU18*-OE auf ATZ-haltigem Medium und *GSTU22*-OE auf TBZ ein besseres Wachstum als Col-0.

Chlorotriazine inhibierten den Elektronentransport des PSII, indem sie die Bindestelle des D1-Proteins im PSII-Komplex blockierten. Das führte dazu, dass Plastoquinon nicht mehr an das PSII binden konnte und somit zum einen keine Elektronen übertragen wurden und zum anderen der Umsatz von D1 im PSII verzögert wurde (Fuerst und Norman, 1991; Jansen *et al.*, 1993). Der resultierende Effekt daraus ist eine übermäßige Erzeugung von reaktivem Triplet-Sauerstoff, der zur Schädigung des Photosyntheseapparats und damit zum Ausbleichen der Keimlinge führte (Keren *et al.*, 1997).

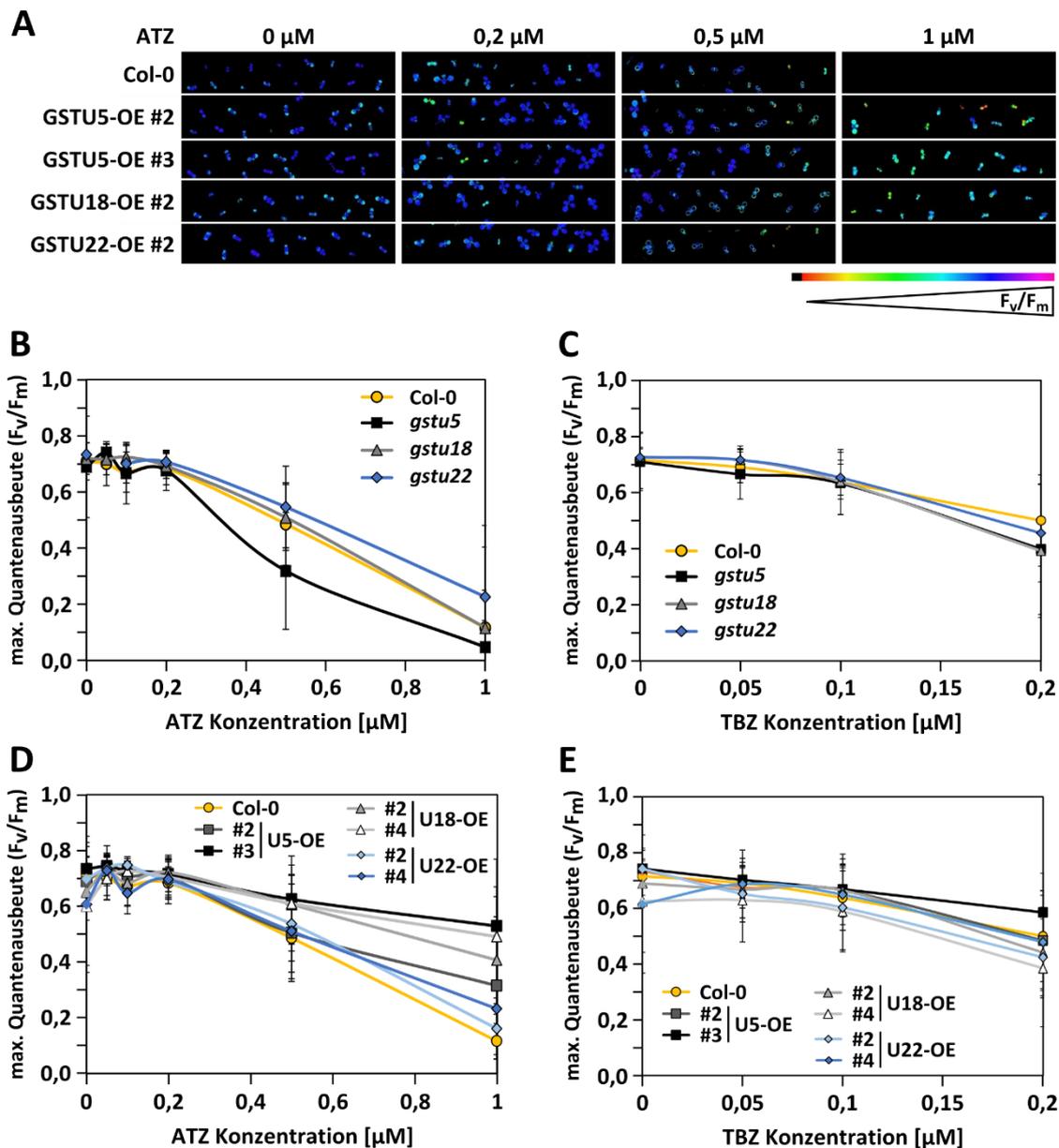


**Abbildung 3.37 Wachstum von Col-0 und GST-Überexpressionslinien auf Chlorotriazin-haltigem Medium.**

Keimlinge der segregierenden T2-Generation wurden auf MS-Platten ohne Zucker mit verschiedenen Konzentrationen Chlorotriazinen ausgebracht und für 12 d bei 22 °C unter Langtagbedingungen (16 h Licht,  $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) kultiviert. Als Kontrolle diente Medium mit Lösungsmittel (0,05 % DMSO). Bei den OE-Linien handelte es sich um F8-OE #1, U1-OE #1, U5-OE #3, U7-OE #6, U17-OE #2, U18-OE #2, U22-OE #2 und U23-OE #4.

Eine quantitative Bestimmung der Schädigung durch Chlorotriazine wurde durch den Einsatz der Chlorophyllfluoreszenz geprüft (Abbildung 3.38). Die maximale Quantenausbeute des PSII ( $F_v/F_m$ ) kann durch die Messung der Grundfluoreszenz ( $F_0$ ) und der maximalen Fluoreszenz ( $F_m$ ) bei dunkeladaptierten Pflanzen ermittelt werden. Gesunde, nicht gestresste Pflanzen zeigten dabei einen Wert von 0,83 (Björkman und Demmig, 1987). Mit zunehmender Herbizidkonzentration nahm dieser Wert ab, da der Elektronenfluss gestört war. Bei vollständig ausgebleichten Keimlingen wurde keinerlei Fluoreszenz mehr gemessen (Abbildung 3.38 A). Alle gemessenen Proben lagen unter dem erwarteten Literaturwert von 0,83 und zeigten in der Lösungsmittelkontrolle eine max. Quantenausbeute um 0,7. Wurden die Keimlinge mit ATZ belastet, blieb dieser Wert bis zu einer Konzentration von  $0,2 \mu\text{M}$  konstant und nahm ab  $0,5 \mu\text{M}$  rapide ab (Abbildung 3.38 B, D). Die Messung der Keimlinge unter TBZ-Belastung wurde nur bis zu einer Konzentration von  $0,2 \mu\text{M}$  durchgeführt und zeigte eine deutlich geringere Abnahme der max. Quantenausbeute im Vergleich zur Belastung mit ATZ (Abbildung 3.38 C, E). Der KO der aktiven GSTs U5, U18 und U22 hatte unter TBZ-Belastung keinen Einfluss auf den Elektronentransport des PSII. Wurde *gstu5* auf Platten mit mindestens  $0,5 \mu\text{M}$  ATZ angezogen zeigte sich eine verringerte max. Quantenausbeute des PSII. Umgekehrt wiesen die OE-Linien der GSTU5 und GSTU18 höhere Werte als Col-0 bei ATZ-Konzentrationen ab  $0,5 \mu\text{M}$  auf. Die Überexpression von GSTU22 zeigte, verglichen mit dem WT,

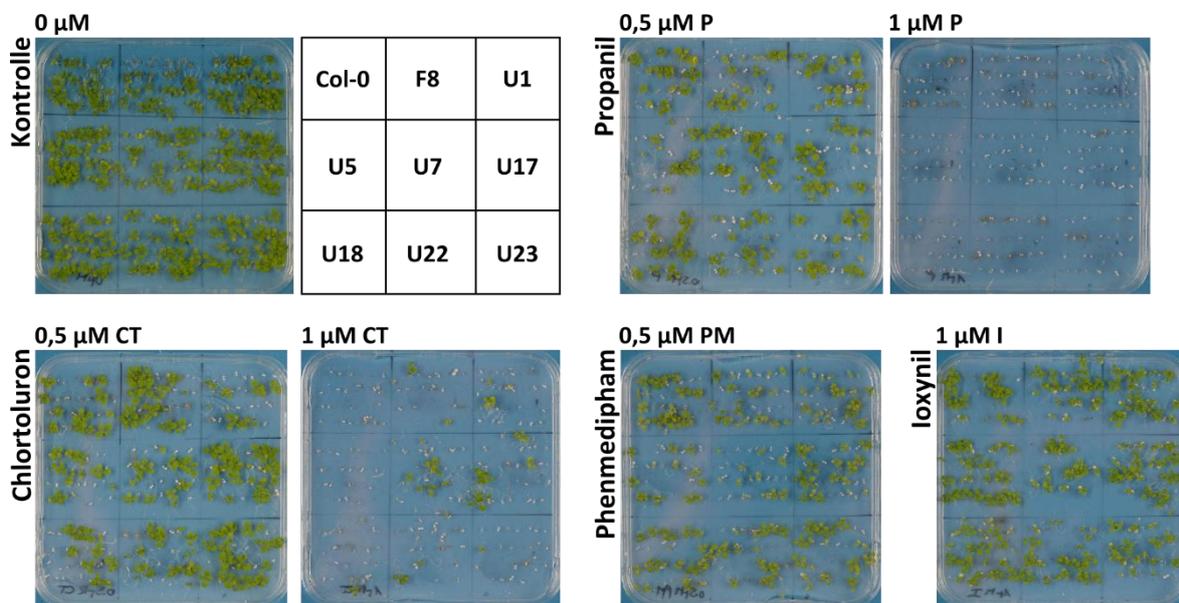
eine leicht erhöhte PSII-Effizienz. Bei Belastung mit TBZ war lediglich die max. Quantenausbeute der GSTU5-OEs bei höchster TBZ-Konzentration größer als im WT.



**Abbildung 3.38** Messung der maximalen Quantenausbeute des PSII in Col-0 und ausgewählten KO- und OE-Linien in *A. thaliana* bei Chlorotriazinbelastung.

Segregierende T2-Keimlinge von KO- und OE-Linien wurden auf MS-Platten mit zunehmender Konzentration ATZ (B, D) oder TBZ (C, E) angezogen und nach 11 d die maximale Quantenausbeute des PSII ermittelt (A). Dafür wurden die dunkeladaptierten Keimlinge Licht von  $80 \mu\text{mol quanta m}^{-2} \text{s}^{-1}$  ausgesetzt, um die Grundfluoreszenz  $F_0$  zu bestimmen. Durch einen sättigenden Lichtimpuls wurde die maximale Fluoreszenz ( $F_m$ ) bestimmt. Die maximale Quantenausbeute des PSII ( $\frac{F_v}{F_m}$ , wobei  $F_v = F_m - F_0$ ) wurde aus diesen beiden Werten ermittelt und stellt ein Maß für die Effizienz des PSII dar. Die Fluoreszenzemission wurde bei 625 nm gemessen.

Das Wachstum der OEs auf Medium mit weiteren, PSII-inhibierenden Herbiziden, wie Propanil, Chlortoluron, Phenmedipham und Ioxynil, sollte ausschließen, dass es sich bei der beobachteten Resistenz um einen sekundären Effekt handelte (Abbildung 3.39). Cummins und Kollegen haben gezeigt, dass die Überexpression der GSTFI aus Acker-Fuchsschwanzgras (*A. myosuroides*) in Arabidopsis zwar mit der Resistenz gegenüber ATZ, Alachlor und Chlortoluron einherging, dies jedoch auf die GPOX-Aktivität oder sekundäre Effekte der GST-Expression zurückzuführen war (Cummins *et al.*, 2013). Die OE-Linien der AtGSTs in Arabidopsis verhielten sich vergleichbar zum WT, was darauf schließen ließ, dass die Resistenz gegenüber Chlorotriazin, die zuvor in GSTU5-OE, GSTU18-OE und GSTU22-OE beobachtet worden war, auf die erhöhte Detoxifizierung dieser Substanzen zurückzuführen war.

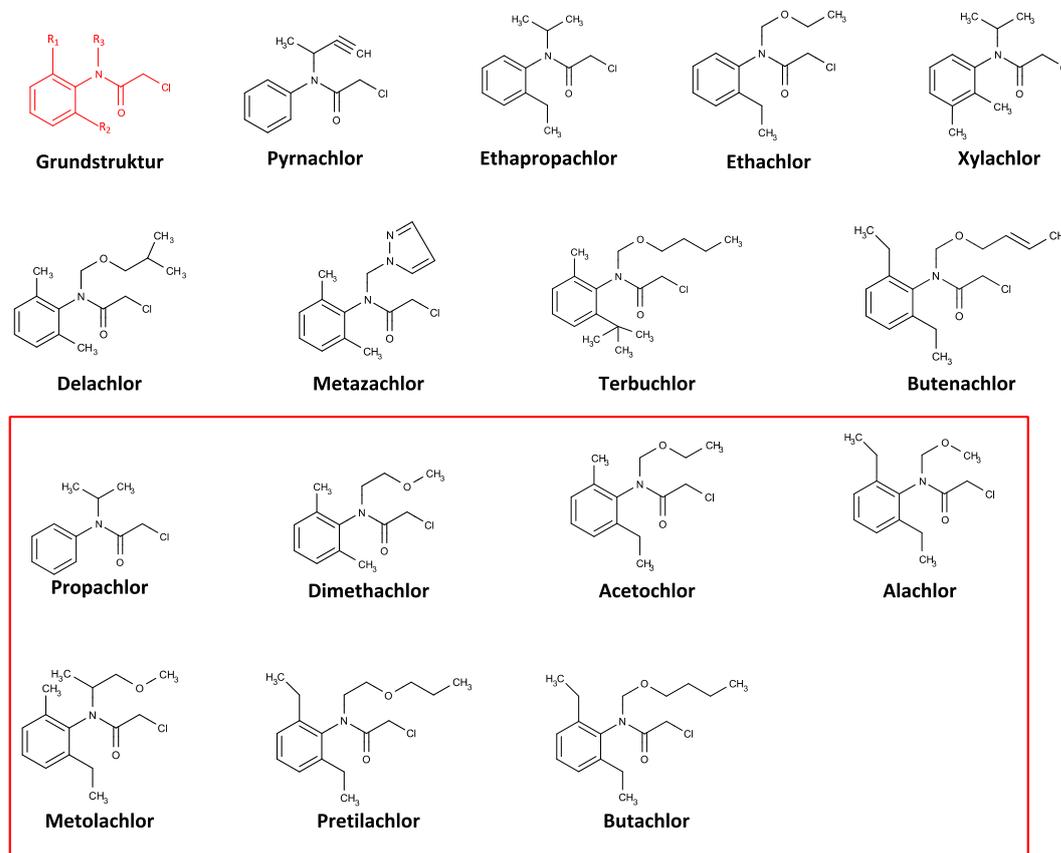


**Abbildung 3.39 Wachstum von Col-0 und GST-Überexpressionslinien auf Medium mit PSII-Inhibitoren.** Keimlinge der segregierenden T2-Generation wurden auf MS-Platten ohne Zucker mit verschiedenen PSII-inhibierenden Herbiziden ausgebracht und für 12 d bei 22 °C unter Langtagbedingungen kultiviert. Als Kontrolle diente Medium mit Lösungsmittel (0,05 % DMSO). Bei den OE-Linien handelte es sich um F8-OE #1, U1-OE #1, U5-OE #3, U7-OE #6, U17-OE #2, U18-OE #2, U22-OE #2 und U23-OE #4.

### 3.5. Umsatz von Chloroacetaniliden durch AtGSTs

Chloroacetanilide wurden erstmals 1969 als Herbizide auf den Markt gebracht. Die wichtigsten Vertreter dieser Gruppe waren Alachlor (AC), Metolachlor (MC) und Acetochlor (ACT). Die Grundstruktur aller Chloroacetanilide ist das Anilid, an welchem verschiedene Alkylgruppen gebunden sein können (Abbildung 3.40). Die chemische Gruppe der Chloroacetanilide umfasst 18 verschiedene Substanzen. Ihre inhibierende Wirkung auf Pflanzen, die nicht resistent gegenüber diesen Herbiziden sind, ist die Inhibition des Wachstums. Auf zellulärer Ebene wird die Biosynthese

der langkettigen Fettsäuren gestört, indem die VLCFA-Elongase inhibiert wird (Böger, 1997; Trenkamp *et al.*, 2004). Während AC, ACT und MC als Vorlaufherbizide vor allem im Mais- und Sojaanbau verwendet wurden, kamen Butachlor (BC) und Pretilachlor (PTC) in Reisfeldern zum Einsatz. Die Resistenz konnte durch den Einsatz von Safenern deutlich verstärkt werden kann.



**Abbildung 3.40 Struktur ausgewählter Chloroacetanilide.**

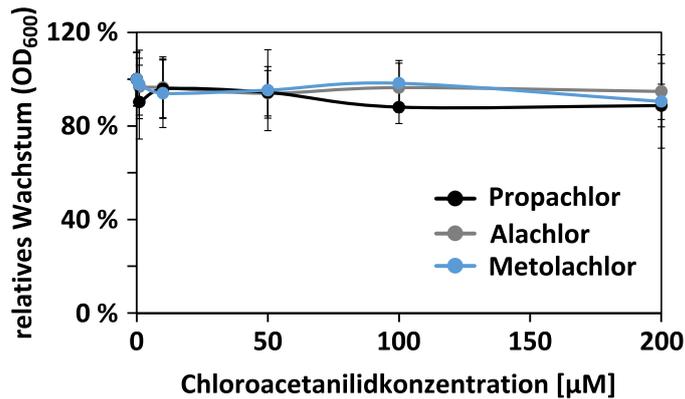
Die Grundstruktur aller Chloroacetanilide ist ein Anilid mit einem Chlor, welches bei der Konjugation mit GSH substituiert wird (rot). Die verschiedenen Chloroacetanilide können sich an drei Positionen unterscheiden. Den Alkylresten, die direkt am Ring gebunden sind, und denen an der Aminogruppe, wobei die Varianz an der letzten am größten ist. Die Chloroacetanilide, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind durch einen roten Rahmen markiert.

Ähnlich wie bei Triazin-Herbiziden, wurde eine Vielzahl von Detoxifizierungswegen für Chloroacetanilide beschrieben. Darunter die Hydroxylierung, N-Dealkylierung und Konjugation an GSH (Hutson *et al.*, 1998). Dabei wurde die Detoxifizierung über GSH in allen Fällen als Hauptabbauweg dieser Herbizidklasse identifiziert. Die enzymatische Aktivität von GSTs und der GSH-Gehalt spielen daher bei der Resistenz eine entscheidende Rolle (Jablonkai und Hatzios, 1991; Rossini *et al.*, 1998). Zum Teil waren die bisher gewonnenen Ergebnisse nicht schlüssig oder gar widersprüchlich. Scarponi und Kollegen haben zum Beispiel gezeigt, dass obwohl Unkrautarten suszeptibel auf Chloroacetanilide reagieren, ihre Enzymaktivität vergleichbar mit der von Mais und

Sojabohne ist und diese Diskrepanz auch nicht vollständig durch sekundäre Faktoren erklärt werden konnte (Scarponi *et al.*, 1991). Die Rolle der ZmGSTI aus Mais in der Chloroacetanilid-Detoxifizierung sollte zudem näher beleuchtet werden. So zeigten Dixon und Kollegen, dass dieses Enzym als Homodimer eine geringe Aktivität gegenüber AC hat und keinerlei Aktivität gegenüber MC (Dixon *et al.*, 1997). Allerdings konnte die Chloroacetanilid-Aktivität in Mais durch die Behandlung mit Safenern um ein Vielfaches gesteigert, was mit der Heterodimerisierung mit zwei weiteren GSTs begründet wurde (Dixon *et al.*, 1999). Dass die ZmGSTI keine zentrale Rolle bei der Detoxifizierung von AC spielt, zeigte eine Studie, die unterschiedlich tolerante Maissorten auf die Abundanz von drei GSTs hin untersuchte. Das Vorhandensein des Enzyms ZmGSTIV war ausschlaggebend, ob eine Sorte tolerant oder suszeptibel war (Rossini *et al.*, 1996). ZmGSTI und die dritte untersuchte GST, ZmGSTII, hatten einen positiven Einfluss und steigerten die Toleranz noch einmal, reichten alleine aber nicht aus. Erstaunlicherweise resultierte die Überexpression von ZmGSTI in Tabak in der Toleranz der Pflanzen gegenüber AC (Karavangeli *et al.*, 2005). Eine mögliche Heterodimerisierung mit Tabak-eigenen GSTs wurde dabei jedoch nicht Betracht gezogen. Auch die Überexpression einer GST aus Sojabohne, GmGSTU4, konnte eine erhöhte AC-Toleranz vermitteln und unterstreicht noch einmal die Rolle, die GSTs bei der Detoxifizierung von Chloroacetaniliden spielen (Benekos *et al.*, 2010). Die Spezifität und Aktivität der GSTs wurde nur in einigen wenigen Fällen beleuchtet und sollte mit der breiten Analyse aller GSTs aus Arabidopsis erweitert werden.

### 3.5.1. Aktivität von AtGSTs gegenüber Chloroacetaniliden in Hefe

Um negative Effekte der Belastung bei der Untersuchung der AtGSTs in Hefe ausschließen zu können, wurden sowohl WT als auch die generierten Deletionsmutanten in Chloroacetanilid-haltigem Medium angezogen (Abbildung 3.41). Die Zunahme der Zelldichte zeigte in keinem der untersuchten Stämme und bei keinem der drei eingesetzten Herbizide, Propachlor (PC), AC und MC, Unterschiede zur Lösungsmittelkontrolle.

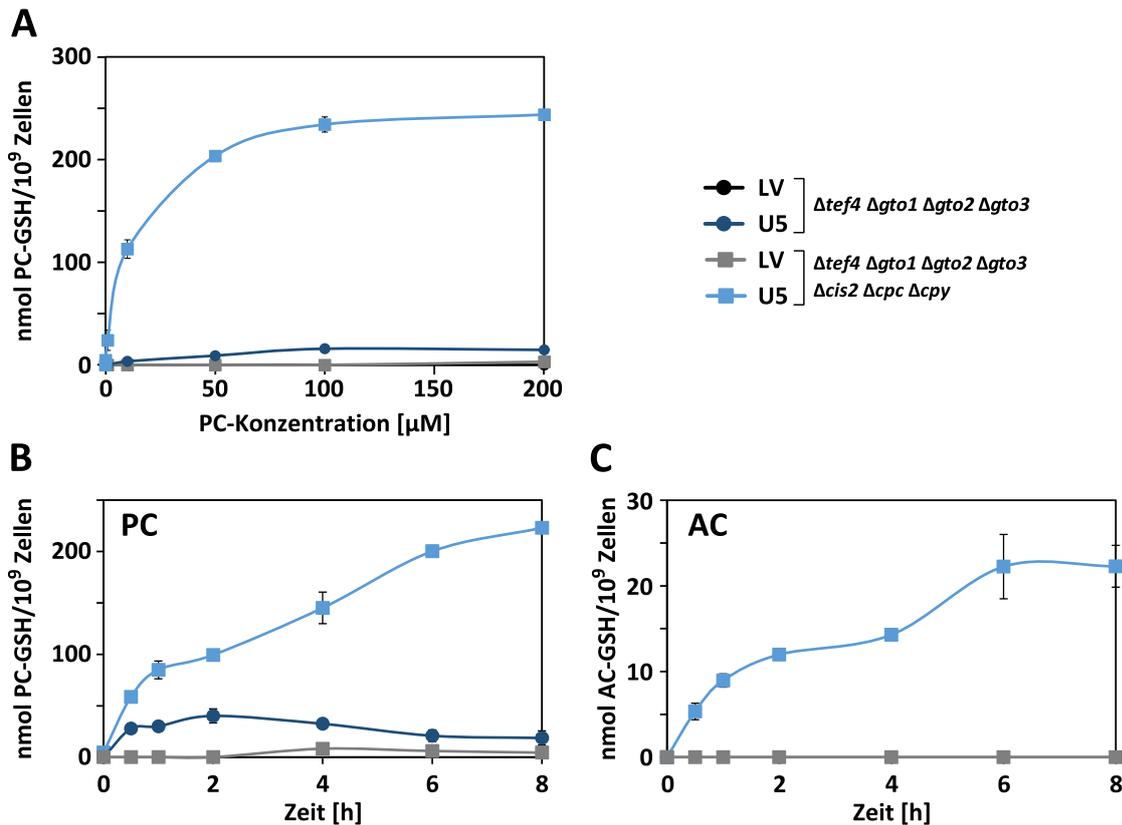


**Abbildung 3.41 Einfluss von Chloroacetaniliden auf das Wachstum von *S. cerevisiae*.**

*Δtef4Δgto1Δgto2Δgto3Δcis2ΔcpcΔcpy*, transformiert mit einem Leervektor, wurde in Minimalmedium mit 2 % Saccharose von Platte angeimpft und über Nacht wachsen lassen. Aus dieser Vorkultur wurde Medium mit Galaktose auf eine OD<sub>600</sub> von 0,06 angeimpft und nach 4 h Kultivierung für weitere 20 h mit verschiedenen Konzentrationen Propachlor, Alachlor und Metolachlor versetzt. Die Endkonzentration des Lösungsmittels betrug dabei immer 0,05 %. Das Wachstum wurde durch die Messung der OD<sub>600</sub> bestimmt. Die Lösungsmittelkontrolle ohne Herbizid wurde auf 100 % gesetzt. Die Standardabweichung setzte sich aus drei unabhängigen Proben zusammen.

Die Abhängigkeit des gebildeten GSH-Konjugates von der eingesetzten Pestizidkonzentration und der Expositionsdauer wurde anhand des Umsatzes von PC und AC in Hefe bestimmt. Aufgrund der bisher nachgewiesenen schwachen bzw. nicht vorhandenen Aktivität endogener Hefe-GSTs, wurde erneut der GSTU5-exprimierende Hefestamm für diese Vorversuche verwendet. Verglichen wurde die Konjugation in den beiden Stämme *Δtef4Δgto1Δgto2Δgto3* und *Δtef4Δgto1Δgto2Δgto3Δcis2ΔcpcΔcpy*. Als Kontrolle diente die jeweilige Hefekultur, die den Leervektor trug.

Lediglich in den Proben, in denen GSTU5 exprimiert wurde, wurde das Konjugat von PC mit GSH nachgewiesen. Dabei war die Abundanz in den Mutante *Δtef4Δgto1Δgto2Δgto3* mehr als 15fach geringer als in der GSTU5-exprimierenden *Δtef4Δgto1Δgto2Δgto3Δcis2ΔcpcΔcpy*, wodurch erneut die Auswirkung des Katabolismus-KOs beleuchtet wurden (Abbildung 3.42 A). Ab einer Konzentration von 100 µM PC kam es zur Sättigung. Bei der Analyse der Zeitabhängigkeit zeigte sich, sowohl bei AC als auch bei PC als Substrat, eine Sättigung nach 6 h (Abbildung 3.42 B). Eine Belastungsdauer von 6 h und eine Konzentration von 50 µM wurden verwendet, um 54 GSTs aus Arabidopsis, heterolog in der Mutante *Δtef4Δgto1Δgto2Δgto3Δcis2ΔcpcΔcpy*, zu exprimieren, und auf ihre Aktivität gegenüber Chloroacetaniliden hin zu untersuchen.



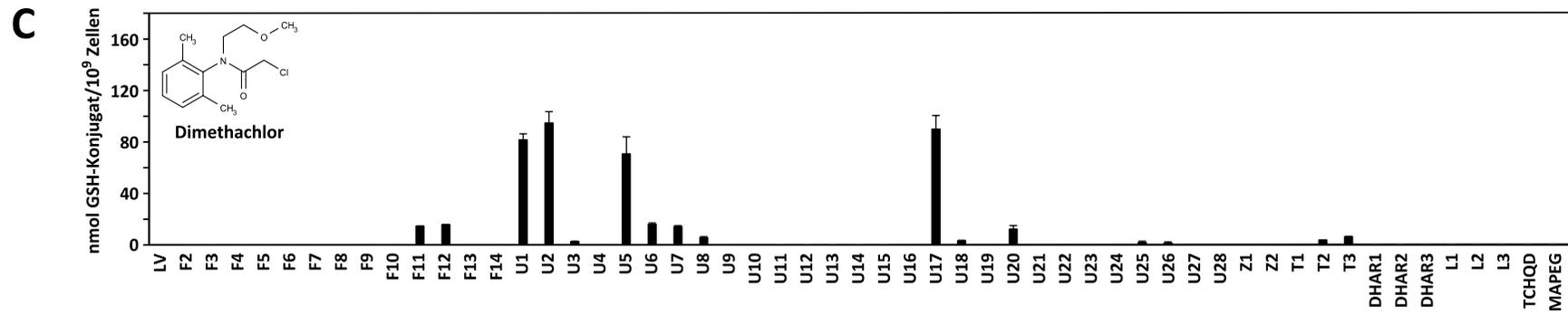
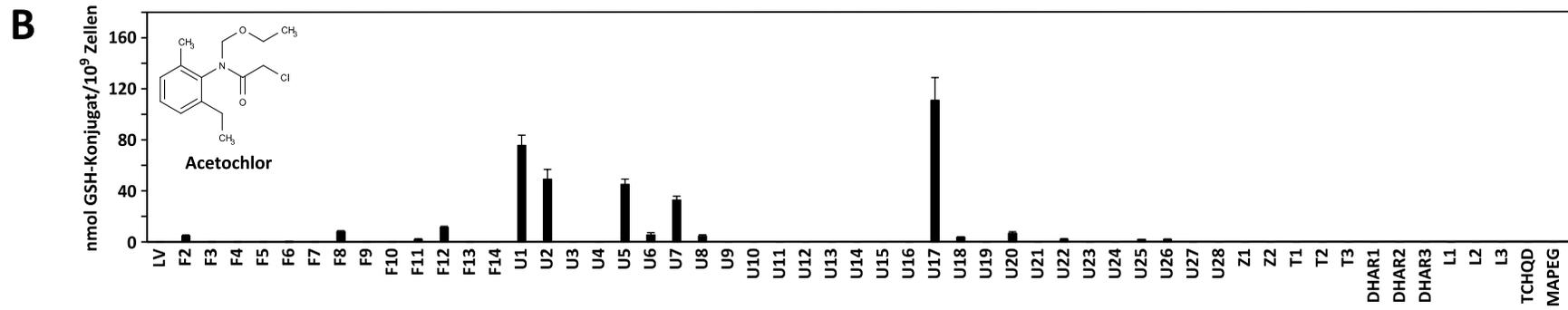
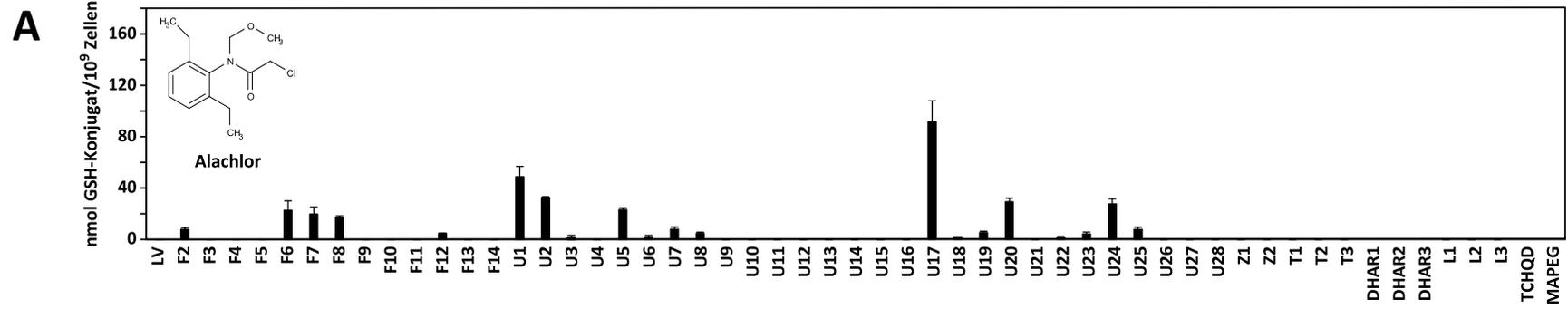
**Abbildung 3.42** GSH-Konjugation von Chloroacetaniliden in Abhängigkeit von Konzentration und Zeit in *S. cerevisiae*.

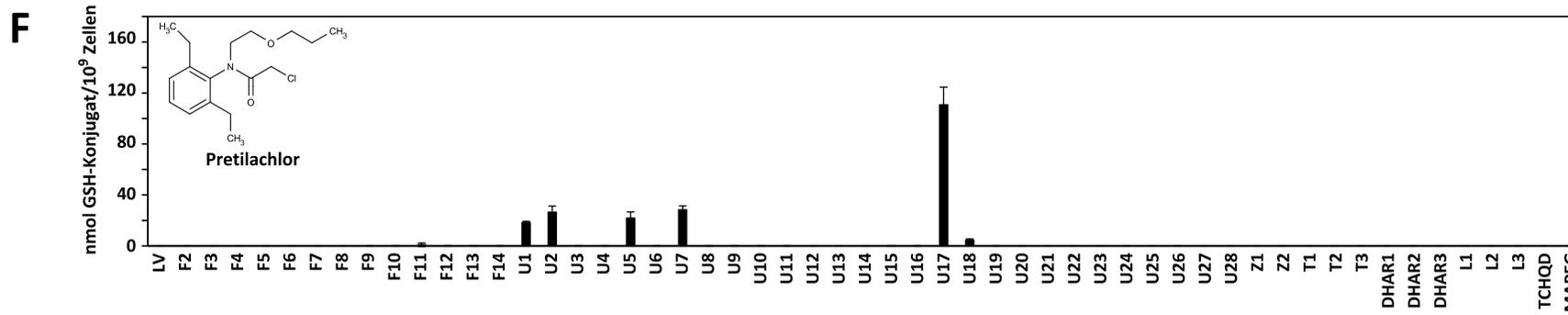
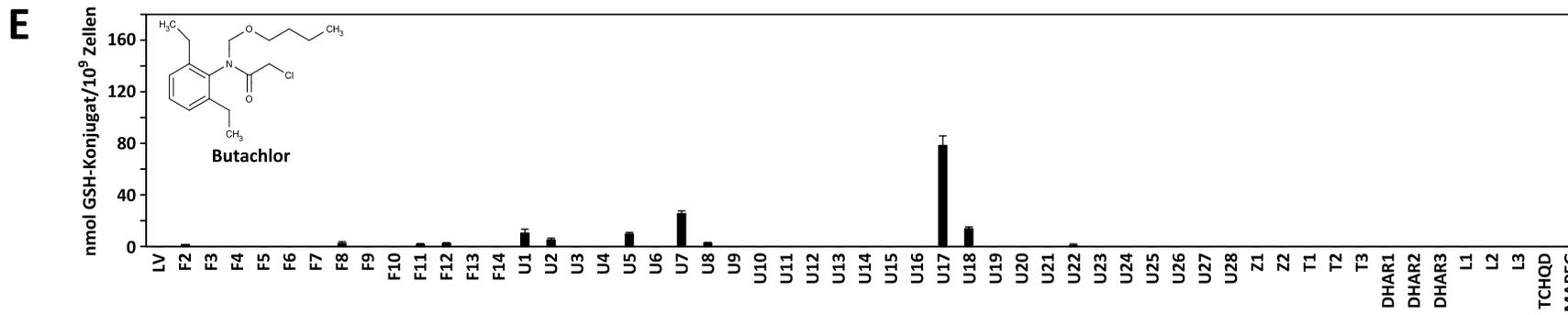
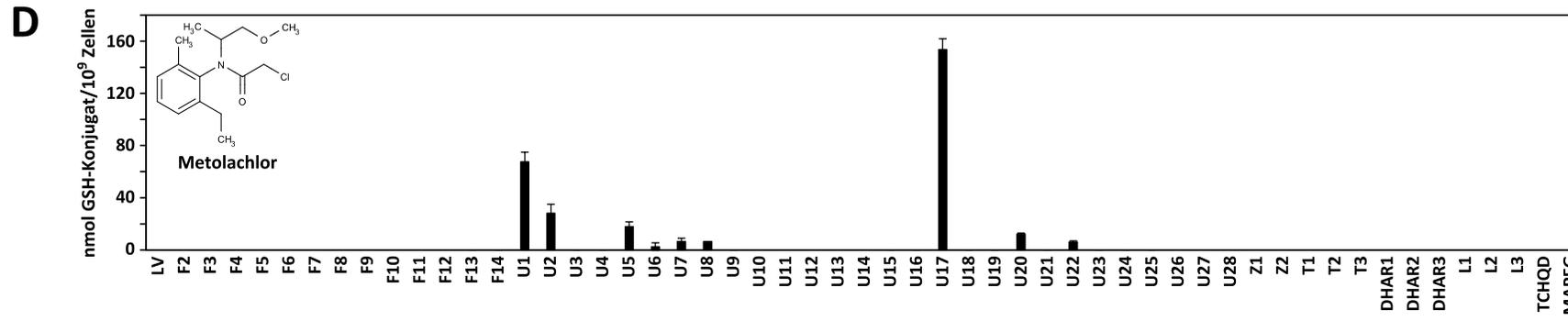
Hefestämme  $\Delta tef4 \Delta gto1 \Delta gto2 \Delta gto3$  und  $\Delta tef4 \Delta gto1 \Delta gto2 \Delta gto3 \Delta cis2 \Delta cpc \Delta cpy$ , die entweder den Leervektor (LV) oder die GSTU5 exprimierten, wurden mit verschiedenen Konzentrationen von PC für 6 h inkubiert und das entstandene GSH-Konjugat mittels HPLC bei 220 nm nachgewiesen (A). Die zeitliche Abhängigkeit der Konjugation wurde anhand der Herbizide PC (B) und AC (C) ermittelt. Dafür wurden 50 μM des Chloroacetanilids zu verschiedenen Zeitpunkten zu einer Hefekultur dazugegeben und nach einer Belastungsdauer von null bis acht Stunden die GSH-Konjugate in der HPLC nachgewiesen. Die Analyse von je zwei technischen und zwei biologischen Replikate ergab die Standardabweichung.

Als Substrate wurden neben den bereits verwendeten AC, MC und PC, bei denen sowohl *in vitro* als auch nach Exposition von Arabidopsis-Keimlingen ein entsprechendes GSH-Konjugat nachgewiesen wurde, auch weitere Derivate dieser Pestizidklasse untersucht (Anhang Tabelle 6.10, Tabelle 6.11). Dazu gehörten ACT, PTC, BC und Dimethachlor (DMC). Unterschiedlich waren vor allem die Seitenketten der Anilidgruppe, die sich durch eine deutlich unterschiedliche Länge der Alkylgruppe auszeichnete, sowie verschiedene Substitutionen am Benzolring. Der kleinste Vertreter der untersuchten Chloroacetanilide war dabei PC und die größten BC und PTC.

Die Analysen ergaben ein heterogeneres Bild der GST-Aktivität als es bei den Chlorotriazinen der Fall war. Dabei war die Menge des konjugierten Substrates in sechs Fällen vergleichbar (Abbildung 3.43). Wurde jedoch PC als GST-Substrat verwendet, kam es dagegen zu einem deutlich höheren Umsatz im Vergleich zu den anderen untersuchten Chloroacetaniliden (Abbildung 3.44). Dass dies durch eine verbesserte Aufnahme der Substanz in die Zelle begründet war, konnte nicht

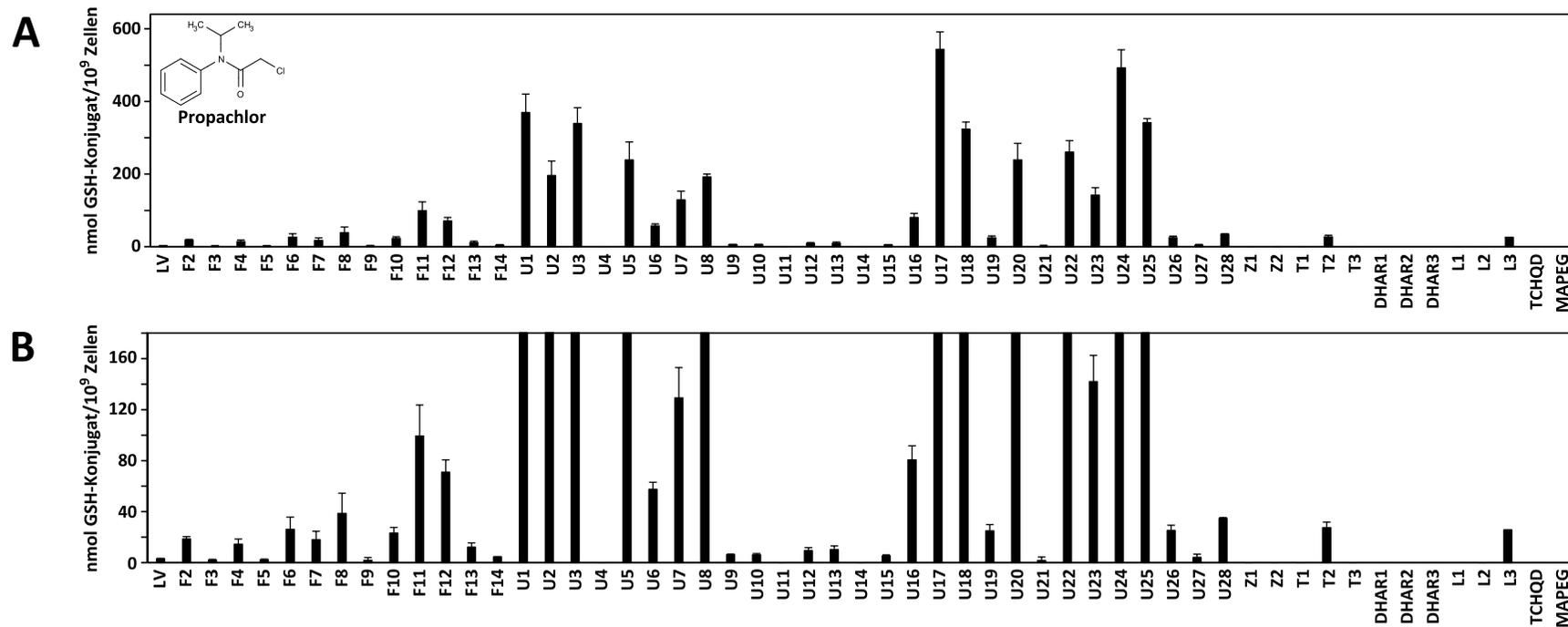
nachgewiesen werden. Wurden die Proteine aus Hefe, die die GSTU17 exprimiert, aufgereinigt und *in vitro* mit GSH und Chloroacetaniliden inkubiert, ergab die Analyse hinsichtlich der Menge der gebildeten GSH-Konjugate eine ähnliche Varianz zwischen den einzelnen Substraten wie in intakten Hefezellen (Daten nicht gezeigt). Grundsätzlich ließ sich feststellen, dass mit zunehmender Größe des Substrates die Anzahl an aktiven GSTs abnahm.





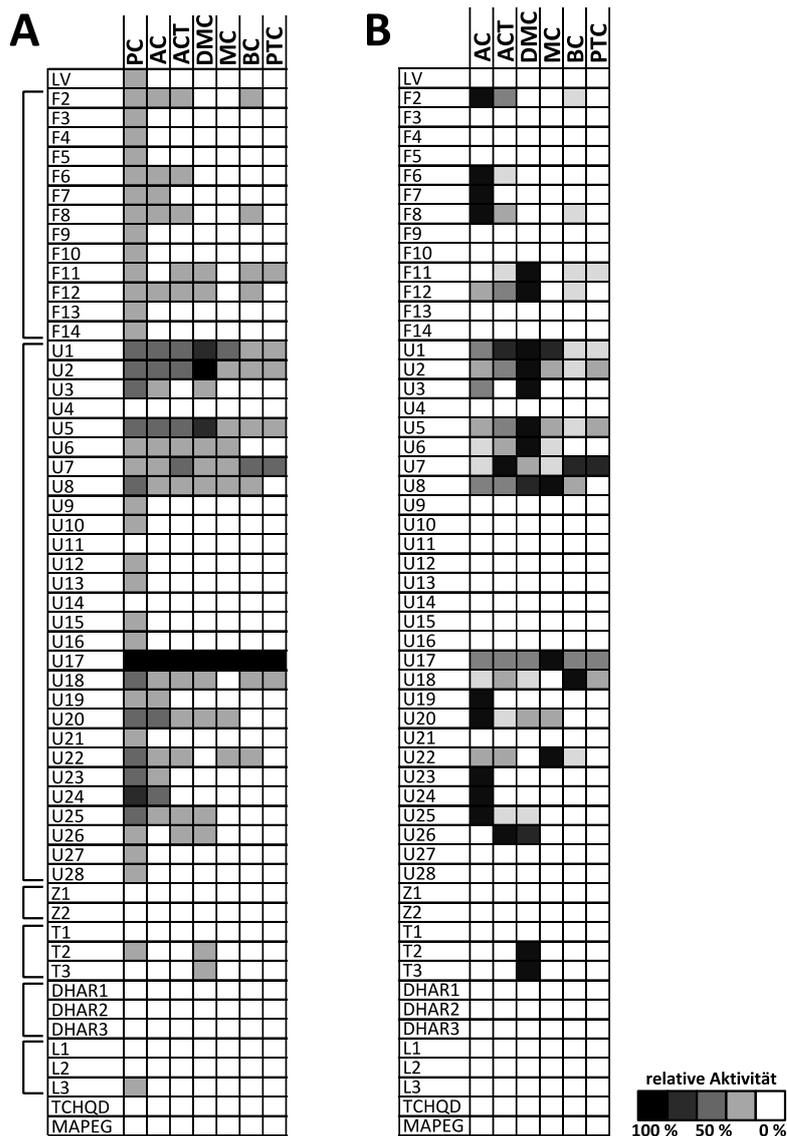
**Abbildung 3.43 Aktivität von AtGSTs gegenüber sechs Chloroacetaniliden in *S. cerevisiae*.**

AtGSTs wurden in der Mutante  $\Delta tef4\Delta gto1\Delta gto2\Delta gto3\Delta cis2\Delta cpc\Delta cpy$  in Galaktose-haltigem Medium exprimiert und nach 16 h Vorinkubation mit 50  $\mu\text{M}$  Chloroacetanilid für 6 h belastet. Bei den getesteten Substanzen handelte es sich um die Chloroacetanilide Alachlor (A), Acetochlor (B), Dimethachlor (C), Metolachlor (D), Butachlor (E) und Pretilachlor (F). Als Kontrolle diente der Leervektor (LV). Die gebildeten GSH-Konjugate wurden methanolisch extrahiert und bei 220 nm in der HPLC nachgewiesen. Die Nachweisgrenze betrug 1 nmol, mit Ausnahme von Metolachlor, bei welchem 0,5 nmol nachgewiesen werden konnten. Die Analyse erfolgte in Triplikaten.

**Abbildung 3.44 Aktivität von AtGSTs gegenüber PC in *S. cerevisiae*.**

AtGSTs wurden in der Mutante  $\Delta tef4\Delta gto1\Delta gto2\Delta gto3\Delta cis2\Delta cpc\Delta cpy$  in Galaktose-haltigem Medium exprimiert und nach 16 h Vorinkubation mit 50  $\mu\text{M}$  PC für 6 h belastet. Die Analyse zeigte eine breite Aktivität vieler AtGSTs, die in den meisten Fällen jedoch nur gering ausfiel (A). Für einen Überblick der weniger aktiven GSTs wurde der Ausschnitt vergrößert (B). Als Kontrolle diente der Leervektor (LV). Die gebildeten GSH-Konjugate wurden in methanolischen Extrakten bei 220 nm nachgewiesen. Die Nachweisgrenze betrug 1 nmol. Die Analyse erfolgte in Triplikaten.

Die Analyse der AtGSTs zeigte, dass es, genau wie bei Chlorotriazininen als Substrat, einige GSTs gab, die die Konjugation aller getesteten Chloroacetanilide katalysierten. Dazu zählten vor allem die GSTU17 und in variierendem Umfang GSTU1, GSTU2 und GSTU5. Darüber hinaus gab es jedoch auch einzelne GSTs, die eine sehr spezifische Aktivität gegenüber einem oder zwei Substraten zeigten, wie GSTU7 mit PTC und BC und GSTU3 und GSTU24 mit PC. Für eine bessere Übersicht wurden die Daten in Relation zu der Aktivität der GSTU17, die mit allen Chloroacetaniliden die höchste Aktivität aufwies, gesetzt (Abbildung 3.45 A).



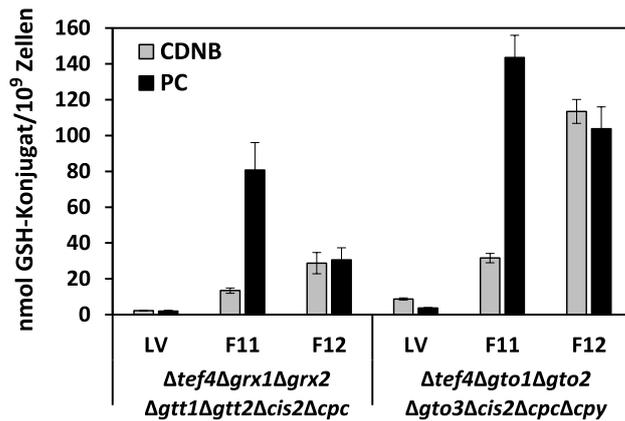
**Abbildung 3.45 Relative Aktivität der AtGSTs gegenüber Chloroacetaniliden in *S. cerevisiae*.**

Die im Hefesystem gemessene Aktivität der GSTU17 zeigte mit allen Substraten die höchste Aktivität und wurde auf 100 % gesetzt (A). Die Aktivität der übrigen heterolog exprimierten AtGSTs wurde in Relation dazu dargestellt. Die Aktivität der einzelnen GSTs wurde zudem im Vergleich der verschiedenen Substrate betrachtet (B). Dafür wurde die höchste Aktivität gegenüber einem Chloroacetanilid auf 100 % gesetzt und die Aktivität dieser GST mit den anderen Substraten in Bezug auf diese maximale Aktivität dargestellt. Da die Aktivität der GSTs mit PC deutlich höher war als mit den anderen Substraten, wurde es nicht in diese Berechnung einbezogen.

In der Übersicht wurde die gesonderte Stellung von PC als GST-Substrat erneut deutlich, bei welchem selbst durch die Expression des Leervektors Aktivität nachgewiesen wurde. Zudem zeigten die GSTs U3, U8, U24 und U25 gegenüber PC im Vergleich zu den anderen getesteten Chloroacetaniliden eine deutlich erhöhte Aktivität. Wurde DMC als Substrat verwendet zeigten GSTU1, GSTU2 und GSTU5 eine mit GSTU17 vergleichbare Aktivität. Auffällig war, dass bei MC häufig im Vergleich zu den anderen getesteten Substraten keine Konjugate nachgewiesen werden konnten, dies war z. B. bei GSTF11, GSTF12 und GSTU18 der Fall.

Wurde die relative GST-Aktivität gegenüber den einzelnen Substraten verglichen, zeichneten sich deutliche Präferenzen ab (Abbildung 3.45 B). Dabei musste die Analyse von PC als Substrat aufgrund der großen Aktivitätsunterschiede zu den anderen Substraten ausgeschlossen werden. Die GSTs der Klasse Phi, mit Ausnahme der GSTF11 und GSTF12, zeigten eine Präferenz für AC als Substrat. Die Unterklasse der GSTU1-U8 war vor allem gegenüber DMC aktiv, wobei GSTU1 im Vergleich zu den anderen GSTs dieser Subklasse ein breiteres Substratspektrum aufwies und GSTU7 mit einer hohen Aktivität gegenüber BC und PTC eine Ausnahme unter allen untersuchten GSTs bildete. GSTs U19 bis U25, mit Ausnahme der GSTU22, zeigten eine Präferenz gegenüber AC. GSTU7 und GSTU18 waren die einzigen GSTs, die bevorzugt gegenüber den größeren Substraten BC und PTC aktiv waren.

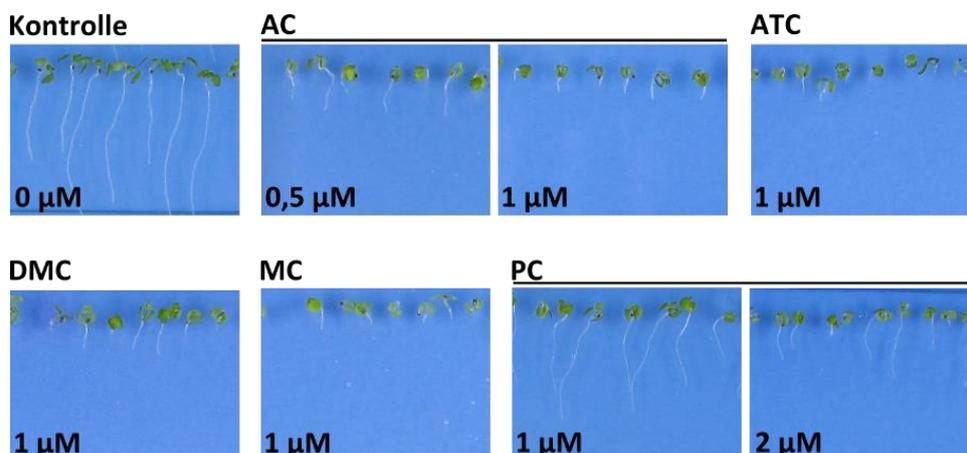
Auffällig war die vollständige Inaktivität der GSTs U9 bis U16 bei sechs der sieben getesteten Substrate. Und auch im Fall von PC lag ihre Aktivität nur geringfügig über dem Level der Kontrolle. Nur bei wenigen GSTFs wurde die Glutathionylierung der Herbizide nachgewiesen, dabei handelte es sich um die kleineren Substrate PC, AC, ACT und DMC. Die Aktivität der GSTs F11 und F12, die vor allem mit PC aber auch mit DMC als Substrat identifiziert wurde, war besonders bemerkenswert. Diesen beiden GSTs fehlt, wie auch der GSTF14 und GSTU14, das Serin im katalytischen Zentrum, welches für die Stabilisierung des Thiolatanions verantwortlich ist. Während sich bei GSTF14 und GSTU14 ein Serin in der Nähe des aktiven Zentrums befindet, fehlt dieses in den beiden anderen GSTs. Die Aktivität von GSTF11 wurde bereits früher mit Anilazin als Substrat in Hefe beobachtet (Krajewski *et al.*, 2013). Daten zu der Aktivität von GSTF12 fehlten bisher. Die Aktivität dieser beiden GSTs wurde näher betrachtet, indem sowohl PC als auch CDNB als Substrate in zwei verschiedenen Hefestämmen,  $\Delta tef4\Delta grx1\Delta grx2\Delta gtt1\Delta gtt2\Delta cis2\Delta cpc$  und  $\Delta tef4\Delta gto1\Delta gto2\Delta gto3\Delta cis2\Delta cpc\Delta cpy$ , analysiert wurden. Bei beiden GSTs wurde eine deutliche Aktivität gegenüber PC und CDNB nachgewiesen (Abbildung 3.46).



**Abbildung 3.46 Aktivität der GSTF11 und GSTF12 gegenüber CDNB und PC in verschiedenen Hefestämmen.** Die GSTs F11 und F12 wurden in den beiden Hefestämmen  $\Delta te f 4 \Delta g r x 1 \Delta g r x 2 \Delta g g t 1 \Delta g g t 2 \Delta c i s 2 \Delta c p c$  und  $\Delta te f 4 \Delta g t o 1 \Delta g t o 2 \Delta g t o 3 \Delta c i s 2 \Delta c p c \Delta c p y$  exprimiert und jeweils mit 50  $\mu M$  CDNB für 2 h bzw. 50  $\mu M$  PC für 6 h inkubiert. Die proteinfreien Zellextrakte wurden mittels HPLC auf die entsprechenden GSH-Konjugate hin untersucht. Als Vergleich wurde Hefe, die mit dem Leervektor (LV) transformiert worden war, verwendet. Die Analyse erfolgte in unabhängigen Triplikaten.

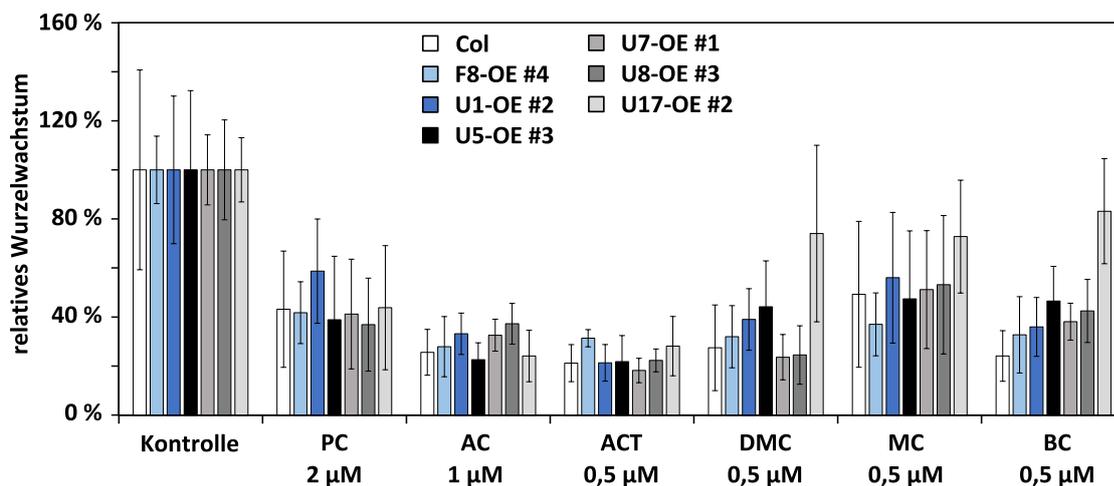
### 3.5.2. Wirkung und Detoxifizierung von Chloroacetaniliden in *A. thaliana*

Die Überexpression von GSTs führte im Fall der ZmGSTI aus Mais und der GmGSTU4 aus Sojabohne in Tabak zu einer erhöhten Resistenz gegenüber Chloroacetaniliden, die sich in der Zunahme von Sproß- und Wurzelmasse und einem besseren Wachstum auf Herbizid-haltigem Medium äußerte (Benekos *et al.*, 2010; Karavangeli *et al.*, 2005). Arabidopsis ist nur teilweise resistent gegenüber Chloroacetaniliden und zeigte mit zunehmender Konzentration dieser Herbizide ein verringertes Wachstum (Abbildung 3.47). Die Blätter verkümmerten und das Wurzelwachstum war stark inhibiert.



**Abbildung 3.47 Einfluss von Chloroacetaniliden auf das Wachstum von Arabidopsis-Keimlingen.** Samen des WT Col-0 wurde auf MS-Platten, die unterschiedliche Konzentrationen verschiedener Chloroacetanilid-Herbizide enthielten, ausgebracht und nach 24-stündiger Stratifizierung für 8 d bei Dauerlicht ( $70 \mu mol m^{-2} s^{-1}$ ) inkubiert. Als Kontrolle diente Lösungsmittel (0,05 % (v/v) DMSO).

Da die Wurzellänge einfach ermittelt werden konnte, wurde dies als Versuchsansatz ausgewählt, um den Einfluss von GST-überexprimierenden Linien der segregierenden T2-Generation auf die Resistenz gegenüber Chloroacetaniliden zu analysieren (Abbildung 3.48). Untersucht wurden die OE-Linien der GSTF8, GSTU1, GSTU5, GSTU7, GSTU8 und GSTU17. Als Kontrolle diente das Wurzelwachstum des WT Col-0. Die Überexpression der GSTs zeigte keinen positiven Einfluss auf das Wurzelwachstum wurden die Keimlinge auf Medium mit PC, AC oder ACT inkubiert. Bei der Untersuchung der größeren Substrate, DMC, MC und BC, waren Keimlinge der Linie U17-OE im Hinblick auf ihr Wurzelwachstum weniger sensitiv gegenüber Chloroacetaniliden. GSTU5-OE und GSTU1-OE zeigten im Vergleich zu Col-0 ein leicht höheres Wurzelwachstum auf Medium mit DMC und BC. Zudem wies die Überexpression der GSTF8 bei geringen Herbizidkonzentrationen einen leicht positiven Effekt auf das Wurzelwachstum auf, der jedoch bei zunehmender Konzentration ausblieb (Daten nicht gezeigt). Die Analyse von homozygoten Linien der nächsten Generation könnte die Ergebnisse präzisieren.



**Abbildung 3.48 Wurzelwachstum von *A. thaliana* auf Chloroacetanilid-haltigem Medium.**

*Arabidopsis* Col-0 und segregierende OE-Linien wurden auf Medium mit verschiedenen Konzentrationen Chloroacetaniliden für 10 d bei Dauerlicht ( $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) inkubiert. Nach dieser Zeit wurde die Länge der Wurzel bestimmt und in Relation zu der Wurzellänge von unbelasteten Keimlingen (0,05 % DMSO) gesetzt. Es wurden pro Bedingungen mindestens zwölf Keimlinge untersucht.

Die Überexpression von einzelnen GSTs wies gegenüber Chloroacetaniliden, die als Substrat für viele GSTs in Hefe nachgewiesen wurden, wie PC oder AC, keinen Effekt auf die Sensitivität des Wurzelwachstums im Vergleich zu Col-0 auf. Mit zunehmender Substratgröße wurde die Spezifität der GSTs höher und die Überexpression von GSTs, die aktiv gegenüber diesen Substraten waren, zeigte auch *in planta* eine verbesserte Resistenz gegenüber diesen Herbiziden.

## 4. Diskussion

Mitglieder der GST-Familie haben eine breite Substratspezifität und weisen untereinander Redundanz in ihrer Substratspezifität auf. Zusätzlich erschwert die hohe Abundanz pflanzlicher GSTs in einer Spezies die Analyse spezifischer Funktionen *in planta* (Sappl *et al.*, 2009). Diese Schwierigkeit bei der Analyse der GSTs wurde in dieser Studie durch die heterologe Expression in Hefe umgangen, wodurch Einblicke in die Substratspezifität dieser Enzyme gegenüber Chlorotriazinen und Chloroacetaniliden gewonnen wurden. Die Relevanz der in Hefe beobachteten GST-Aktivität für die Resistenz gegenüber den Herbiziden dieser beiden Klassen wurde in Arabidopsis eruiert und verdeutlicht die grundlegende Rolle dieser Enzyme bei der Detoxifizierung von Pestiziden in der Pflanze.

Die Markierung mit isotopem Schwefel war dabei ein wichtiges Werkzeug bei Nachweis und Analyse von schwefelhaltigen GSH-Konjugaten. In Kombination mit der Expression pflanzlicher GSTs bietet dieses heterologe Modellsystem eine effiziente Plattform für die Identifizierung von GSH-Konjugaten. Die Grundlagen dafür wurden durch die gezielte Generierung von Hefemutanten und eine optimierte Schwefelmassendetektion etabliert. Der zusätzliche Nachweis von GSH-Konjugaten durch die nicht-enzymatische Reaktion *in vitro* und die Belastung von Arabidopsis-Flüssigkulturen *in vivo* zeigte weitere, potentielle GST-Substrate.

### 4.1. *S. cerevisiae* als Modellorganismus für die Analyse pflanzlicher GSTs

Aufgrund der Größe und Redundanz der GST-Familie in Arabidopsis sind Aktivitäts- und Funktionsanalysen *in planta* nur in wenigen Fällen aussagekräftig (Kitamura *et al.*, 2004; Sappl *et al.*, 2009). In vorangegangenen Arbeiten unserer Arbeitsgruppe erwies sich die heterologe Expression dieser Enzyme in Hefe als geeignetes System, um ihre Aktivität zu untersuchen (Krajewski *et al.*, 2013). Dabei wurde eine GST-defiziente Hefemutante verwendet, in welcher durch die Deletion mehrere Gene die endogene GST-Aktivität verringert war und somit eine gute Basis für die Analyse pflanzlicher GSTs darstellte. In der vorliegenden Arbeit wurde dieses System erfolgreich durch die Deletion weiterer Gene und die Möglichkeit der stabilen Isotopenmarkierung mit  $^{34}\text{S}$  erweitert. Dabei wurden schwefelhaltige Massen zum ersten Mal ungerichtet in Hefe nachgewiesen, eine Vielzahl von Pestiziden auf ihr Potential als GST-Substrate hin getestet und die Analyse der Aktivität pflanzlicher GSTs in *S. cerevisiae* weiterentwickelt.

### 4.1.1. Nachweis von GSH-Konjugaten mittels stabiler Schwefelisotope

Dies ist die erste, ungerichtete Analyse von schwefelhaltigen Metaboliten mittels  $^{34}\text{S}$ -Markierung in *S. cerevisiae*, die ein möglichst breites Spektrum von Metaboliten identifiziert. Der sensitive Nachweis, den die ICR-FT/MS ermöglichte, führte zu der Identifizierung von 232 putativen schwefelhaltigen Massen in diesem Organismus. Neben den häufig im Rahmen von metabolischen Studien in Hefe identifizierten Substanzen, wie GSH, Cystathionin und  $\gamma$ -Glutamyl-Cystein, wurden zusätzlich 28 bekannte und 201 unbekannte schwefelhaltige Massen nachgewiesen (Lafaye *et al.*, 2005; Tanaka *et al.*, 2007). Insgesamt wurden 3 % aller in Hefe detektierten Massen als schwefelhaltig identifiziert, was mit dem in Pflanzen ermittelten Wert vergleichbar ist (Gläser *et al.*, 2014). Im Gegensatz dazu besitzen in der Hefedatenbank (Yeast Pathways Database, <http://pathway.yeastgenome.org/>) 11 % aller eingetragenen Metabolite Schwefel. Ein Großteil davon sind jedoch CoA-Derivate der Fettsäurenbiosynthese. Der Großteil der, in dieser Studie gefundenen, putativen Schwefelmassen entsprach nicht annotierten Metaboliten. In Pflanzen wurde aufgezeigt, dass mehr als 70 % der Massen einer ungerichteten Studie unbekanntem Metaboliten zugeordnet werden können und die entsprechende Zurodnung eine der größten Herausforderungen bei der Analyse des Metaboloms darstellt (Giavalisco *et al.*, 2011; Gläser *et al.*, 2014; Kind und Fiehn, 2007).

Daher konzentrierten sich bisherige Studien vor allem auf bekannte Schwefelmetabolite in Hefe. Godat und Kollegen untersuchten mit  $^{15}\text{N}$  markierte Hefemetabolite und wiesen auf diese Weise mittels Orbitrap-MS elf Schwefelmetabolite nach (Godat *et al.*, 2010). In einer Studie, bei der die Oszillation von Metaboliten in Abhängigkeit von der Wachstumsphase analysiert wurde, wiesen vor allem die schwefelenthaltenden Komponenten eine regelmäßige Oszillation und zeitliche Regulation auf (Tu *et al.*, 2007). Mittels LC-MS wurden sieben schwefelhaltige Metabolite identifiziert (Lafaye *et al.*, 2005). Vergleicht man diese Ergebnisse mit denen der vorliegenden Studie, unter der Vernachlässigung der identifizierten Peptide, wurden durch den Einsatz von  $^{34}\text{S}$ -Markierung und sensitiver ICR-FT/MS mehr schwefelhaltige Metabolite nachgewiesen (Tabelle 4.1). Die Ethyl-, Methyl- und 2-Hydroxyethyl-GSH-Konjugate wurden bisher nur in tierischen Organismen beobachtet (Wang und Ballatori, 1998). Darüber hinaus birgt der große Anteil an unbekanntem Metaboliten in Hefe, einem Organismus, der bereits gut untersucht ist und für den viele Deletionsmutanten vorhanden sind, das Potential, weitere Einblicke in das Schwefelmetabolom zu erhalten. Studien haben gezeigt, dass die Kombination von Isotopenmarkierung und hochauflösender MS die Möglichkeit bietet, einer Masse eine Summenformel zuzuordnen (Giavalisco *et al.*, 2011; Hegeman *et al.*, 2007; Kind und Fiehn, 2006). Im Gegensatz zur stabilen Markierung mit anderen Isotopen und der Verwendung der natürlichen Abundanz von schwerem

Schwefel hat der Einsatz von  $^{34}\text{S}$  den Vorteil, dass schwefelhaltige Metabolite mit geringer Abundanz eindeutig nachgewiesen werden können.

Die sensitive und zuverlässige Markierung von schwefelhaltigen Metaboliten sollte die Grundlage für die Analyse von Pestiziden als potentielle GST-Substrate in *S. cerevisiae* bilden. Die Deletion des Konjugatkatabolismus war dabei eine weitere Modifikation des bestehenden Hefesystems, um die Detektion von GSH-Konjugaten zu fördern. Dies wurde anhand der GST-Substrate CDNB und BITC nachgewiesen.

**Tabelle 4.1 In Metabolismustudien identifizierte, schwefelhaltige Metabolite in *S. cerevisiae*.**

In verschiedenen Studien wurden in Hefe zahlreiche Schwefelmetabolite identifiziert. Die Zahl und Abundanz der Metabolite kann dabei von der Nachweismethode, dem untersuchten Hefestamm und den Kultivierungsbedingungen abhängen.

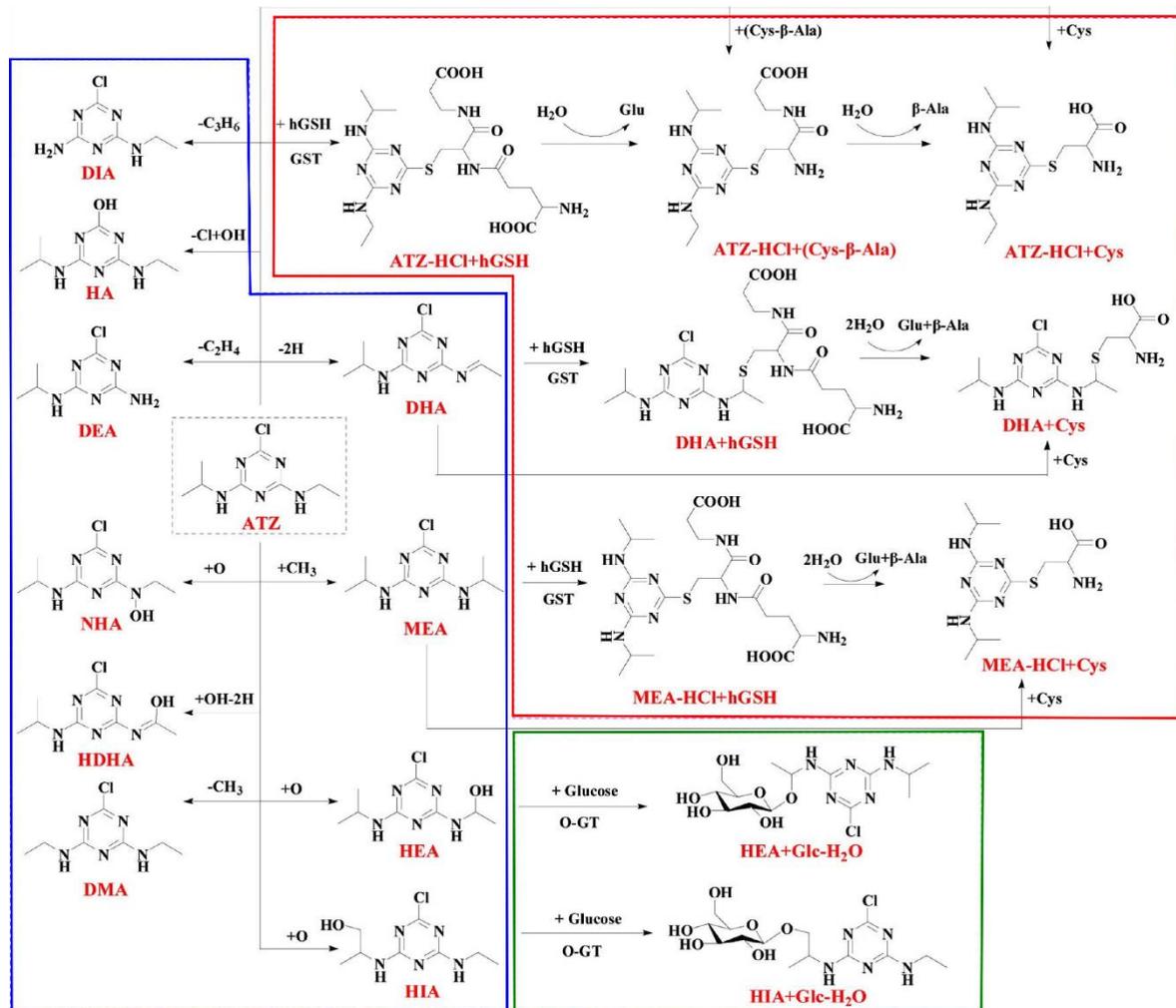
|                              | Lafaye 2005 | Tu 2007 | Godat 2010 | diese Studie |
|------------------------------|-------------|---------|------------|--------------|
| Cystein                      | +           | +       | +          |              |
| Homocystein                  | +           | +       | +          |              |
| Methionin                    | +           | +       | +          |              |
| Cysteinyl-Glycin             |             |         | +          | +            |
| N-Acetyl-Methionin           |             |         |            | +            |
| Cystathionin                 | +           | +       | +          | +            |
| $\gamma$ -Glutamyl-Cystein   | +           |         | +          | +            |
| Acetylcystathionin           |             |         |            | +            |
| Thiamin                      |             | +       |            |              |
| Cystathioninsulfoxid         |             |         |            | +            |
| Pantethein                   |             |         |            | +            |
| Methylthioadenosin           |             |         | +          |              |
| Glutathion                   | +           | +       | +          | +            |
| S-Methyl-Glutathion          |             |         |            | +            |
| D-Pantothenoyl-Cystein       |             |         |            | +            |
| S-(2-Hydroxyethyl)glutathion |             |         |            | +            |
| D-Pantethein-4'-phosphat     |             |         |            | +            |
| S-Adenosylhomocystein        | +           | +       | +          | +            |
| S-Acetylphosphopantethein    |             |         |            | +            |
| S-Succinylglutathion         |             |         |            | +            |
| S-Glutathionyl-Cystein       |             |         |            | +            |
| S-Adosylmethionin            |             | +       |            |              |
| Glutathiondisulfid           | +           | +       | +          | +            |
| Dephospho-CoA                |             |         |            | +            |
| Coenzym A                    |             | +       |            |              |
| Acetyl-CoA                   |             | +       |            | +            |

Trotz der Kombination aus Schwefelmarkierung, sensitiver MS und Konjugatakkumulation konnten in Hefe nur für sechs von insgesamt 42 analysierten Pestiziden eine GSH-Konjugatbildung durch endogene Enzyme nachgewiesen werden. Anhand der zunächst negativen Ergebnisse bei der Analyse von ATZ im Hefesystem und weiterer, als GST-Substrate bekannter Pestizide, wie Alachlor und Metolachlor, ist davon auszugehen, dass die endogenen GSTs aus Hefe nur eine untergeordnete Rolle bei der Detoxifizierung der meisten Pestizide spielen.

In Pilzen existieren neben Enzymen für die Glutathionylierung und Glucosylierung von Xenobiotika auch effiziente Export-Pumpen, die Substanzen ohne enzymatische Modifikationen aus der Zelle transportieren (Cabrito, 2011). Die Forschung deutet darauf hin, dass es sich in *S. cerevisiae* dabei um den generellen Mechanismus zum Schutz vor Xenobiotikaschäden handelt (Dikicioglu *et al.*, 2014; Dos Santos *et al.*, 2012). In *Candida spec.*, einer Hefegattung zu der viele humane Pathogene gehören, ist ein erhöhter Efflux von antimykotischen Substanzen der häufigste Grund für Resistenzen (Cannon *et al.*, 2009). Zusätzlich zu der hohen Anzahl von verschiedenen Efflux-Transportern zeigen einzelne Transporter zudem eine breite Substratspezifität und ermöglichen somit ein effizientes Detoxifizierungssystem (Jungwirth und Kuchler, 2006; Sá-Correia *et al.*, 2009). Kürzlich wurden Daten präsentiert, die den Einschluss von lipophilen Toxinen in intrazellulären Lipidtröpfchen als weiteren möglichen Resistenzmechanismus in Hefe beschreiben (Chang *et al.*, 2015). Diese Mechanismen und das unzureichende Substratspektrum der endogenen GSTs in Hefe lassen sich zum Teil durch die heterologe Expression pflanzlicher GSTs umgehen. Für eine möglichst geringe Probenanzahl sollte dabei auf Pools von GST-exprimierenden Hefen zurückgegriffen werden. Am Beispiel von ATZ wurde auf diese Weise das entsprechende GSH-Konjugat erfolgreich nachgewiesen.

Die Untersuchung der nicht-enzymatischen Reaktion von Pestiziden mit GSH brachte einen zusätzlichen Informationsgewinn und resultierte bei 35 % der getesteten Pestizide im Nachweis eines GSH-Konjugates. Erfolgreich konnte die Konjugate von sieben verschiedenen Herbizidklassen nachgewiesen werden. ATZ, AC und MC, die schon lange als GST-Substrate bekannt sind, wurden als *proof-of-principle* für die Auswertung der Daten betrachtet (Lamoureux *et al.*, 1970; Scarponi *et al.*, 1991). In den nicht-enzymatischen *in vitro*-Proben wurden zudem Konjugate von Mefenacet, Fentrazamid, Benoxacor, Chloranil und Dichlon identifiziert, welche zuvor, mit Ausnahme von Benoxacor, noch nicht beschrieben waren und bei denen die Untersuchung auf ihre enzymabhängige Bildung noch aussteht. Der Nachweis von möglichen GSH-Konjugaten *in vitro* ist vorteilhaft, da die Proben schnell generiert werden können, aufgrund der wenigen eingesetzten Substanzen eine weniger komplexe Matrix in der MS aufweisen und in den hier vorgelegten Analysen häufig zu einem positiven Nachweis von GSH-Konjugaten führten.

Ob und in welchem Umfang die nachgewiesenen GSH-Konjugate *in planta* gebildet werden, muss im pflanzlichen System überprüft werden. Einige der zuvor als GSH-Konjugat identifizierten Substrate wurden auch nach der Inkubation mit Pflanzen nachgewiesen, z.B. die Chloroacetanilid-Herbizide. Aus der Klasse der Chlorotriazine wurden im *screen* der Arabidopsis-Flüssigkulturen lediglich die GSH-Konjugate von Sebuthylazin und Cyanazin identifiziert, während bei der nicht-enzymatischen Reaktion alle Substanzen dieser Herbizidklasse in einem GSH-Konjugat resultierten. Ein weiteres Beispiel ist Fluorodifen, dessen GSH-Konjugat sowohl *in vitro* als auch in Hefe, jedoch nicht in Arabidopsis, nachgewiesen wurde. Neben der endogenen Expression der GSTs in Arabidopsis muss das mögliche Vorkommen konkurrierender Detoxifizierungsmechanismen berücksichtigt werden. Anhand von ATZ wurde gezeigt, dass die Detoxifizierung dieses Herbizides nicht nur in unterschiedlichen Pflanzenspezies und -linien, sondern selbst in verschiedenen Pflanzenteilen stark variieren kann (Shimabukuro *et al.*, 1971; Zhang *et al.*, 2014) (Abbildung 4.1). Zudem kann ein Abbauweg zusätzlich von sekundären Faktoren beeinflusst werden. So haben Benzoxazinonen Auswirkung auf die Hydroxylierung von ATZ in Mais (Raveton *et al.*, 1997).

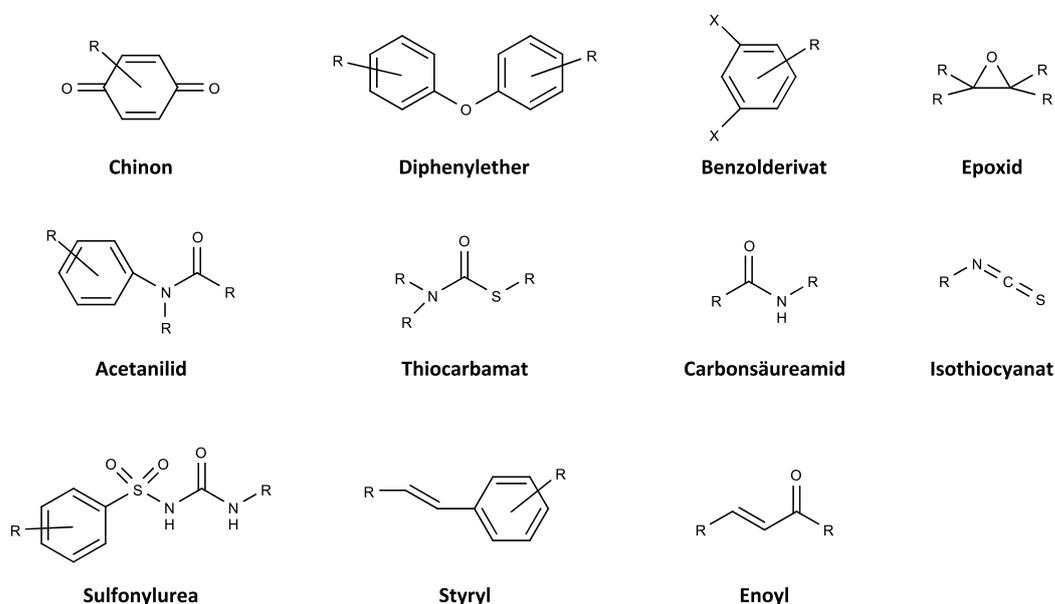


**Abbildung 4.1 Detoxifizierung von ATZ in *Medicago sativa*.**

In Extrakten von *M. sativa*, die zuvor mit ATZ belastet wurden, wurden verschiedene Abbauprodukte von ATZ identifiziert, die auf das Vorhandensein mehrerer paralleler Detoxifizierungswege für dieses Herbizid schließen lassen. Produkte von ATZ, die durch Enzyme der Phase I detoxifiziert wurden, sind blau umrahmt. Der rote Rahmen fasst die Konjugationsprodukte mit Homoglutathion (hGSH) zusammen, während der grüne Rahmen die Produkte der Phase II, bei der Glucosyltransferasen beteiligt sind, umschließt. (Reprinted with permission from Chemical Modification and Degradation of Atrazine in *Medicago sativa* through Multiple Pathways, Jing Jing Zhang, Yi Chen Lu, and Hong Yang, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2014 62 (40), 9657-9668. Copyright 2014 American Chemical Society.)

Grundlegend wurde bei dem Großteil der hier untersuchten Pestizide kein GSH-Konjugat identifiziert. Dies entspricht den Ergebnissen vorangegangener Studien, bei denen die Konjugation an das Tripeptid nur in wenigen Fällen *in planta* nachgewiesen wurde (Croucher *et al.*, 1999; Hutson *et al.*, 1998). Dies steht im Gegensatz zu den Ergebnissen von Detoxifizierungsanalysen im medizinischen Bereich, bei welchen GSH-Konjugate häufig nachgewiesen werden. Dort ist die Vorhersage der Reaktivität und der Nachweis der Glutathionierung ein essentieller Schritt bei der Entwicklung neuer Medikamente, da Degradationsprodukte potentiell toxisch sein könnten oder ein erhöhter Metabolismus die Wirkung reduzieren kann (Wen und Fitch, 2009). Dabei gibt es verschiedene Ansätze, um GSH-Konjugate in der MS effizient zu identifizieren. Alle basieren auf der

Generierung von GSH-Konjugaten *in vitro*, indem Substrat, GSH, Lebermikrosomen und NADPH (nötig für die Aktivität von P450s) inkubiert und anschließend mittels MS analysiert werden (Lim *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2005). Die Verwendung einer Mischung von GSH und mit  $^{13}\text{C}$  und  $^{15}\text{N}$  markiertem GSH macht die Analysen weniger anfällig für falsch positive Ergebnisse (Liao *et al.*, 2012; Lim *et al.*, 2008). Neben der mehrfachen Fragmentierung der Substanzen in der LC-MS/MS (Flüssigchromatographie-MS) hat die Anwendung von hochauflösenden MS-Geräten für die Detektion des Gesamtspektrums in Kombination mit *mass defect filtering* (MDF) gute Ergebnisse gebracht (Lim *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2007). Die Identifizierung von Metaboliten basiert dabei auf der Hypothese, dass die Unterschiede im Massendefekt derselben Substanz trotz unterschiedlicher Biotransformationen nur sehr geringe Abweichungen zeigen. Dies setzt die akkurate Massendetektion hochauflösender MS-Geräte voraus; auf die Fragmentierung für die Identifizierung von GSH-Konjugaten kann dafür verzichtet werden (Wen und Fitch, 2009; Zhang *et al.*, 2009). In Kombination mit Isotopen Mustern können auch in komplexen biologischen Proben GSH-Konjugate schnell und zuverlässig identifiziert werden. Im Rahmen dieser Analysen werden mehrere verschiedene GSH-Konjugate einer Substanz nachgewiesen und die tatsächliche Bandbreite und ihre biologische Relevanz *in vivo* bleibt unklar (Liao *et al.*, 2012; Zhu *et al.*, 2007). Der überwiegende Teil dieser Konjugate wurde zuvor durch P450s modifiziert, was die potentielle Bedeutung dieser Enzyme für die Glutathionylierung unterstreicht.



**Abbildung 4.2 Molekulare Substrukturen, die mit GSH reagieren.**

Es gibt eine Vielzahl von Substrukturen, die die Reaktion mit GSH begünstigen. Häufige Abgangsgruppen sind Halogene, die in einer Substitutionsreaktion durch GSH ersetzt werden. Begünstigt wird die Reaktion durch elektronegative Gruppen (X) im Molekül. Moleküle mit  $\alpha,\beta$ -ungesättigten Bindungen reagieren über eine nukleophile Addition, wobei mit abnehmender Elektronendichte am  $\beta$ -Kohlenstoff die Wahrscheinlichkeit für einen nukleophilen Angriff steigt.

Basierend auf den umfangreichen Ergebnissen aus der medizinischen Forschung existieren verschiedene Modelle, um die Metabolisierung und GSH-Reaktivität von Substanzen vorherzusagen (Kalgutkar und Soglia, 2005; Schultz *et al.*, 2007; Schwöbel, Johannes A H *et al.*, 2011). Eine Vielzahl von Substrukturen dienen als potentielle Substrate für die Glutathionylierung, insbesondere wenn durch die Aktivität von P450s funktionelle Gruppen eingeführt werden (Abbildung 4.2).

In einigen Fällen ist davon auszugehen, dass eine zusätzliche Modifikation durch P450s die Konjugation von Pestiziden an GSH positiv beeinflusst oder sogar eine Voraussetzung für die Glutathionylierung darstellt, wie es bei den meisten Medikamenten der Fall ist. Da viele Pestizide, die GST-Substrate sind, auch von P450s metabolisiert werden, ist ein funktioneller Zusammenhang dieser beiden Enzyme nicht unwahrscheinlich (Siminszky, 2006). Im Rahmen dieser Arbeit schließt weder die nicht-enzymatische Reaktion noch die Analyse der potentiellen GST-Substrate in Hefe diese Reaktion mit ein. Denn im Gegensatz zu anderen Organismen besitzt Hefe lediglich zehn P450-Gene, von denen keines bisher in Zusammenhang mit dem Xenobiotikametabolismus beschrieben wurde. Zudem ist die Expression der endogenen P450s in Hefe sehr stark von der Wachstumsphase, dem verwendeten Hefestamm und dem Glukosegehalt des Mediums abhängig (Callen und Philpot, 1977). Daher ist eine potentiell notwendige Aktivierung von GST-Substraten in *S. cerevisiae* ohne die heterologe Expression von P450s sehr unwahrscheinlich (van Leeuwen *et al.*, 2011). Ein Beispiel dafür stellt die GSH-Konjugation des Medikaments Clozapin durch humane hGSTs in Hefe dar (Vredenburg *et al.*, 2013). Die Expression einer bakteriellen P450 war eine notwendige Voraussetzung für die Bildung von insgesamt fünf verschiedenen Clozapin-GSH-Konjugaten, die spezifisch für die eingesetzte hGSTs waren.

Für die Identifizierung von potentiellen GST-Substraten ist die Expression von pflanzlichen GSTs für viele Pestizide essentiell, was am Beispiel der ATZ-Konjugation in Hefe gezeigt wurde. Die zusätzliche Coexpression von P450s könnte das bestehende Hefesystem zusätzlich erweitern. Die Verifizierung von zuvor *in silico* und *in vitro* ermittelten Ergebnissen in Hefe durch die Expression von mehreren pflanzlichen GSTs gleichzeitig bietet das Potential für eine zuverlässige und schnelle Methode, um Pestizide als GST-Substrate zu identifizieren.

### 4.1.2. Charakterisierung von pflanzlichen GSTs in Hefe

Die heterologe Expression von GSTs aus Arabidopsis in *S. cerevisiae* bildete durch die Verwendung der isotopen Schwefelmarkierung und von entsprechenden Hefemutanten eine solide Grundlage, um Substratspektrum und -spezifität dieser Enzyme zu untersuchen. Die Deletion des Konjugatkatabolismus ermöglichte eine zuverlässige Quantifizierung der GSH-Konjugate, ohne dass Abbauprodukte berücksichtigt werden mussten. Auf diese Weise wurde zum ersten Mal die hohe

Spezifität von Chlorotriazinen als Substrate für Arabidopsis-GSTs beschrieben, die ein Grund für den Erfolg dieser hoch-selektiven Herbizide sein könnte. McGonigle und Kollegen zeigten bereits im Jahr 2000, dass in Mais, ähnlich wie in Arabidopsis, nur wenige GSTs Aktivität gegenüber ATZ aufweisen (McGonigle *et al.*, 2000). Die Analyse einzelner Arabidopsis-GSTs im heterologen System zeigte dabei Spezifitäten auf, die aufgrund der geringen Aktivität *in planta* nicht festgestellt worden wären.

Erstmals wurden die GSTs F12 und F13 auf ihre Aktivität hin analysiert. Hierbei wies die GSTF12, trotz fehlendem, katalytisch aktivem Serin, deutliche Aktivität gegenüber mehreren Chloroacetaniliden auf. Dies wird im folgenden Kapitel genauer diskutiert (Abschnitt 4.2.2). Im Gegensatz zur heterologen Expression von pflanzlichen GSTs in *E. coli*, bei der die Proteine gelegentlich nicht oder nicht in ausreichender Menge funktional aufgereinigt werden können (Dixon *et al.*, 2009; Lan *et al.*, 2009), gab es bei der Analyse von GSTs im Hefesystem bisher keine Hinweise auf Probleme bei der Expression. Neben der Analyse einzelner GSTs wurde in dieser Arbeit die Möglichkeit aufgezeigt, durch Coexpression verschiedener GSTs Effekte einer potentiellen Heterodimerisierung zu untersuchen. Heterodimere zweier GSTs zeigen in einigen Fällen eine zum Homodimer abweichende Aktivität (Cummins *et al.*, 1997; Dixon *et al.*, 1997; Sommer und Böger, 1999). Die Verwendung von Plasmiden mit CEN/ARS-Replikationsursprung, die in 1-2 Kopien in der Zelle vorliegen, gewährleistet eine vergleichbare Anzahl von GST-Monomeren in der Zelle (Romanos *et al.*, 1992). Dies ist ein weiterer Vorteil gegenüber einem bakteriellen Expressionssystem, bei dem Plasmide in hoher und daher meist stark variierender Kopienzahl verwendet werden, um genügend Protein für die *in vitro*-Analyse zu erhalten (Dixon *et al.*, 1999). Die Ergebnisse der Coexpression zweier GSTs im Hefesystem deuten auf eine vergleichbare und stabile Aktivität hin, unabhängig vom verwendeten Plasmid.

Ein weiterer Aspekt könnte die Coexpression von P450s und GSTs sein, um multienzymatische Detoxifizierungskomplexe im Hefesystem zu untersuchen. Studien zu pflanzlichen, endogenen GST-Substraten, wie der Biosynthese von Camalexin, Glucosinolaten und Anthocyanen, legen eine Zusammenarbeit von P450s und GSTs nahe (Bednarek, 2012; Li *et al.*, 2011). In der Camalexinbiosynthese wird die Inkorporation des Schwefels in Indol-3-Acetonitril (IAN) über GSH wahrscheinlich durch eine GST katalysiert (Su *et al.*, 2011). Die Synthese von IAN kann von verschiedenen P450s katalysiert werden (Nafisi *et al.*, 2007). Im Hefesystem resultierte die Coexpression dieser P450s mit den verschiedenen GSTs in unterschiedlichen Mengen IAN-GSH und offenbarte eine gewisse Spezifität zwischen P450 und GST (S. Mucha, persönliche Kommunikation). GSTs werden zudem häufig in Zusammenhang mit Flavonoiden gebracht, ohne dass ihre genaue Funktion bei der Biosynthese, dem Transport oder Abbau klar ist (Loyall *et al.*, 2000; Moridani *et al.*, 2001; Saito *et al.*, 2013). Durch die Möglichkeit Stoffwechselwege des pflanzlichen

Sekundärmetabolismus in Hefe nachzubauen, kann auch in diesem Fall die mögliche Beteiligung von GSTs in Hefe durch Coexpression und, die in dieser Arbeit etablierte, Schwefelmarkierung aufgeklärt werden (Brazier-Hicks und Edwards, 2013; Ro und Douglas, 2004; Verpoorte *et al.*, 1999). Hefe ist dabei ein einfaches eukaryotisches System, welches leicht zu manipulieren ist, schnell wächst und kosten-effizient ist, um Fragestellungen zur Interaktion und Spezifität dieser Enzymfamilien, die an der Detoxifizierung beteiligt sind, zu beantworten.

### 4.2. Aktivität von GSTs aus *Arabidopsis* gegenüber Herbiziden

Substanzen der Herbizidklassen der Chlorotriazine und Chloroacetanilide wurden als Substrate für 55 GSTs aus *Arabidopsis* im Hefesystem getestet. Obwohl diese Herbizide schon lange als GST-Substrate bekannt sind und einige ihrer Vertreter sehr gut untersucht sind, sind umfassende, vergleichende Informationen zur Aktivität einzelner GSTs begrenzt.

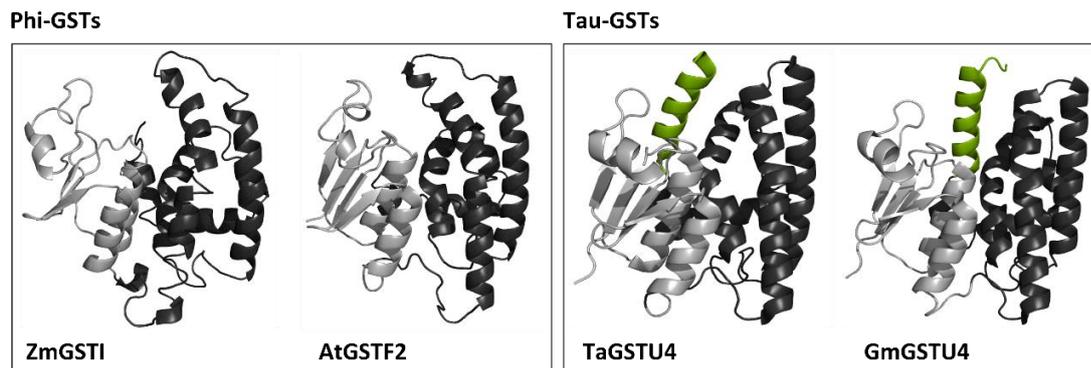
Die Konjugation der Chlorotriazine wurde lediglich von drei, nicht nah verwandten, GSTs, GSTU5, GSTU18 und GSTU22, katalysiert und repräsentieren damit die ersten Substrate, bei denen eine hohe Spezifität der *Arabidopsis*-GSTs nachgewiesen wurde. Basierend auf diesen Ergebnissen können Regionen dieser Enzyme ermittelt werden, die Einfluss auf die Bindung und Aktivität gegenüber Mitgliedern dieser Herbizidklasse haben. Die Ergebnisse der Chloroacetanilide wiesen, im Vergleich zu den Chlorotriazinen, eine höhere Struktur-Aktivität-Abhängigkeit zwischen eingesetztem Substrat und GST-Aktivität auf. Dabei fielen GSTs auf, die im Hinblick auf diese Herbizidklasse ein breites Substratspektrum hatten, während andere GSTs größere Chloroacetanilide deutlich diskriminierten. Die erlangten Ergebnisse, sowohl aus dieser als auch aus vorangegangenen Arbeiten, bieten Ansätze, um die unterschiedliche Substratspezifität der GSTs zu beleuchten.

#### 4.2.1. Spezifität gegenüber Chlorotriazinen innerhalb der GST-Familie aus *A. thaliana*

Chlorotriazine gehören zu den bedeutendsten Herbiziden der Welt und die Selektivität in Nutzpflanzen beruht maßgeblich auf ihrer Detoxifizierung durch GSTs (Lamoureux *et al.*, 1973; Shimabukuro *et al.*, 1971). Obwohl die Konjugation von ATZ an GSH bereits häufig Forschungsgegenstand war, ist die vorliegende Studie eine der wenigen, in der die spezifische Aktivität umfassend innerhalb der Enzymfamilie einer Spezies untersucht wurde. In Mais haben McGonigle und Kollegen anhand einer EST-Datenbank 42 GSTs identifiziert und zwölf von ihnen auf ihre Aktivität gegenüber sieben verschiedenen Substraten untersucht (McGonigle *et al.*, 2000). Vier dieser zwölf GSTs waren in der Lage ATZ zu konjugieren, wobei die ZmGSTI die höchste Aktivität

aufwies. Die Rolle von ZmGSTI als Schlüsselenzym der ATZ-Detoxifizierung in Mais bleibt jedoch umstritten (Dixon *et al.*, 1997; Holt *et al.*, 1995). In der vorliegenden Arbeit konnte die Aktivität dieser GST im Hefesystem ebenfalls nicht bestätigt werden. Neben den Enzymen aus Mais wurden auch 14 der mehr als 100 putativen GSTs aus Sojabohne – 13 davon GSTUs - näher analysiert, von denen acht an der Konjugation von ATZ mit GSH beteiligt waren (McGonigle *et al.*, 2000). Zwei dieser Enzyme wiesen dabei eine höhere ATZ-Aktivität als ZmGSTI aus Mais auf. Ähnlich wie bei den Arabidopsis-GSTs U5 und U6, zeigte die GmGST, die am nächsten zu der aktivsten GST in Sojabohne, GmGSTU26, verwandt war, 10 % deren Aktivität gegenüber ATZ.

In Arabidopsis wurde die Konjugation von ATZ-GSH maßgeblich durch die GSTs U5, U18 und U22 katalysiert. Geringere Aktivitäten wurden bei GSTU1, GSTU6 und GSTU17 detektiert. Die geringe Anzahl aktiver GSTs in Arabidopsis und die deutlich geringere Aktivität der ihnen nächst verwandten Enzyme ermöglicht den Zusammenhang zwischen Struktur und Aktivität näher zu untersuchen. Zudem wies die Aktivität der GSTU5, GSTU18 und GSTU22 nicht nur untereinander sondern auch in Abhängigkeit zum eingesetzten Chlorotriazin-Derivat, deutliche Varianzen auf und deutet auf eine zusätzliche Spezifität, abhängig von den unterschiedlichen Seitengruppen der Chlorotriazine, hin. Anhand der Primärstruktur lässt sich keine Aussage über die Substratspezifität der GSTs machen. Selbst sehr nah verwandte GSTs der Sojabohne, welche in 88,5 % der Primärstruktur übereinstimmen, weisen deutliche Unterschiede in ihrer Substratspezifität und Aktivität auf (McGonigle *et al.*, 2000). Aber mit zunehmenden Kenntnissen über die dreidimensionale Struktur der Enzyme können Vorhersagen darüber gemacht werden, welche Regionen an der Substratbindung beteiligt sind. Die in Mais aktive ZmGSTI wurde mit dem ATZ-GSH-Konjugat kristallisiert, wodurch die an der Bindung beteiligten Aminosäuren eindeutig identifiziert wurden (Prade *et al.*, 1998). Eine Schlüsselrolle wurde dabei für Trp12, Phe35 und Ile118 festgestellt, deren Austausch zu einer verringerten Bindung und Aktivität gegenüber ATZ führte (Labrou *et al.*, 2005). Auf Grundlage dieser Kristallstruktur wurden Aminosäuren in GSTU5 aus Arabidopsis ausgewählt, die eine putative Rolle bei der Substratbindung spielen könnten. Der Austausch dieser Aminosäuren hatte jedoch keinen Effekt auf die Enzymaktivität. Während die ZmGSTI zu der Phi-Klasse in Mais gehört, sind sowohl die aktiven Arabidopsis-GSTs als auch die, zuvor in Sojabohne aktiv gegenüber ATZ getesteten, GSTs Mitglieder der Tau-Klasse (McGonigle *et al.*, 2000). Ein Unterschied zwischen Phi- und Tau-GSTs ist die Anordnung des C-Terminus im nativen Protein. Während in den kristallisierten GSTFs ZmGSTI und AtGSTF2 die Bindetasche mit dem aktiven Zentrum eine Kaverne im Interaktionsbereich des Dimers bildet, liegt in GSTUs die C-terminale Helix über der Bindetasche und blockiert teilweise das aktive Zentrum (Axarli *et al.*, 2009a; Neufeind *et al.*, 1997; Reinemer *et al.*, 1996; Thom *et al.*, 2002) (Abbildung 4.3). Diese Konformation ist auch in humanen GSTs der Alpha- und Omega-Klasse beschrieben worden (Board *et al.*, 2000; Sinning *et al.*, 1993).



**Abbildung 4.3 Dreidimensionale Struktur von pflanzlichen GSTs der Phi- und Tau-Klasse.**

Dargestellt sind die Strukturen der kristallisierten GSTs der Phi-Klasse, ZmGSTI aus Mais (1BYE) und GSTF2 aus Arabidopsis (1BX9), und der Tau-Klasse, GSTU4 aus Weizen (1GWC) und Sojabohne (4TOP). Der N-terminale Teil der Proteine ist hellgrau und der C-terminale Teil dunkelgrau dargestellt. Die C-terminale Helix, die in den GSTUs an der Bindung von Substraten beteiligt ist, ist grün markiert.

In humanen hGSTAs sind drei Regionen, die zur Bildung der *H-site* beitragen und somit die Substratspezifität beeinflussen, beschrieben: die Schleife zwischen  $\beta_1$  und  $\alpha_1$ , der C-terminale Teil der Helix  $\alpha_4$  und der C-Terminus mit der Helix  $\alpha_9$  (Bruns *et al.*, 1999; Kurtovic, Shokeer *et al.*, 2008). Die Kristallisationen der Tau-GSTs, TaGSTU4, GmGSTU4 und GmGSTU10 bestätigen die Beteiligung dieser Regionen an der *H-site* in pflanzlichen GSTs und weisen eine weitere, an der Bindung beteiligte Region auf, die am Ende der Helix  $\alpha_6$  liegt (Axarli *et al.*, 2009b; Skopelitou *et al.*, 2015; Thom *et al.*, 2002) (Abbildung 4.4). Die Aminosäuren, die an der Bildung der *H-site* beteiligt sind, und ihr Einfluss auf die Bindung und Glutathionierung von Nitrobenzyl-GSH, Fluorodifen und GSH sind weitgehend bekannt (Abbildung 4.4 C). Von den kristallisierten GSTUs weist lediglich die GmGSTU4 eine geringe Aktivität gegenüber ATZ aus und die Bindung dieses Substrates an GSTUs ist bisher ungeklärt (McGonigle *et al.*, 2000). Dies erschwert zusätzlich die Vorhersage der ATZ-Bindung in Arabidopsis-GSTs.

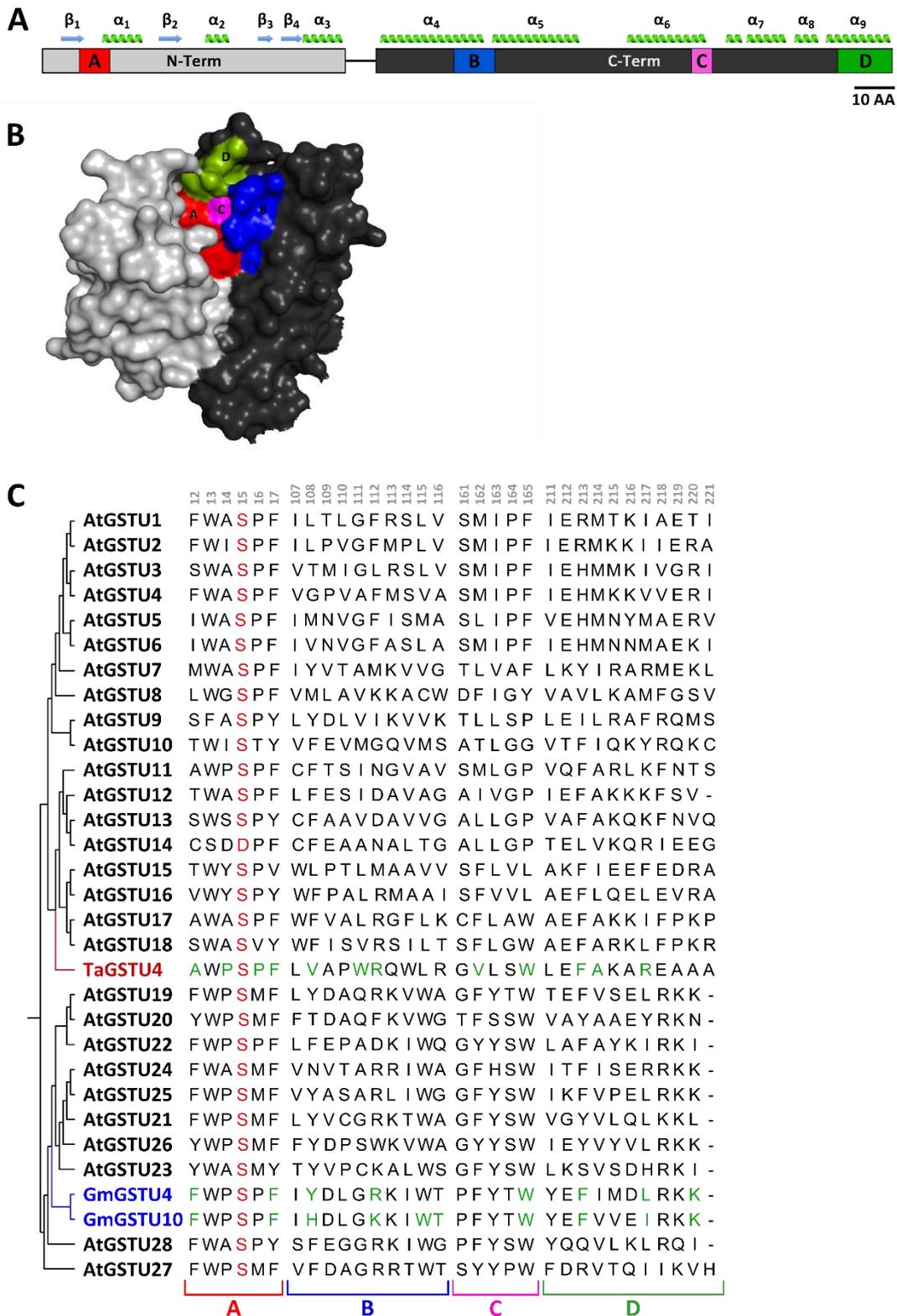
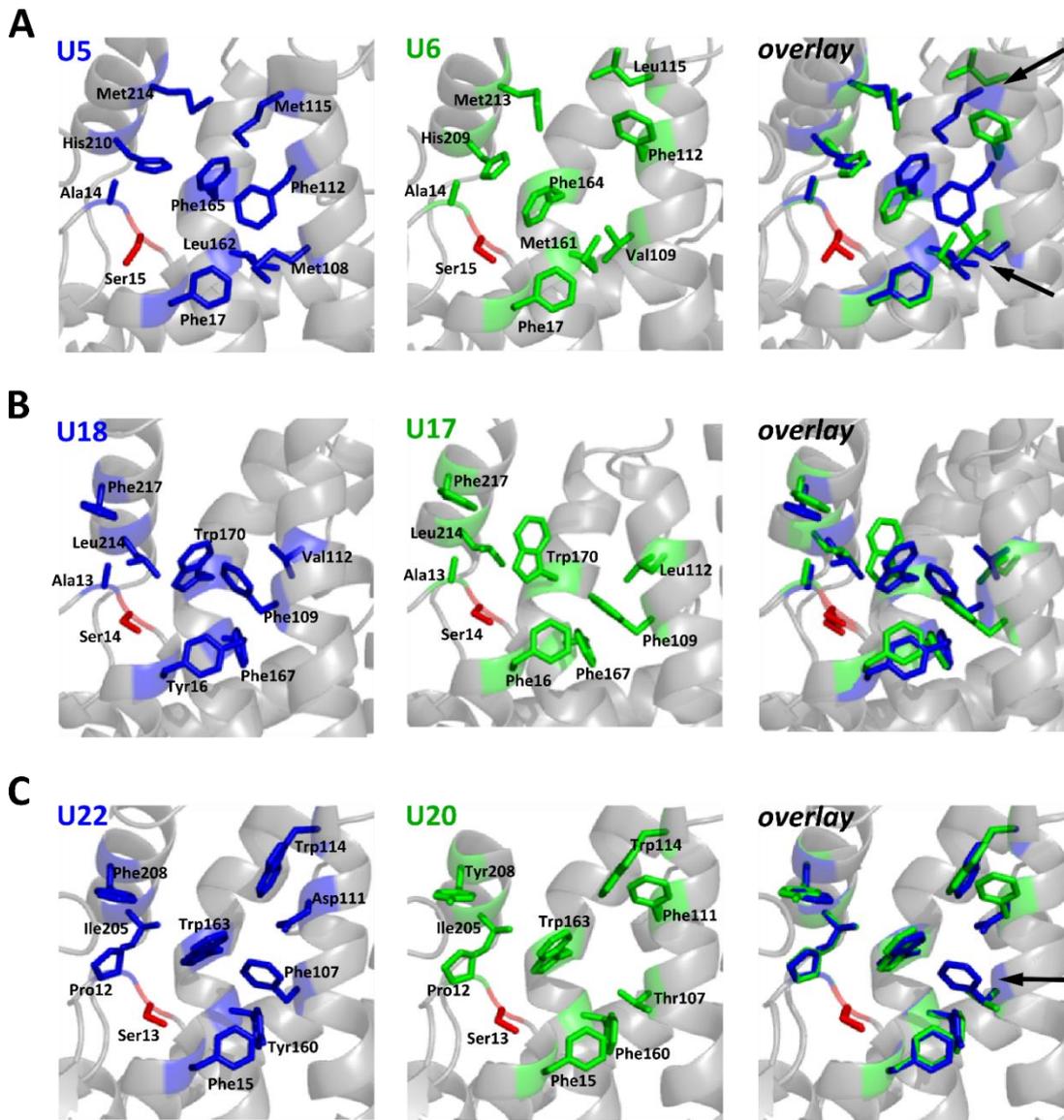


Abbildung 4.4 Substrat-bindende *H-site* in GSTs der Tau-Klasse.

Vier Regionen (A, B, C, D) sind an der Bildung der *H-site* in GSTs beteiligt und im Modell farbig markiert. Drei liegen im C-terminalen Teil des Enzyms (A). Anhand des dreidimensionalen Modells der GSTU4 aus Weizen (1GWC) wird die Lage dieser Regionen im Monomer aufgezeigt (B). Die Primärsequenz dieser Regionen ist in den GSTs hoch variabel (C). Von den kristallisierten GSTs, TaGSTU4, GmGSTU4 und GmGSTU10, sind die Substrat-bindenden Aminosäuren bekannt und hier grün dargestellt. Das katalytisch wichtige Serin ist rot markiert. Die Nummerierung richtet sich nach der Aminosäuresequenz von AtGSTU5.

Die Varianz in der Primärstruktur der GSTs ist – vor allem in den *H-site*-Regionen – sehr hoch, sodass Aktivitätsunterschiede nicht einzelnen Aminosäuren zugeordnet werden können (Abbildung 4.4 C). Jedoch kann die dreidimensionale Struktur dieser Enzyme anhand bereits kristallisierter GSTs modelliert werden (Kelley *et al.*, 2015). Basierend auf diesen Modellen können die Bindetaschen der aktiven Arabidopsis-GSTs, U5, U18 und U22, und ihrer nächsten Verwandten, U6, U17 und U20, verglichen und mögliche Erklärungen für die Aktivitätsvarianz dieser Enzyme postuliert werden (Abbildung 4.5).



**Abbildung 4.5 Vergleich der *H-site* der aktiven GSTs U5, U18 und U22 mit denen ihrer nächst-verwandten GST aus Arabidopsis.**

Verglichen wurden die, mittels Phyre2, modellierten Strukturen von GSTU5 mit GSTU6 (A), GSTU18 mit GSTU17 (B) und GSTU22 mit GSTU20 (C). Aminosäuren, die potentiell an der Bildung der *H-site* beteiligt sein könnten, sind als Stäbchenmodell dargestellt, wobei die der aktiven GSTs in blau und die der weniger aktiven, nächst-verwandten GSTs grün markiert sind. Das Serin, welches für die Stabilisierung der Thiolatanions im aktiven Zentrum verantwortlich ist, ist in rot zu sehen. Deutliche Unterschiede in den Aminosäureresten der beiden verglichenen Enzyme sind in der Überlagerung mit Pfeilen markiert.

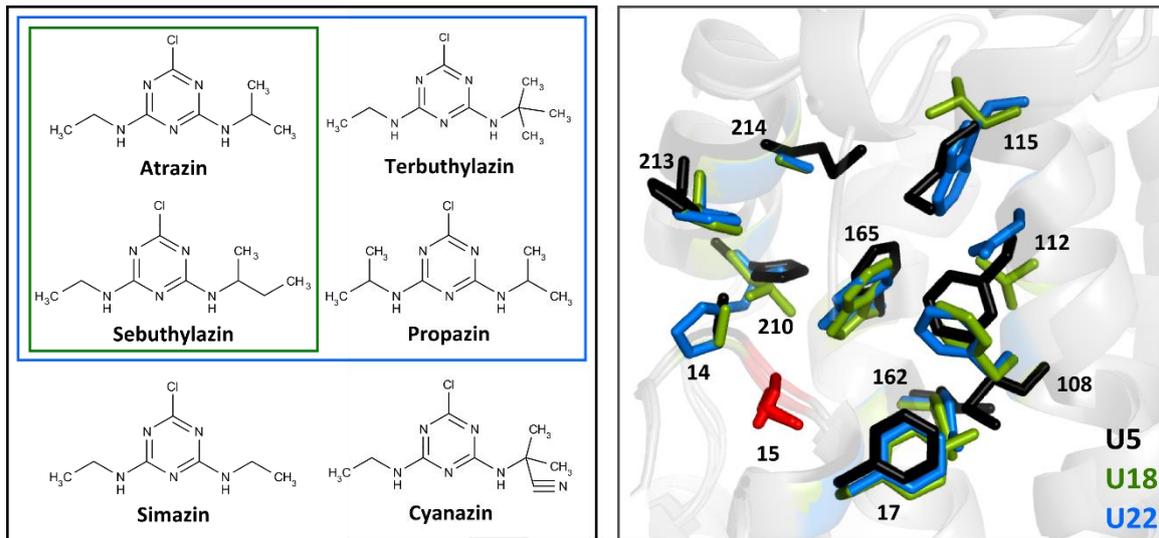
Im direkten Vergleich des aktiven Zentrums von GSTU5 und GSTU6 zeigen sich vor allem Unterschiede am Ende der Helix  $\alpha_4$  (Region B Abbildung 4.4). GSTU5 hat an der Position 108 ein Methionin, während in GSTU6 ein Valin diese Stelle einnimmt. Oberhalb liegt in beiden Enzymen das Phe112, aber die vorhergesagte Position des aromatischen Restes unterscheidet sich. Während der Benzolring von Phe112 in GSTU5 zum aktiven Zentrum ausgerichtet ist und in Nähe zu Phe17 und Phe165 liegt, ist der Rest in GSTU6 weiter vom aktiven Zentrum des Proteins entfernt. Mutationen in der Bindetasche der ZmGSTI haben gezeigt, dass besonders die Modifikation von aromatischen Resten großen Einfluss auf die Bindung von Substraten wie ATZ, AC und CDNB hat, da die Interaktionen zwischen dem Enzym und dem aromatischen Ring des Substrats verändert werden (Labrou *et al.*, 2004; Labrou *et al.*, 2005). Das Methionin an der Position 115 in GSTU5, ein Leucin in GSTU6, könnte zusätzlich Einfluss auf die Bindung von ATZ haben. Auch die nähere Betrachtung der Bindetaschen der beiden anderen aktiven GSTs, U18 und U22, lässt nur Spekulationen über die Grundlage ihrer Aktivität zu. Genau wie bei GSTU5 sind die Unterschiede vor allem in der Helix  $\alpha_4$  zu finden (Abbildung 4.5 B, C). Von allen hier untersuchten Paaren sind die Unterschiede in dieser Region in GSTU22 und GSTU20 am größten. In GSTU20 fehlt die aromatische Gruppe an Position 107, die in den bisher betrachteten GSTs und in der GSTU22 vorhanden ist, und ist durch Threonin ersetzt.

In allen drei Vergleichen wurden die Aminosäuren am Ende von  $\alpha_4$  als Region mit den größten Unterschieden zwischen aktiver und nicht-aktiver GST identifiziert. Die Substitution von Ile118 durch Phe in dieser Region hat ebenfalls in der ZmGSTI den größten Einfluss auf die Substrataffinität gegenüber ATZ (Labrou *et al.*, 2005). Auch in tierischen GSTs verschiedener Klassen haben Aminosäuren in dieser Region einen hohen Einfluss auf die Substratspezifität (Norrgård und Mannervik, 2011; Pettersson *et al.*, 2002). Zudem haben Lan und Kollegen in GSTUs aus Kiefer (*Pinus tabuliformis*) fünf Aminosäuren, die im Laufe der Evolution einer positiven Selektion unterlagen, identifiziert und gezeigt, dass zwei davon am Ende der Helices  $\alpha_4$  und  $\alpha_6$  in der *H-site* liegen und ihre Substitution Einfluss auf die Substratspezifität hat (Lan *et al.*, 2013). Gerichtete Mutationen in dieser Region der Bindetasche haben bei GSTU5 und GSTU6 jedoch keine Unterschiede in ihrer Aktivität gegenüber ATZ ergeben. In der humanen hGSTA2-2 wurde gezeigt, dass erst die Kombination von Mutationen einzelner Aminosäuren aus allen Regionen, die die *H-site* bilden, nötig sind, um die Substratspezifität deutlich zu modifizieren (Pettersson *et al.*, 2002). Auch die Substratspezifität der hGSTA1-1 änderte sich erst deutlich, nachdem mehrere Mutationen in zwei Regionen und der Austausch der kompletten Helix  $\alpha_9$  miteinander kombiniert wurden (Nilsson *et al.*, 2000). Ein anderer Ansatz um Regionen, die einen Einfluss auf die Aktivität der GSTs haben, zu identifizieren, liegt in der gerichteten Evolution von Enzymen durch *DNA shuffling*. Bei

der Analyse der Regionen, die an der Aktivität von humanen GSTAs gegenüber dem Medikament Azathioprin beteiligt sind, ergab das *DNA shuffling* die kombinierte Beteiligung der Regionen A und D der *H-site* (entsprechend der Abbildung 4.4). Region B ist zwar an der Bildung der Bindetasche beteiligt, dies reicht jedoch nicht aus, um eine spezifische Azathioprin-Aktivität zu vermitteln (Kurtovic, Modén *et al.*, 2008). Diese Studie zeigte zudem, dass Mutationen außerhalb der *H-site* zu einer veränderten Aktivität beitragen können, jedoch nicht so einen großen Einfluss haben, wie Änderungen innerhalb der *H-site*. Eine vergleichbare Situation ist auch bei der Aktivität der GSTU5 gegenüber ATZ vorstellbar, da der Austausch weniger Aminosäuren einer Region keine Änderungen bewirkte. Daher ist davon auszugehen, dass weitere Aminosäuren – evtl. auch außerhalb der Bindetasche – einen Einfluss auf die Bindung und Konjugation von Chlorotriazinen haben.

Aufgrund ihrer entfernten Verwandtschaft und dem Fehlen einer Kristallstruktur ist es kaum möglich, die Unterschiede in der Aktivität der drei GSTs U5, U18 und U22 zu erklären. Auffällig ist jedoch, dass in der aktiven GSTU5 sich mit Leu162 eine kleinere Aminosäure am Ende der Bindetasche befindet, während in GSTU18 und GSTU22, deren Aktivität gegenüber Chlorotriazinen deutlich geringer ausfällt, diese Position von Phenylalanin bzw. Tyrosin eingenommen wird. Für die Alkyl-Gruppe der Chlorotriazine könnte sich in der daraus resultierenden, größeren Bindetasche die Möglichkeit einer flexibleren Positionierung bieten, wodurch der nukleophile Angriff des Substrates erleichtert werden könnte. Auch die Positionen 108 und 165 werden in der GSTU5 von kleineren Aminosäuren eingenommen als in GSTU18 und GSTU22 (Abbildung 4.6). Die strukturellen Vorhersagen deuten darauf hin, dass die Bindetasche der GSTU5 größer ist und eine optimale Positionierung von verschiedenen Substraten begünstigt werden kann.

Aufgrund der hohen Flexibilität in den Substrat-bindenden Regionen der GSTs sind genaue Vorhersagen ohne die Kristallisation der Enzyme zusammen mit dem entsprechenden Substrat kaum möglich (Thom *et al.*, 2002). In der GmGSTU4 kommt es durch die Substratbindung zu deutlichen Veränderungen in der Struktur und Interaktion der Aminosäuren untereinander (Axarli *et al.*, 2009a; Skopelitou *et al.*, 2015). Neben den Unwägbarkeiten, die solche detaillierten Betrachtungen einer putativen Struktur beinhalten, sollte zudem in Betracht gezogen werden, dass auch Regionen, die nicht direkt an der Substratbindung beteiligt sind, Einfluss auf die katalytische Aktivität dieser Enzyme haben können.



**Abbildung 4.6 Vergleich der Chlorotriazin-aktiven GSTs.**

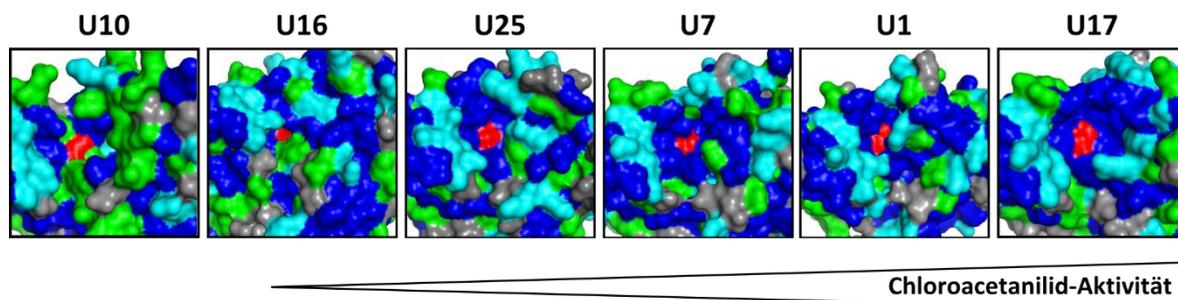
Die GSTs U5, U18 und U22 wiesen eine unterschiedliche Aktivität gegenüber den verschiedenen Chlorotriazinen auf, wobei GSTU5 (schwarz) gegenüber allen getesteten Substraten die höchste Aktivität zeigte. GSTU18 (grün) hatte im Gegensatz dazu eine enge Substratspezifität und konjugierte vermehrt Atrazin und Sebuthylazin. Propazin und Terbutylazin waren die einzigen Substrate die von der GSTU22 (blau) umgesetzt wurden als von der GSTU18. Die an der *H-site* beteiligten Aminosäuren werden in den Phyre2-modellierten Strukturen dieser GSTs verglichen (rechts). Das Serin, welches für die Stabilisierung des Thiolatians von GSH zuständig ist, ist rot markiert. Die Nummerierung entspricht der Primärstruktur der GSTU5.

#### 4.2.2. Substratspezifität von Arabidopsis-GSTs gegenüber Chloroacetaniliden

Chloroacetanilide wurden erstmals 1979 als GST-Substrate beschrieben und ihre Konjugation an GSH als Resistenzmechanismus einige Jahre später untersucht (Leavitt und Penner, 1979; O'connell *et al.*, 1988). Im Gegensatz zur Analyse mit Chlorotriazine ergab die Untersuchung der Aktivität der Arabidopsis-GSTs gegenüber Chloroacetaniliden im Hefesystem ein deutlich breiteres Aktivitätsspektrum, welches abhängig vom eingesetzten Substrat war. So war die Aktivität der GSTs mit Propachlor besonders hoch und die Spezifität innerhalb der Enzymfamilie gering. Die Aktivität gegenüber den übrigen getesteten Chloroacetaniliden war vergleichbar und die Diskriminierung nahm mit zunehmender Größe des Substrates zu. So konnte das GSH-Konjugat von Pretilachlor in Hefe lediglich durch die Expression von sechs GSTs nachgewiesen werden. Während kleinere Substrate, wie Propachlor und Alachlor, sowohl von Mitgliedern der Phi- als auch der Tau-Klasse umgesetzt wurden, wurden größere Substrate nur von einigen GSTUs genutzt. Die unterschiedliche Reaktivität der Chloroacetanilide wurde bereits zuvor in enzymatischen und nicht-enzymatischen Untersuchungen nachgewiesen und ergab eine erhöhte Reaktivität der kleineren Derivate mit GSH im Vergleich zu größeren Chloroacetaniliden (Clarke, 1998; Lee *et al.*, 2011; Scarponi *et al.*, 1991). Anhand der Kristallstruktur der GSTF2 aus Arabidopsis wurde gezeigt, dass der Alkylrest, der an die

Aminogruppe gebunden ist, entscheidend für die Bindung des Moleküls an das Enzym und somit ausschlaggebend für die Aktivität einzelner GSTs ist (Prade *et al.*, 1998).

Die GSTU17 wies die breiteste Substratspezifität und höchste Aktivität gegenüber Chloroacetaniliden auf. GSTU1, GSTU2 und GSTU5 zeigten ein ähnliches Substratspektrum, aber eine geringere Aktivität im Vergleich zu der GSTU17. Die Aktivität der GSTU7 war gegenüber den kleineren Derivaten geringer als bei den zuvor genannten Enzymen, verglichen mit den größeren Herbiziden wie Butachlor und Pretilachlor. Weitere GSTs, wie F8, F11, U24, U25 oder U16, wiesen lediglich gegenüber den kleineren Chloroacetaniliden Propachlor, Alachlor und Acetochlor geringe Aktivität auf. Auffällig waren zudem GSTU9-GSTU15, bei denen keine Umsetzung dieser Substratklasse beobachtet wurde. Ein Grund für die Substratabhängigkeit scheinen die Eigenschaften der Aminosäuren zu sein, die potentiell die Bindetasche dieser GSTs bilden (Abbildung 4.7). Je höher die Aktivität und die Anzahl der umgesetzten Chloroacetanilide waren, desto mehr hydrophobe Aminosäuren befanden sich im aktiven Zentrum der entsprechenden GST. Während um das aktive Serin in der GSTU10 viele polare Aminosäuren zu finden sind, nimmt der Anteil von Aminosäuren mit hydrophoben Eigenschaften mit zunehmender Chloroacetanilid-Aktivität zu, so ist das aktive Serin in der GSTU17 vollständig von hydrophoben Aminosäuren umgeben. Die höhere Aktivität der GSTU7 gegenüber den größeren Chloroacetanilid-Derivaten im Vergleich zu den GSTs U1 und U5 könnte mit der hydrophoberen Umgebung im aktiven Zentrum dieses Enzyms zusammenhängen.



**Abbildung 4.7 Oberfläche der Bindetasche von ausgewählten GSTUs.**

Die dreidimensionale Struktur von ausgewählten GSTUs wurde mittels Phyre2 modelliert und ihr aktives Zentrum dargestellt. Die GSTs sind dabei entsprechend ihrer Aktivität und Substratspezifität gegenüber Chloroacetaniliden dargestellt. Die Aminosäuren, die die Bindetasche bilden, wurden entsprechend ihrer chemischen Eigenschaften eingefärbt: hydrophobe Aminosäuren dunkelblau, basische Aminosäuren hellblau, polare Aminosäuren grün, saure Aminosäuren grau. Das Serin im katalytischen Zentrum ist rot markiert.

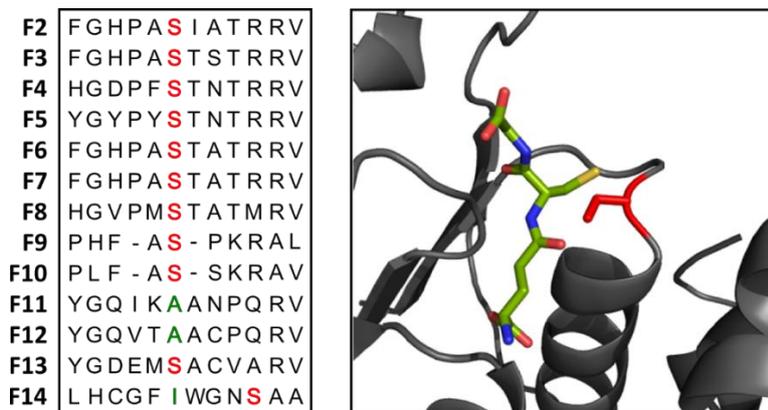
Entgegengesetzt zu dieser Betrachtung stehen die Ergebnisse einer Studie von Dixon und Edwards, bei der Fettsäuren als GST-Liganden identifiziert wurden (Dixon und Edwards, 2009). Darin zeigten GSTU9 und GSTU10 eine deutliche Präferenz zur Bindung von besonders langkettigen Liganden, während andere GSTs, wie GSTU18 oder GSTU25, eher kurzkettige Fettsäuren bevorzugten. Jedoch

zeigte diese Studie auch, dass GSTU9 und GSTU10 im Gegensatz zu den anderen untersuchten GSTs aus Pflanzenextrakten vor allem nicht-glutathionylierte Liganden binden, was auf eine geringe Affinität dieser Enzyme für GSH hindeutet. Zusammen mit der geringen Aktivität gegenüber anderen Substraten, wie CDNB und Chlorthalonil, lässt dies auf eine geringe Transferase-Aktivität schließen, wie sie auch gegenüber Chloroacetaniliden festgestellt wurde (Dixon *et al.*, 2009; Krajewski, 2012) (Abbildung 4.9).

Neben der Größe der amidgebundenen Alkylgruppe wiesen die GSTs U1, U2 und U5, im Gegensatz zur GSTU17, Aktivitätsunterschiede aufgrund der Gruppen, welche am Benzolring der Chloroacetanilide gebunden waren, auf. Substrate mit einer Methylgruppe an diesen Stellen führten bei diesen drei Enzymen zu einer mit der GSTU17 vergleichbaren Aktivität. Während die Aktivität der GSTU17 gegenüber Derivaten, die Ethylgruppen trugen, ähnlich blieb, zeigten GSTU1, GSTU2 und GSTU5 eine reduzierte Konjugation. Obwohl postuliert ist, dass die Interaktionen mit der Phenylgruppe bei der Bindung von Chloroacetaniliden nur eine untergeordnete Rolle spielen, scheint die Größe der Substituenten an diesem Teil des Moleküls durchaus zur Diskriminierung beizutragen (Prade *et al.*, 1998).

Neben der globalen Betrachtung sind einzelne Aminosäuren bekannt, die einen deutlichen Einfluss auf die Aktivität von GSTs gegenüber Alachlor und Metolachlor haben. So konnten Labrou und Kollegen durch die Mutation eines Isoleucins zu Phenylalanin am Ende der Helix  $\alpha_4$  in der ZmGSTI die Aktivität dieses Enzyms gegenüber Alachlor um das vierfache steigern (Labrou *et al.*, 2004). Govindarjan und Kollegen haben Änderungen in der *H-site* untersucht, indem sie durch gezielte Mutationen natürlich vorkommende Aminosäuren verschiedener GSTs an den entsprechenden Positionen in TaGSTU4 eingeführt haben (Govindarajan *et al.*, 2014). Die Analyse dieser mutierten Enzyme resultierte in unterschiedlich stark variierenden Aktivitäten gegenüber Metolachlor und Alachlor. Einige Mutationen führten zu einer erhöhten oder erniedrigten Aktivität mit beiden Substraten, während einige Substitutionen einen entgegengesetzten Einfluss auf die Aktivität gegenüber Alachlor und Metolachlor aufwiesen. Den größten positiven Einfluss auf die Aktivität gegenüber Metolachlor hatten dabei die Mutationen von Ala26Asn und Ile56Val in TaGSTU4. Die nächst-verwandte GST zu TaGSTU4 in Arabidopsis ist GSTU17 und neben vielen Aminosäuren, die Einfluss auf die Umsetzung von Chloroacetaniliden haben und in beiden Enzymen identisch sind, besitzt GSTU17 an den, der Position 26 und Position 56 entsprechenden, Stellen ein Asparagin und ein Valin. Die Kombination mit weiteren Aminosäuren, die an der Bindung von Chloroacetaniliden beteiligt sind, und der mehrheitlich hydrophoben Bindetasche macht die GSTU17 zu einem aktiven Katalysator der Chloroacetanilid-Glutathionylierung.

Eine Besonderheit, die bei der Analyse der GSTs mit Chloroacetaniliden als Substrate aufgefallen ist, ist die Aktivität der GSTs F11 und F12, wobei GSTF12 erstmals auf ihre Aktivität hin untersucht wurde. Zusammen mit GSTF14 und GSTU14 besitzen diese GSTs kein Serin im aktiven Zentrum, welches für die Stabilisierung des Thiolatanions benötigt wird, sodass keine Transferase-Aktivität bei diesen GSTs erwartet wird (Dixon und Edwards, 2010a) (Abbildung 4.8). Jedoch wies GSTF11 die höchste Aktivität aller GSTFs mit Propachlor und Dimethachlor auf. GSTF12 katalysierte zusätzlich die Konjugation von Alachlor und Acetochlor und zeigte das breiteste Substratspektrum aller GSTFs gegenüber Chloroacetaniliden. Bereits gegenüber Anilazin konnte die Aktivität von GSTF11 trotz fehlendem Serin nachgewiesen werden (Krajewski *et al.*, 2013).



**Abbildung 4.8 Alignment des Bereichs um das katalytisch aktive Serin der GSTFs aus *Arabidopsis*.**

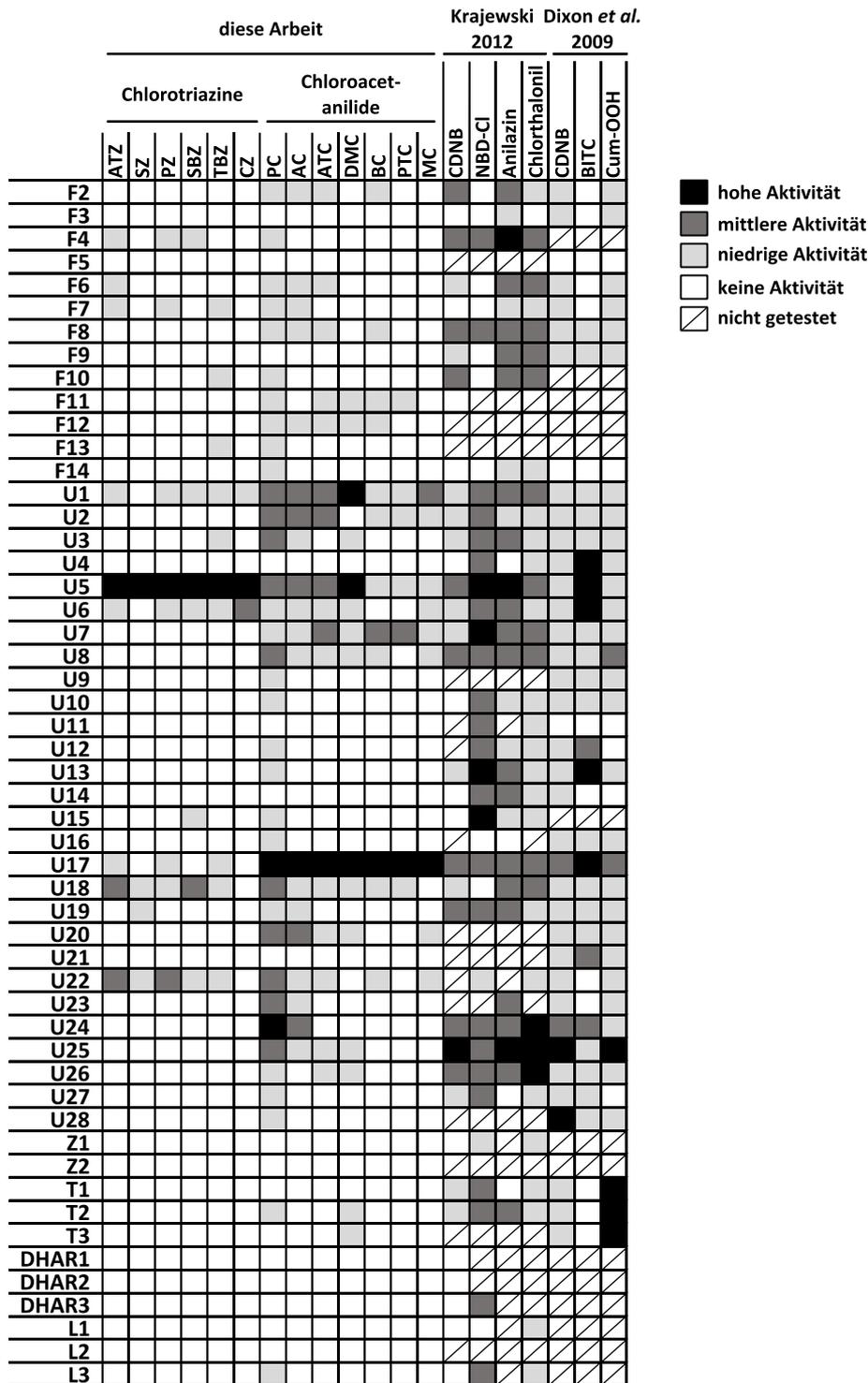
Verglichen wird der N-terminale Teil der GSTFs aus *A. thaliana*, der das katalytisch aktive Serin enthält, welches rot markiert ist (links). GSTF11, GSTF12 und GSTF14 fehlt das Serin, die entsprechenden Positionen sind in den Sequenzen grün dargestellt. GSTF14 hat in der Nähe des aktiven Zentrums, an der Position 17 ein Serin, welches möglicherweise das Fehlen des anderen kompensieren kann. Das Serin ist entscheidend, um das Thiolatanion von GSH (grün) zu stabilisieren und somit den nukleophilen Angriff zu ermöglichen (rechts, Struktur GSTF2 (1BX9)).

Viele Studien zeigen die Notwendigkeit eines Serins oder - im Fall von tierischen GSTs - Tyrosins im aktiven Zentrum für eine GSH-Transferase-Aktivität. Mutationen an dieser Stelle führen zu einer dramatischen Reduktion der Aktivität (Axarli *et al.*, 2009b; Board *et al.*, 1995; Labrou *et al.*, 2001). In GSTs der Omega-Klasse, welche ein Cystein im aktiven Zentrum haben und vor allem Thioltransferase-Aktivität aufweisen, führt die Mutation dieses Cysteins (Cys32Ala) zum Verlust dieser, erhöht jedoch die Konjugation von GSH an CDNB (Whitbread *et al.*, 2005). An der entsprechenden Serin-Position befindet sich in GSTF11 und GSTF12 ein Alanin. Je mehr GST-Strukturen untersucht wurden, desto mehr Beispiele wurden beschrieben, bei denen die katalytische Aktivität des Enzyms trotz fehlendem Serin, Tyrosin oder Cystein im aktiven Zentrum, beobachtet werden konnte (Atkinson und Babbitt, 2009). Eine Begründung dafür ist, dass neben den stabilisierenden Eigenschaften des Serins bzw. Tyrosins die weiteren GSH-bindenden Aminosäuren essentielle Funktionen im katalytischen Mechanismus übernehmen und als Teil eines

*electron-sharing networks* Einfluss auf die Ionisierung von GSH haben. Mutationen dieser Aminosäuren haben z.T. einen ebenso großen negativen Effekt auf die katalytische Aktivität wie die Mutation des katalytisch aktiven Tyrosins (Björnstedt *et al.*, 1995; Dourado *et al.*, 2008; Winayanuwattikun und Ketterman, 2005).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstreichen, dass durch die Analyse der Aktivität gegenüber einigen, wenigen Modellsubstraten wie CDNB oder BITC GSTs nur unzureichend charakterisiert werden können. Bruns und Kollegen haben anhand der Analyse der humanen GSTA4-4 gezeigt, dass kleine Substrate wie CDNB aufgrund einer unspezifischen Bindung und Konjugation, keinen Einblick in Substratspezifität und Einfluss einzelner Aminosäuren auf die Bindung liefern (Bruns *et al.*, 1999). GSTs, wie GSTF8 oder GSTU25, die eine hohe Aktivität gegenüber CDNB, NBD-Cl und Anilazin zeigten, sind an der Konjugation von Chlorotriazinen und Chloroacetaniliden nicht bzw. nur in geringem Maße beteiligt (Dixon *et al.*, 2009; Krajewski *et al.*, 2013) (Abbildung 4.9). Zudem wird der Hypothese, dass eine GST mit breiter Substratspezifität nur eine geringe spezifische Aktivität aufweist, durch die Analysen der GSTU5, die eine hohe Aktivität gegenüber allen bisher getesteten Substraten zeigt, widersprochen (Norrgård und Mannervik, 2011). Die hohe Spezifität der Chlorotriazin-Umsetzung, welche sich auf eine geringe Zahl von GSTs beschränkte, lässt den Schluss zu, dass eine breite, vergleichende Analyse möglichst aller GSTs eines Organismus notwendig ist, um spezifische Aktivitäten festzustellen.

Diese Analyse zeigte grundlegende Aspekte auf: Zum einen sollte die Analyse nicht auf einzelne GSTs beschränkt werden. Die Aktivität gegenüber Triazinen zeigte sehr deutlich ein spezifisches, enges Substratspektrum einiger, weniger GSTs. Zuvor als besonders aktiv beschriebene GSTs zeigten keinerlei Aktivität, wie GSTF8 oder GSTU25 (Krajewski *et al.*, 2013). Daher führt die Fokussierung der Analysen auf einige, wenige GSTs – solche, die besonders aktiv gegenüber CDNB sind, stark exprimiert oder durch einen bestimmten Stimulus induziert werden – nicht zu aussagekräftigen Ergebnissen bezüglich der GST-Aktivität gegenüber einzelnen Substraten. Zum anderen schwankt der Substratumsatz einzelner GSTs abhängig vom angebotenen Substrat stark. Dies ist jedoch nicht nur, wie bereits beschrieben, bei stark unterschiedlichen Substraten der Fall, sondern auch bei nah verwandten Strukturen, wie den Chloroacetaniliden. Die Bestimmung der Aktivität mit CDNB kann daher nur ein erster Schritt der GST-Analyse sein. Erst durch die umfangreiche Untersuchung möglichst vieler GSTs mit verschiedenen Substraten werden die großen Unterschiede bei den Substratspezifitäten aufgedeckt. Am Beispiel der Chlorotriazine, bei denen lediglich drei GSTs eine deutliche Aktivität zeigten, lässt sich die Relevanz solcher Untersuchungen verdeutlichen.



**Abbildung 4.9 Übersicht der Aktivität der Arabidopsis-GSTs gegenüber verschiedenen Substraten.**  
 Vergleich der Aktivität aller GSTs aus Arabidopsis gegenüber verschiedenen Substraten. Die Ergebnisse dieser Arbeit und der von Krajewski basieren auf den Ergebnissen aus dem Hefesystem, während Dixon und Kollegen die Analysen mit aufgereinigtem Protein *in vitro* durchführten (Dixon *et al.*, 2009, Krajewski *et al.*, 2012). Die Aktivität ist als Relation zu der höchsten gemessenen Aktivität mit jedem Substrat dargestellt. Eine hohe Aktivität entspricht 100 % - 75 % des höchsten Wertes (schwarz), mittlere Aktivität stellt 75 % - 25 % des höchsten Wertes dar (dunkelgrau), als niedrig wird eine Aktivität unter 25 % der Höchstaktivität mit dem jeweiligen Substrat bezeichnet (hellgrau). Wurde kein Umsatz festgestellt, ist dies als weißes Kästchen dargestellt. Nicht gemessene Proben sind mit einem Strich gekennzeichnet.

#### 4.2.3. GST-vermittelte Herbizidresistenz

GSTs sind ein essentieller Teil der Herbizidresistenz in Pflanzen. Die natürliche Resistenz gegenüber einer Reihe von Pestiziden in Mais und Sojabohne wird auf die Aktivität dieser Enzyme zurückgeführt (Andrews *et al.*, 1997; Hatton *et al.*, 1996). Zudem kann durch den Einsatz von Safenern die Expression von GSTs in Pflanzen modifiziert werden, um Herbizidresistenz zu induzieren (Cummins *et al.*, 1997; Kraehmer, Laber *et al.*, 2014). Bisher können Safener nur in Monokotyledonen eingesetzt werden, da sie in dikotylen Pflanzen trotz der erfolgreichen Induktion von Detoxifizierungsenzymen nicht zur Herbizidresistenz führen (DeRidder *et al.*, 2002; DeRidder und Goldsbrough, 2006). Obwohl der Zusammenhang zwischen GST-Aktivität und Resistenz gut aufgeklärt ist, gibt es nur wenige Studien, die durch die modifizierte Expression von GSTs Herbizidresistenzen *in planta* genau analysierten. Die Überexpression von GSTs aus Mais oder Sojabohne resultierte in der Resistenz von, zuvor suszeptiblen, Tabak gegenüber Chloroacetaniliden (Benekos *et al.*, 2010; Karavangeli *et al.*, 2005). Ein anderes Beispiel ist die Überexpression der ZmGSTVI aus Mais in Weizen, die zur Resistenz gegenüber Herbiziden aus drei verschiedenen Klassen führte (Milligan *et al.*, 2001).

In dieser Studie wurde zum ersten Mal eine endogene GST aus einer suszeptiblen Spezies überexprimiert und führte zur spezifischen Herbizidresistenz. Durch die Überexpression der GSTU5 in *Arabidopsis* konnte im Rahmen dieser Arbeit die Resistenz gegenüber Chlorotriazinen erfolgreich vermittelt werden. Dass es sich hierbei um einen sekundären, positiven Effekt, wie er häufig durch die Überexpression von GSTs beobachtet wird (Cummins *et al.*, 2013; Sharma *et al.*, 2014), handelte, konnte durch die Analyse der transgenen Pflanzen mit anderen PSII-Inhibitoren ausgeschlossen werden. Die endogene Expression der aktiven GSTU5 reicht nicht aus, um eine natürliche Resistenz gegenüber Atrazin in Wildtyp-*Arabidopsis* zu vermitteln. Expressionstudien zeigen, dass GSTU5 nur in geringem Maße durch Safener, aber stark durch verschiedene Stressfaktoren, wie Licht, Salz, Hitze und Trockenheit, induziert wird. Die Analyse von spezifischen Induktoren der GSTU5 könnte potentielle Safener für die Resistenz gegenüber Chlorotriazinen aufdecken und diese Technologie erstmals auf Dikotyle übertragen (DeRidder und Goldsbrough, 2006; Kraehmer, Laber *et al.*, 2014).

Während die Ergebnisse der GST-überexprimierenden *Arabidopsis*-Linien gegenüber Chlorotriazinen sehr deutlich ausgefallen sind, ist die vermittelte Resistenz gegenüber Chloroacetaniliden durch die im Hefesystem aktiven GSTs weniger klar. Dies kann z.T. mit der Anzahl der aktiven GSTs gegenüber Chloroacetaniliden und der damit verbundenen Grundresistenz von *Arabidopsis* gegenüber Chloroacetaniliden begründet sein. In Tabak führt die Überexpression der GmGSTU4 aus *G. max* zu einem verbesserten Wachstum auf Alachlor-haltigem Medium im

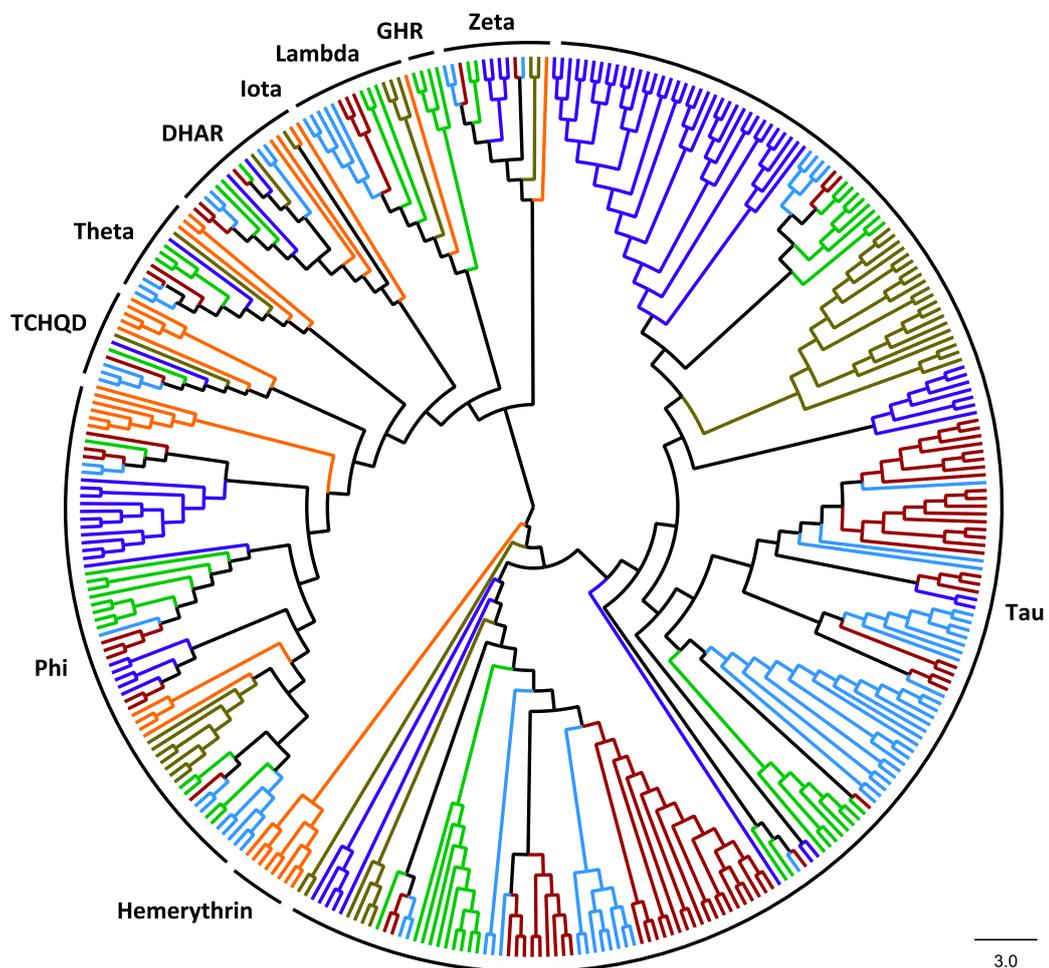
Vergleich zum WT, aber nicht auf Metolachlor-haltigem Medium (Benekos *et al.*, 2010). Tabak ist gegenüber Metolachlor weniger suszeptibel als gegenüber Alachlor. Die endogenen GSTs aus Tabak scheinen ausreichend für die Detoxifizierung von Metolachlor zu sein, sodass die Überexpression einer weiteren GST wenig Einfluss auf die Resistenz hat. Auch aus anderen Studien ist bekannt, dass die GST-Aktivität gegenüber Chloroacetaniliden nicht immer direkt mit der Resistenz korreliert (Andrews *et al.*, 1997; Scarponi *et al.*, 1991). Ähnlich könnte es sich in Arabidopsis verhalten. Propachlor, das Chloroacetanilid, mit welchem die höchste Aktivität und die größte Anzahl von aktiven GSTs im Hefesystem identifiziert wurde, führte zu der geringsten Wachstumsinhibierung in Arabidopsis. Mit zunehmender Größe der Chloroacetanilide stieg die inhibierende Wirkung der Herbizide, entgegengesetzt zu der Anzahl der aktiven GSTs. Gegenüber den meisten Chloroacetaniliden hatte die Überexpression einer weiteren GST keinen positiven Einfluss auf das Wachstum verglichen mit dem WT. Lediglich die verstärkte Expression der GSTU17, welche in Hefe die höchste Aktivität gegenüber allen getesteten Chloroacetaniliden zeigte, wies einen leicht positiven Einfluss auf das Wachstum auf Medium, welches Metolachlor, Dimethachlor oder Butachlor enthielt, auf.

Die Ergebnisse der Untersuchung aller Arabidopsis-GSTs im Hefesystem und der positive Nachweis ihrer Aktivität *in planta* führen zu dem Schluss, dass Arabidopsis, eine Pflanze die keine Resistenz gegenüber Chlorotriazinen hat, das Potential zur Ausbildung dieser Resistenz im Genom kodiert hat. Es bedarf daher, unter dem entsprechenden Selektionsdruck, nicht mehrerer Mutationen, um die Enzymaktivität gegenüber dem Herbizid zu optimieren, sondern lediglich der erhöhten Expression einer aktiven GST. Ein hoher Selektionsdruck, durch den einseitigen Einsatz von Herbiziden, kann die Entwicklung multiresistenter Arten begünstigen (Powles und Yu, 2010). Ein besseres Verständnis der GST-Substratspezifität kann dazu beitragen, dass Herbizide entwickelt werden, die geringe Aussichten haben als GST-Substrat zu fungieren, oder spezifische Inhibitoren von GSTs generiert werden, um die GST-vermittelte Detoxifizierung zu minimieren.

#### 4.2.4. Endogene Funktionen der GSTs in Arabidopsis

Der letzte Teil dieser Arbeit soll die möglichen endogenen Aufgaben dieser vielseitigen Enzymfamilie beleuchten. Häufig hat die Überexpression von GSTs in Pflanzen einen positiven Einfluss auf die Stresstoleranz. So resultiert die Überexpression von GSTs aus *O. sativa*, *Citrus sinensis* oder *Limonium bicolor* in Tabak in einer erhöhten Toleranz gegenüber Salzstress (Diao *et al.*, 2010; Kissoudis *et al.*, 2015; Lo Cicero *et al.*, 2015). In Arabidopsis wird durch die GST-Überexpression die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezien (*reactive oxygen species*, ROS) verringert und oxidativer Stress minimiert (Katsuhara *et al.*, 2005; Sharma *et al.*, 2014).

Expressionsanalysen der GSTs, die in *Arabidopsis* stark durch Stressfaktoren, wie Hitze, Verwundung, Trockenheit und Pathogene, induziert werden, unterstützt die Vermutung, dass GSTs eine Rolle bei der Stressantwort der Pflanze spielen. Um welche spezifischen, molekularen Mechanismen es sich dabei handelt, ist bisher unklar. Die Klasse der Tau-GSTs, der größten und jüngsten Gruppe der GST-Superfamilie, ist dabei besonders interessant, da die Mitglieder dieser Klasse ein breites Substratspektrum und häufig eine besonders hohe Aktivität aufweisen (Dixon *et al.*, 2009; Krajewski *et al.*, 2013). Drei mögliche, endogene Funktionen der GSTUs sollen im Folgenden näher betrachtet werden: i) ihre Verbindung zu Flavonoiden und anderen Sekundärmetaboliten, ii) ihre Funktion als lipidbindende Proteine bei der Lipidperoxidation und iii) ihre Rolle bei der Antwort auf Pathogenstress.

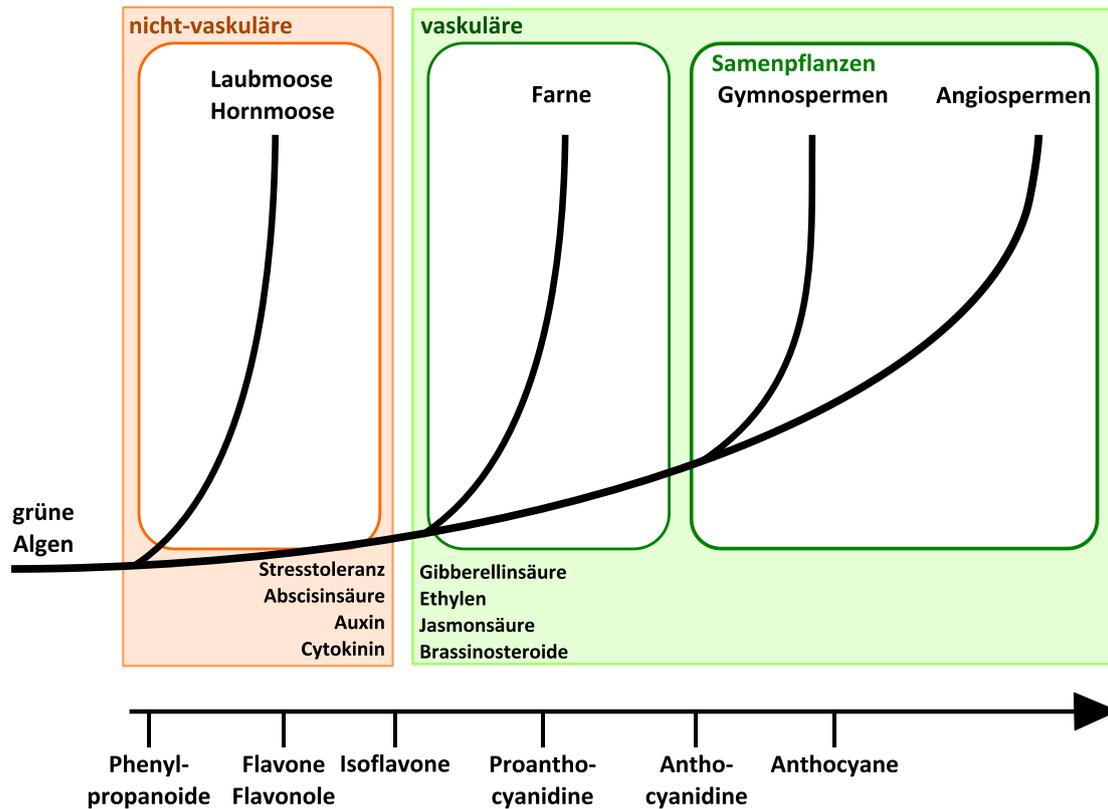


**Abbildung 4.10 Phylogenetischer Stammbaum von GSTs sechs verschiedener Pflanzenspezies.**

Anhand der GSTs aus verschiedenen Pflanzen, zu denen annotierten Daten vorliegen, wurde ein Stammbaum erstellt und die einzelnen Klassen dieser Enzymfamilie markiert. Die GSTs einer Spezies sind einheitlich gefärbt. Verwendet wurden *Arabidopsis thaliana* (grün) (Dixon *et al.*, 2009), *Glycine max* (hellblau) (Liu *et al.*, 2015), *Oryza sativa* (dunkelblau) (Jain *et al.*, 2010), *Populus trichocarpa* (rot) (Lan *et al.*, 2009), *Physcomitrella patens* (orange) (Liu *et al.*, 2013) und *Pinus tabulaeformis* (braun) (Lan *et al.*, 2013).

Die Tau-Klasse hat sich in den vaskulären Pflanzen entwickelt; das Moos *P. patens* besitzt keine GSTUs (Liu *et al.*, 2013) (Abbildung 4.10). Die größten Unterschiede zwischen vaskulären und nicht-vaskulären Pflanzen bestehen vor allem in der Entwicklung von spezialisierten Sekundärmetaboliten (Chae *et al.*, 2014). Die Anzahl der Gene, die dem Sekundärmetabolismus zugeordnet werden, nimmt mit der Evolution der vaskulären Landpflanzen stark zu, während die genomische Grundlage für den Primärmetabolismus ähnlich bleibt. Vergleichende genomische Studien zeigen dabei, dass Bryophyten, zu denen *P. patens* gehört, viele Gene für die Synthese von komplexen Sekundärmetaboliten fehlen (Tohge *et al.*, 2011; Tohge *et al.*, 2014). Eine Vielzahl verschiedener Sekundärmetabolit-Klassen sind bekannt: Flavonoide und andere Polyphenole, indolische Verbindungen, Terpene und Fettsäurenderivate. Flavonoide gehören dabei zu den am besten untersuchten Substanzen im Hinblick auf ihre evolutionäre Entwicklung innerhalb der Landpflanzen (Naoumkina *et al.*, 2010; Rausher, 2006) (Abbildung 4.11). Während einfache Flavonoide als UV-B-Filter und Fänger von ROS dienen, nehmen mit der Komplexität dieser Substanzenklasse auch die ihnen zugeschriebenen Aufgaben zu, welche von Abwehr von Herbivoren und Mikroorganismen über Blütenfärbung bis hin zu Signalweiterleitung reichen (Pourcel *et al.*, 2007; Rozema *et al.*, 1997). Auch viele Sekundärmetabolite anderer Klassen werden mit der Detoxifizierung von ROS in Verbindung gebracht (Nakabayashi und Saito, 2015).

Die Abwehr von ROS funktioniert in Pflanzen über mehrere parallele Mechanismen. Die enzymatische Abwehr setzt sich aus Superoxiddismutase, Catalase und den Enzymen, die die Hauptantioxidantien in der Zelle wieder regenerieren (Ascorbatperoxidasen, Dehydroascorbatreduktasen, Monodehydroascorbatreduktasen und Glutathionreduktasen) zusammen. Neben den wichtigsten Antioxidantien GSH und Ascorbinsäure besteht die nicht-enzymatische ROS-Abwehr zusätzlich aus  $\alpha$ -Tocopherol, Carotenoiden, Flavonoiden und Phenylpropanoiden (Das und Roychoudhury, 2014; Larson, 1988). Durch das Abfangen von ROS werden diese Substanzen oxidiert und müssen wieder reduziert werden (Sakihama *et al.*, 2002). Die Reaktion von verschiedenen oxidierten Flavonoiden mit GSH wurde *in vitro* nachgewiesen und könnte einen möglichen Weg der Antioxidantien-Reduktion darstellen (Awad *et al.*, 2001). Auch andere phenolische Substanzen aus Pflanzen, wie Chlorogensäure, Kaffeesäure, Ferulasäure und Curcumin, bilden GSH-Konjugate (Awasthi *et al.*, 2000; Moridani *et al.*, 2001). Eine Beteiligung von GSTs an diesen Reaktionen wurde bisher nicht belegt. Jedoch gibt es, besonders im Falle von humanen GSTs, viele Belege dafür, dass Flavonoide an GSTs binden (Hayeshi *et al.*, 2007; van Zanden *et al.*, 2003; Zhang und Das, 1994). Im Falle von pflanzlichen GSTs wurden bisher nur Mitglieder der Phi- und Lambda-Klasse auf die Bindung von Flavonoiden hin untersucht (Cummins *et al.*, 2003; Dixon und Edwards, 2010b; Lallement, Meux *et al.*, 2014).



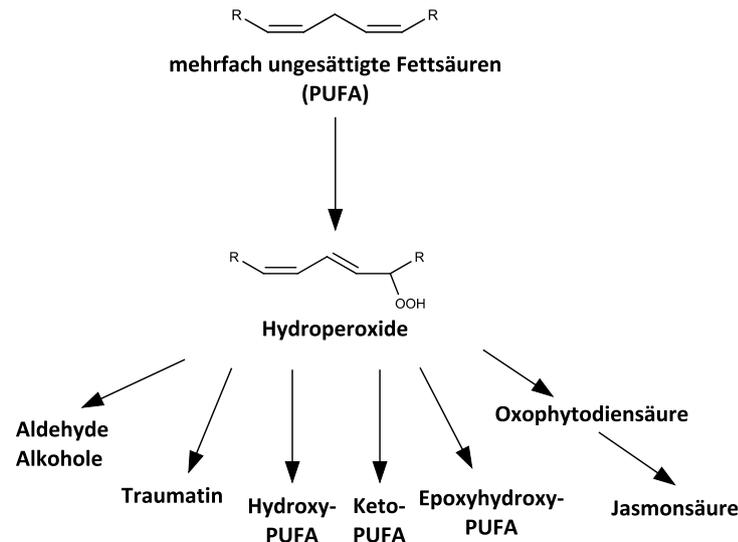
**Abbildung 4.11 Schema der Evolution der Landpflanzen und der Entwicklung von Flavonoiden.**

Die Entwicklung der Landpflanzen begann mit dem Aufkommen nicht-vaskulärer Pflanzen, welche sich aus den grünen Algen entwickelt haben. Dies ging mit großen genomischen und metabolischen Änderungen einher. So besitzen Moose neben den Phytohormonen Abscisinsäure, Auxin und Cytokinin eine erhöhte Stresstoleranz verglichen mit Algen (Rensing *et al.*, 2008). Mit der Entwicklung der vaskulären Pflanzen kamen Gibberellinsäure, Ethylen, Jasmonsäure und Brassinosteroide hinzu. Die Größe und Komplexizität der Genfamilien erhöhte sich im Laufe der Evolution, was sich vor allem in Sekundärmetabolismus-assoziierten Genen widerspiegelt (Chae *et al.*, 2014). Auf metabolischer Ebene ist dies anhand der Anzahl und Diversität von Flavonoiden darstellbar.

Auch für spezifische Aufgaben von GSTs im Zusammenhang mit Flavonoiden, die über die Detoxifizierung hinausgehen, gibt es Hinweise. So zeigt die Arabidopsis-Mutante *tt19*, bei welcher das Gen *GSTF12* betroffen ist, Defekte in der Akkumulation von Anthocyaninen und Proanthocyanidinen (Kitamura *et al.*, 2004). Auch in anderen Spezies sind Flavonoide bekannt, deren vakuolärer Transport GSH-abhängig ist (Li *et al.*, 1997; Zhao, 2015). Da neben Flavonoiden auch Phenylpropanoide und Lignin-Oligomere in der Vakuole vorkommen, ist die Beteiligung weiterer GSTs als Transportproteine für diese Substanzen nicht ausgeschlossen (Dima *et al.*, 2015; Krueger *et al.*, 2011; Tohge *et al.*, 2011). Anhaltspunkte für eine GST-vermittelte Regulation der Flavonoidbiosynthese basieren auf der Induktion der Chalconsynthase, dem Schlüsselenzym der Flavonoidbiosynthese, welche durch die Überexpression der PcGST1 in Petersilie (*Petroselinum crispum*) beeinflusst wird (Loyall *et al.*, 2000). Das homologe Gen in Arabidopsis ist *GSTU17*, welches in dieser Spezies mit fünf weiteren Genen der Flavonoidbiosynthese coexpressiert ist

(<http://atted.jp/>, Obayashi und Kinoshita, 2010). Zudem haben Cummins und Kollegen gezeigt, dass die Überexpression der AmGSTF1 aus *A. myosuroides* in *Arabidopsis* den Flavonoidmetabolismus beeinflusst, wobei die molekularen Mechanismen dieser Regulation nicht geklärt sind (Cummins *et al.*, 2013). All diese Ergebnisse legen einen Zusammenhang zwischen GSTs und Sekundärmetabolismus, besonders den Flavonoiden, nahe.

Eine weitere Klasse von Substanzen, die durch ROS entsteht und mit GSH reagiert, sind die Produkte der Lipidperoxidation (Berhane *et al.*, 1994; Berhane und Mannervik, 1990; Hubatsch *et al.*, 1998). Die nachgewiesene Bindung von Fettsäuren durch GSTUs macht eine Aufgabe dieser Enzyme bei der Detoxifizierung dieser radikalen Oxidationsprodukte wahrscheinlich (Dixon und Edwards, 2009). Ähnlich wie bei Flavonoiden könnten neben dieser allgemeinen, detoxifizierenden Rolle GSTs auch spezifische Aufgaben beim Transport oder Signalweiterleitung übernehmen. So entstehen oxidierte, mehrfach ungesättigte Fettsäuren (*polyunsaturated fatty acids*, PUFAs) nicht nur durch oxidativen Stress sondern auch gezielt enzymatisch in der Zelle. Lipoxygenasen synthetisieren Hydroxy-PUFAs, die Substrate für eine Reihe unterschiedlicher Produkte, wie Epoxyfettsäuren, Ketofettsäuren, Nonenal, Jasmonsäure, Traumatin und verschiedenen Alkoholen und Aldehyden, sind (Feussner und Wasternack, 2002) (Abbildung 4.12). Zum einen sind viele dieser Produkte Signale für Verwundung und Pathogene und haben Einfluss auf die Genexpression, auch von GST-Genen (Mueller *et al.*, 2008; Vollenweider *et al.*, 2000). Zum anderen sind sie Substrate für GSTs, die funktionelle Aufgabe der GSH-Konjugation wurde bisher noch nicht geklärt (Davoine *et al.*, 2006; Dixon und Edwards, 2009; Dueckershoff *et al.*, 2008).



**Abbildung 4.12 Produkte der enzymatischen und nicht-enzymatischen Lipidperoxidation in Pflanzen.**

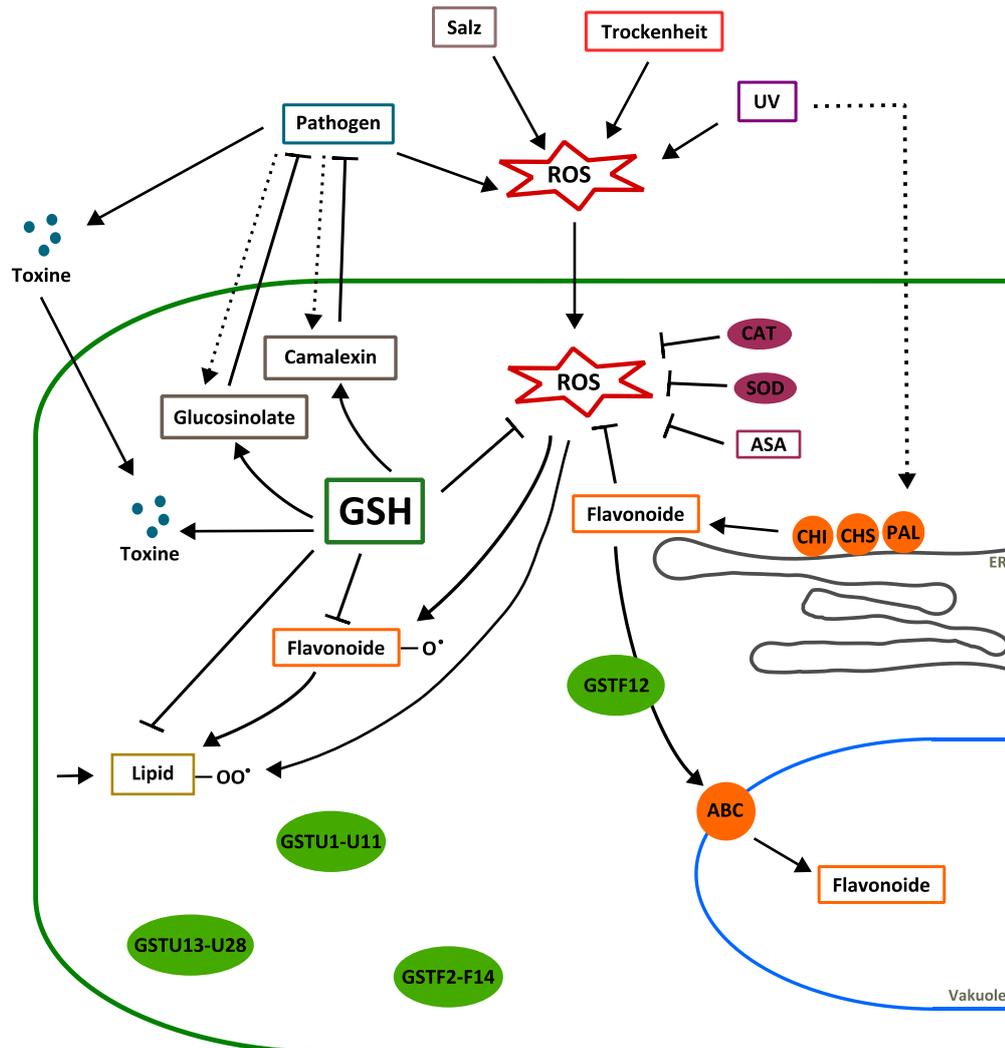
Mehrfach ungesättigte Fettsäuren (PUFA), wie Linolsäure oder  $\alpha$ -Linolensäure, werden über die entsprechenden Hydroperoxide zu einer Vielzahl verschiedener Produkte in Pflanzen oxidiert. Dies kann im Rahmen des Lipoxygenase-Weges enzymatisch passieren oder durch ROS vermittelt werden (Davoine *et al.*, 2006; Feussner und Wasternack, 2002).

Neben Sekundärmetaboliten und oxidierten Fettsäuren wird GSTs auch die Beteiligung an der Pathogen-Antwort zugeschrieben. Diese unterscheidet sich abhängig vom jeweiligen Pathogen. So zählen vier GSTFs zu den am stärksten induzierten Proteinen in Arabidopsis nach der Infektion mit *Fusarium spec.*, wobei die Induktion abhängig von der *Fusarium*-Art variiert (Asano *et al.*, 2012). Im Gegensatz dazu resultierte die Infektion von Arabidopsis mit *Botrytis cinerea* vor allem in der Induktion von GSTUs (Windram *et al.*, 2012). In diesem Zusammenhang wurden auch Gene der Camalexinbiosynthese, der ROS-Antwort und der JA-Antwort induziert, was die Frage aufwirft, auf welche Weise GSTs an der Pathogenantwort beteiligt sind. Für die Reaktion von exogenen Toxinen mit GSH gibt es bisher nur wenige Beispiele. In Weizen wurde kürzlich das GSH-Konjugat von Deoxynivalenol, einem *Fusarium*-Toxin, *in planta* nachgewiesen (Kluger *et al.*, 2012). Die Detoxifizierung von Aflatoxin B<sub>1</sub>, einem Mykotoxin der Gattung *Aspergillus*, wurde nur durch tierische GSTs nachgewiesen und eine Analyse in Pflanzen steht bisher aus (Hayes *et al.*, 1991). Neben der Beteiligung an der Detoxifizierung von pilzlichen oder bakteriellen Toxinen, wurde oben bereits ausgeführt, dass GSTs sowohl an der Synthese von Sekundärmetaboliten als auch der Detoxifizierung von, durch oxidativen Stress verursachten, Reaktionsprodukten beteiligt sein können. Bollina und Kollegen haben gezeigt, dass *Fusarium*-resistente Gerste-Arten erhöhte Level von Phenylpropanoiden und Flavonoiden aufweisen (Bollina *et al.*, 2011). Einer Vielzahl von Sekundärmetaboliten wurde eine antimikrobielle oder antimykotische Wirkung nachgewiesen (Dixon, 2001). Darüber hinaus sind Arabidopsis-Mutanten, welche einen verringerten

Glucosinolatgehalt haben - Sekundärmetabolite, an deren Synthese GSTs beteiligt sind - anfälliger gegenüber Pilz-Pathogenen (Bednarek *et al.*, 2009). Auf diese Weise könnten GSTs zur Pathogenabwehr beitragen. Zudem führt Pathogen-vermittelter Stress zu einer erhöhten ROS-Produktion (Torres *et al.*, 2006). GSTs scheinen dabei geeignet zu sein, um sekundäre ROS-Produkte, wie oxidierte Polyphenole oder Produkte der Lipidperoxidation, zu binden und somit DNA und Proteine vor Schäden zu schützen (Abbildung 4.13).

Die breite Substratspezifität könnte im Falle der GSTUs eher auf eine allgemeine, detoxifizierende Funktion hinweisen, während GSTFs spezifische Aufgaben in der Synthese und dem Transport von Sekundärmetaboliten übernehmen. Die große Anzahl der GSTs kann in diesem Zusammenhang zum einen durch eine definierte Stressantwort, die zur Synthese von spezifischen Sekundärmetaboliten führt, und zum anderen durch Oxidationsprodukte, die als Signale in der Zelle verwendet werden, erklärt werden (Dixon und Paiva, 1995; Mittler *et al.*, 2011; Pourcel *et al.*, 2007). Eine spezifische Bindung solcher Produkte durch bestimmte GSTs kann daher sowohl für eine optimale Detoxifizierung als auch für eine mögliche Beteiligung an der Signalweiterleitung nötig sein.

Die funktionelle Charakterisierung der GST-Familie aus *A. thaliana* und anderen Pflanzen bleibt, vor allem im Hinblick auf ihre endogenen Aufgaben, eine große Herausforderung. Die Analysen im Hefesystem können dabei, wie im Falle der Chlorotriazine, überlappende Substratspezifitäten einzelner GSTs aufdecken und auf eine vergleichbare Spezifität gegenüber endogenen Substraten hindeuten.



**Abbildung 4.13 Mögliche endogene Funktionen der GSTs in Zusammenhang mit ROS.**

ROS kann in der Pflanze durch verschiedene Stimuli, wie Pathogene, UV oder anderen abiotischen Stress, ausgelöst werden. Um Proteine und DNA vor möglichen Schäden zu schützen besitzen Pflanzen mehrere Möglichkeiten um ROS abzufangen. Neben dem enzymatischen Abbau durch Enzyme (CAT, SOD) sind GSH und Ascorbinsäure (ASA) die wichtigsten Metabolite der nicht-enzymatischen ROS-Reaktion. GSH kann dabei zusätzlich die sekundären Produkte, die durch ein Übermaß an ROS entstehen und selbst Radikale sind, abfangen. Dazu gehören oxidierte Flavonoide und Produkte der Lipidperoxidation. Die Bindung von Lipiden und Flavonoiden an GSTs ist bekannt und macht die Beteiligung dieser Enzyme an der Detoxifizierung dieser Metabolite bei oxidativem Stress wahrscheinlich. Im Falle von Pathogenen gibt es zudem eine direkte Antwort der GSTs durch ihre Beteiligung an der Detoxifizierung von Toxinen und der Synthese von induzierten Sekundärmetaboliten.

## 5. Literaturverzeichnis

- Aharoni, A., Ric Vos, C.H. de, Verhoeven, H.A., Maliepaard, C.A., Kruppa, G., Bino, R. and Goodenowe, D.B. (2002) Nontargeted Metabolome Analysis by Use of Fourier Transform Ion Cyclotron Mass Spectrometry. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 6, 217–234.
- Allocati, N., Casalone, E., Masulli, M., Ceccarelli, I., Carletti, E., Parker, M.W. and Di Ilio, C. (1999) Functional analysis of the evolutionarily conserved proline 53 residue in *Proteus mirabilis* glutathione transferase B1-1. *FEBS letters*, 445, 347–350.
- Amrhein, N., Deus, B., Gehrke, P. and Steinrücken, H.C. (1980) The Site of the Inhibition of the Shikimate Pathway by Glyphosate: II. INTERFERENCE OF GLYPHOSATE WITH CHORISMATE FORMATION IN VIVO AND IN VITRO. *PLANT PHYSIOLOGY*, 66, 830–834.
- Anderson, M.P. and Gronwald, J.W. (1991) Atrazine Resistance in a Velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) Biotype Due to Enhanced Glutathione S-Transferase Activity. *Plant Physiol.*, 96, 104–109.
- Andrews, C.J., Skipsey, M., Townson, J.K., Morris, C., Jepson, I. and Edwards, R. (1997) Glutathione transferase activities toward herbicides used selectively in soybean. *Pestic. Sci.*, 51, 213–222.
- Asano, T., Kimura, M. and Nishiuchi, T. (2012) The defense response in *Arabidopsis thaliana* against *Fusarium sporotrichioides*. *Proteome Sci*, 10, 61.
- Atkinson, H.J. and Babbitt, P.C. (2009) Glutathione transferases are structural and functional outliers in the thioredoxin fold. *Biochemistry*, 48, 11108–11116.
- Awad, H.M., Boersma, M.G., Boeren, S., van Bladeren, P.J., Vervoort, J. and Rietjens, Ivonne M. C. M. (2001) Structure–Activity Study on the Quinone/Quinone Methide Chemistry of Flavonoids. *Chem. Res. Toxicol.*, 14, 398–408.
- Awasthi, S., Pandya, U., Singhal, S.S., Lin, J.T., Thiviyanathan, V., Seifert Jr., W.E., Awasthi, Y.C. and Ansari, G. (2000) Curcumin–glutathione interactions and the role of human glutathione S-transferase P1-1. *Chemico-Biological Interactions*, 128, 19–38.
- Axarli, I., Dhavala, P., Papageorgiou, A.C. and Labrou, N.E. (2009a) Crystal structure of Glycine max glutathione transferase in complex with glutathione: investigation of the mechanism operating by the Tau class glutathione transferases. *The Biochemical journal*, 422, 247–256.
- Axarli, I., Dhavala, P., Papageorgiou, A.C. and Labrou, N.E. (2009b) Crystallographic and functional characterization of the fluorodifen-inducible glutathione transferase from Glycine max reveals an active site topography suited for diphenylether herbicides and a novel L-site. *Journal of molecular biology*, 385, 984–1002.
- Axarli, I.A., Rigden, D.J. and Labrou, N.E. (2004) Characterization of the ligandin site of maize glutathione S-transferase I. *The Biochemical journal*, 382, 885–893.
- Bak, S., Beisson, F., Bishop, G., Hamberger, B., Höfer, R., Paquette, S. and Werck-Reichhart, D. (2011) Cytochromes P450. The *Arabidopsis Book*. *The Arabidopsis Book*, e0144.
- Bednarek, P. (2012) Sulfur-Containing Secondary Metabolites from *Arabidopsis thaliana* and other Brassicaceae with Function in Plant Immunity. *ChemBioChem*, n/a.
- Bednarek, P., Pislewski-Bednarek, M., Svatos, A., Schneider, B., Doubsky, J., Mansurova, M., Humphry, M., Consonni, C., Panstruga, R., Sanchez-Vallet, A., Molina, A. and Schulze-Lefert, P. (2009) A Glucosinolate Metabolism Pathway in Living Plant Cells Mediates Broad-Spectrum Antifungal Defense. *Science*, 323, 101–106.
- Behringer, C., Batsch, K. and Schaller, A. (2011) Safeners recruit multiple signalling pathways for the orchestrated induction of the cellular xenobiotic detoxification machinery in *Arabidopsis*. *Plant, Cell & Environment*, 34, 1970–1985.
- Benekos, K., Kissoudis, C., Naniou-Obeidat, I., Labrou, N., Madesis, P., Kalamaki, M., Makris, A. and Tsaftaris, A. (2010) Overexpression of a specific soybean GmGSTU4 isoenzyme improves diphenyl ether and chloroacetanilide herbicide tolerance of transgenic tobacco plants. *Journal of biotechnology*, 150, 195–201.
- Berhane, K. and Mannervik, B. (1990) Inactivation of the genotoxic aldehyde acrolein by human glutathione transferases of classes alpha, mu, and pi. *Molecular Pharmacology*, 37, 251–254.
- Berhane, K., Widersten, M., Engström, A., Kozarich, J.W. and Mannervik, B. (1994) Detoxication of base propenals and other alpha, beta-unsaturated aldehyde products of radical reactions and lipid peroxidation by human glutathione transferases. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91, 1480–1484.

- Bettini, P., McNally, S., Seignac, M., Darmency, H., Gasquez, J. and Dron, M.** (1987) Atrazine Resistance in *Chenopodium album*: Low and High Levels of Resistance to the Herbicide Are Related to the Same Chloroplast PSBA Gene Mutation. *PLANT PHYSIOLOGY*, 84, 1442–1446.
- Björkman, O. and Demmig, B.** (1987) Photon yield of O<sub>2</sub> evolution and chlorophyll fluorescence characteristics at 77 K among vascular plants of diverse origins. *Planta*, 170, 489–504.
- Björnstedt, R., Stenberg, G., Widersten, M., Board, P.G., Sinning, I., Alwyn Jones, T. and Mannervik, B.** (1995) Functional significance of arginine 15 in the active site of human class alpha glutathione transferase A1-1. *Journal of molecular biology*, 247, 765–773.
- Blum, R., Beck, A., Korte, A., Stengel, A., Letzel, T., Lenzian, K. and Grill, E.** (2007) Function of phytochelatin synthase in catabolism of glutathione-conjugates. *The Plant Journal*, 49, 740–749.
- Board, P.G., Coggan, M., Chelvanayagam, G., Easteal, S., Jermiin, L.S., Schulte, G.K., Danley, D.E., Hoth, L.R., Griffor, M.C., Kamath, A.V., Rosner, M.H., Chrunch, B.A., Perregaux, D.E., Gabel, C.A., Geoghegan, K.F. and Pandit, J.** (2000) Identification, Characterization, and Crystal Structure of the Omega Class Glutathione Transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 24798–24806.
- Board, P.G., Coggan, M., Wilce, M.C. and Parker, M.W.** (1995) Evidence for an essential serine residue in the active site of the Theta class glutathione transferases. *The Biochemical journal*, 311 (Pt 1), 247–250.
- Böger, P.** (1997) Finding the Target Site of Chloroacetamides: A Thorny Subject. *Journal of pesticide science*, 22, 257–262.
- Bollina, V., Kushalappa, A.C., Choo, T.M., Dion, Y. and Rioux, S.** (2011) Identification of metabolites related to mechanisms of resistance in barley against *Fusarium graminearum*, based on mass spectrometry. *Plant Mol. Biol.*, 77, 355–370.
- Booth, J., Boyland, E. and Sims, P.** (1961) An enzyme from rat liver catalysing conjugations with glutathione. *Biochemical Journal*, 79, 516–524.
- Brachmann, C.B., Davies, A., Cost, G.J., Caputo, E., Li, J., Hieter, P. and Boeke, J.D.** (1998) Designer deletion strains derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: A useful set of strains and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, 14, 115–132.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72, 248–254.
- Brazier-Hicks, M. and Edwards, R.** (2005) Functional importance of the family 1 glucosyltransferase UGT72B1 in the metabolism of xenobiotics in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 42, 556–566.
- Brazier-Hicks, M. and Edwards, R.** (2013) Metabolic engineering of the flavone-C-glycoside pathway using polyprotein technology. *Metabolic Engineering*, 16, 11–20.
- Brazier-Hicks, M., Evans, K.M., Cunningham, O.D., Hodgson, David R W, Steel, P.G. and Edwards, R.** (2008) Catabolism of glutathione conjugates in *Arabidopsis thaliana*. Role in metabolic reactivation of the herbicide safener fenclorim. *The Journal of biological chemistry*, 283, 21102–21112.
- Brazier-Hicks, M., Offen, W.A., Gershtater, M.C., Revett, T.J., Lim, E.-K., Bowles, D.J., Davies, G.J. and Edwards, R.** (2007) Characterization and engineering of the bifunctional N- and O-glucosyltransferase involved in xenobiotic metabolism in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104, 20238–20243.
- Bruns, C.M., Hubatsch, I., Ridderström, M., Mannervik, B. and Tainer, J.A.** (1999) Human glutathione transferase A4-4 crystal structures and mutagenesis reveal the basis of high catalytic efficiency with toxic lipid peroxidation products 1. *Journal of molecular biology*, 288, 427–439.
- Cabral, M.G., Viegas, C.A., Teixeira, M.C. and Sá-Correia, I.** (2003) Toxicity of chlorinated phenoxyacetic acid herbicides in the experimental eukaryotic model *Saccharomyces cerevisiae*: role of pH and of growth phase and size of the yeast cell population. *Chemosphere*, 51, 47–54.
- Cabrero, T.R.R.E.T.M.C.D.P.&S.-C.I., ed.** (2011) *Resistance to Herbicides in the Model Organisms Saccharomyces cerevisiae and Arabidopsis thaliana: the Involvement of Multidrug Resistance Transporters.* InTech.
- Caccuri, A.M., Lo Bello, M., Nuccetelli, M., Nicotra, M., Rossi, P., Antonini, G., Federici, G. and Ricci, G.** (1998) Proton Release upon Glutathione Binding to Glutathione Transferase P1-1: Kinetic Analysis of a Multistep Glutathione Binding Process. *Biochemistry*. *Biochemistry*, 37, 3028–3034.
- Callen, D.F. and Philpot, R.M.** (1977) Cytochrome P-450 and the activation of promutagens in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mutation research*, 45, 309–324.
- Cannon, R.D., Lamping, E., Holmes, A.R., Niimi, K., Baret, P.V., Keniya, M.V., Tanabe, K., Niimi, M., Goffeau, A. and Monk, B.C.** (2009) Efflux-mediated antifungal drug resistance. *Clinical microbiology reviews*, 22, 291–321, Table of Contents.

- Chae, L., Kim, T., Nilo-Poyanco, R. and Rhee, S.Y.** (2014) Genomic Signatures of Specialized Metabolism in Plants. *Science*, 344, 510–513.
- Chang, W., Zhang, M., Zheng, S., Li, Y., Li, X., Li, W., Li, G., Lin, Z., Xie, Z., Zhao, Z. and Lou, H.** (2015) Trapping toxins within lipid droplets is a resistance mechanism in fungi. *Scientific reports*, 5, 15133.
- Chang, Y.-L., Hsieh, C.-L., Huang, Y.-M., Chiou, W.-L., Kuo, Y.-H. and Tseng, M.-H.** (2013) Modified method for determination of sulfur metabolites in plant tissues by stable isotope dilution-based liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry. *Analytical biochemistry*, 442, 24–33.
- Chen, J.-H., Jiang, H.-W., Hsieh, E.-J., Chen, H.-Y., Chien, C.-T., Hsieh, H.-L. and Lin, T.-P.** (2012) Drought and Salt Stress Tolerance of an Arabidopsis Glutathione S-Transferase U17 Knockout Mutant Are Attributed to the Combined Effect of Glutathione and Abscisic Acid. *PLANT PHYSIOLOGY*, 158, 340–351.
- Cherifi, M., Raveton, M., Picciocchi, A., Ravanel, P. and Tissut, M.** (2001) Atrazine metabolism in corn seedlings. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39, 665–672.
- Choi, J.H., Lou, W. and Vancura, A.** (1998) A Novel Membrane-bound Glutathione S-Transferase Functions in the Stationary Phase of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 273, 29915–29922.
- Clarke, E.D.G.D.T.&A.D.** (1998) Metabolism-related assays and their application to agrochemical research: reactivity of pesticides with glutathione and glutathione transferases. *Pesticide science*, 54, 385–393.
- Clough, S.J. and Bent, A.F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16, 735–743.
- Coleman, J., Blake-Kalff, M. and Davies, E.** (1997) Detoxification of xenobiotics by plants: chemical modification and vacuolar compartmentation. *Trends in Plant Science*, 2, 144–151.
- Collinson, E.J. and Grant, C.M.** (2003) Role of Yeast Glutaredoxins as Glutathione S-transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 22492–22497.
- Copley, S.D., Novak, Walter R. P. and Babbitt, P.C.** (2004) Divergence of Function in the Thioredoxin Fold Suprafamily: Evidence for Evolution of Peroxiredoxins from a Thioredoxin-like Ancestor†. *Biochemistry*, 43, 13981–13995.
- Croucher, L., Jewess, P., Roberts, T.R., Hutson, D.H., Lee, P.W., Nicholls, P.H. and Plimmer, J.R.** (1999) *Metabolic Pathways of Agrochemicals: The Royal Society of Chemistry*.
- Cummins, I., Cole, D.J. and Edwards, R.** (1997) Purification of Multiple Glutathione Transferases Involved in Herbicide Detoxification from Wheat (*Triticum aestivum* L.) Treated with the Safener Fenchlorazole-ethyl. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 59, 35–49.
- Cummins, I., Cole, D.J. and Edwards, R.** (1999) A role for glutathione transferases functioning as glutathione peroxidases in resistance to multiple herbicides in black-grass. *The Plant Journal*, 18, 285–292.
- Cummins, I., O’Hagan, D., Jablonkai, I., Cole, D.J., Hehn, A., Werck-Reichhart, D. and Edwards, R.** (2003) Cloning, characterization and regulation of a family of phi class glutathione transferases from wheat. *Plant Molecular Biology*, 52, 591–603.
- Cummins, I., Wortley, D.J., Sabbadin, F., He, Z., Coxon, C.R., Straker, H.E., Sellars, J.D., Knight, K., Edwards, L., Hughes, D., Kaundun, S.S., Hutchings, S.-J., Steel, P.G. and Edwards, R.** (2013) Key role for a glutathione transferase in multiple-herbicide resistance in grass weeds. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110, 5812–5817.
- Das, K. and Roychoudhury, A.** (2014) Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science*, 2.
- Davoine, C., Douki, T., Iacazio, G., Montillet, J.-L. and Triantaphylidès, C.** (2005) Conjugation of Keto Fatty Acids to Glutathione in Plant Tissues. Characterization and Quantification by HPLC–Tandem Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry. Anal. Chem.*, 77, 7366–7372.
- Davoine, C., Falletti, O., Douki, T., Iacazio, G., Ennar, N., Montillet, J.-L. and Triantaphylidès, C.** (2006) Adducts of oxylipin electrophiles to glutathione reflect a 13 specificity of the downstream lipoxygenase pathway in the tobacco hypersensitive response. *PLANT PHYSIOLOGY*, 140, 1484–1493.
- Deng, F. and Hatzios, K.K.** (2002) Characterization and Safener Induction of Multiple Glutathione S-Transferases in Three Genetic Lines of Rice. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 72, 24–39.
- DeRidder, B.P., Dixon, D.P., Beussman, D.J., Edwards, R. and Goldsbrough, P.B.** (2002) Induction of glutathione S-transferases in *Arabidopsis* by herbicide safeners. *PLANT PHYSIOLOGY*, 130, 1497–1505.
- DeRidder, B.P. and Goldsbrough, P.B.** (2006) Organ-specific expression of glutathione S-transferases and the efficacy of herbicide safeners in *Arabidopsis*. *PLANT PHYSIOLOGY*, 140, 167–175.
- Diao, G., Wang, Y., Wang, C. and Yang, C.** (2010) Cloning and Functional Characterization of a Novel Glutathione S-Transferase Gene from *Limonium bicolor*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29, 77–87.

- Didierjean, L., Gondet, L., Perkins, R., Lau, S.-M.C., Schaller, H., O'Keefe, D.P. and Werck-Reichhart, D.** (2002) Engineering Herbicide Metabolism in Tobacco and Arabidopsis with CYP76B1, a Cytochrome P450 Enzyme from Jerusalem Artichoke. *PLANT PHYSIOLOGY*, 130, 179–189.
- Dikicioglu, D., Oc, S., Rash, B.M., Dunn, W.B., Pir, P., Kell, D.B., Kirdar, B. and Oliver, S.G.** (2014) Yeast cells with impaired drug resistance accumulate glycerol and glucose. *Molecular bioSystems*, 10, 93–102.
- Dima, O., Morreel, K., Vanholme, B., Kim, H., Ralph, J. and Boerjan, W.** (2015) Small Glycosylated Lignin Oligomers Are Stored in Arabidopsis Leaf Vacuoles. *The Plant cell*, 27, 695–710.
- Dixon, D., Cole, D.J. and Edwards, R.** (1997) Characterisation of Multiple Glutathione Transferases Containing the GST I Subunit with Activities toward Herbicide Substrates in Maize (*Zea mays*). *Pestic. Sci.*, 50, 72–82.
- Dixon, D.P., Cole, D.J. and Edwards, R.** (1999) Dimerisation of maize glutathione transferases in recombinant bacteria. *Plant Molecular Biology*, 40, 997–1008.
- Dixon, D.P., Cole, D.J. and Edwards, R.** (2000) Characterisation of a Zeta Class Glutathione Transferase from Arabidopsis thaliana with a Putative Role in Tyrosine Catabolism. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 384, 407–412.
- Dixon, D.P., Davis, B.G. and Edwards, R.** (2002) Functional Divergence in the Glutathione Transferase Superfamily in Plants: IDENTIFICATION OF TWO CLASSES WITH PUTATIVE FUNCTIONS IN REDOX HOMEOSTASIS IN ARABIDOPSIS THALIANA. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 30859–30869.
- Dixon, D.P. and Edwards, R.** (2009) Selective Binding of Glutathione Conjugates of Fatty Acid Derivatives by Plant Glutathione Transferases. *Journal of Biological Chemistry*, 284, 21249–21256.
- Dixon, D.P. and Edwards, R.** (2010a) Glutathione Transferases. *arab book*, 8, e0131.
- Dixon, D.P. and Edwards, R.** (2010b) Roles for Stress-inducible Lambda Glutathione Transferases in Flavonoid Metabolism in Plants as Identified by Ligand Fishing. *Journal of Biological Chemistry*, 285, 36322–36329.
- Dixon, D.P., Hawkins, T., Hussey, P.J. and Edwards, R.** (2009) Enzyme activities and subcellular localization of members of the Arabidopsis glutathione transferase superfamily. *J. Exp. Bot.*, 60, 1207–1218.
- Dixon, D.P., Laphorn, A., Madesis, P., Mudd, E.A., Day, A. and Edwards, R.** (2008) Binding and glutathione conjugation of porphyrinogens by plant glutathione transferases. *The Journal of biological chemistry*, 283, 20268–20276.
- Dixon, D.P., Skipsey, M. and Edwards, R.** (2010) Roles for glutathione transferases in plant secondary metabolism. *Phytochemistry*, 71, 338–350.
- Dixon, R.A.** (2001) Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411, 843–847.
- Dixon, R.A. and Paiva, N.L.** (1995) Stress-Induced Phenylpropanoid Metabolism. *The Plant cell*, 7, 1085–1097.
- Dos Santos, S.C., Teixeira, M.C., Cabrito, T.R. and Sá-Correia, I.** (2012) Yeast toxicogenomics: genome-wide responses to chemical stresses with impact in environmental health, pharmacology, and biotechnology. *Front Genet*, 3, 63.
- Dourado, D.F., Fernandes, P.A., Mannervik, B. and Ramos, M.J.** (2008) Glutathione Transferase: New Model for Glutathione Activation. *Chem. Eur. J.*, 14, 9591–9598.
- Dueckershoff, K., Mueller, S., Mueller, M.J. and Reinders, J.** (2008) Impact of cyclopentenone-oxylipins on the proteome of Arabidopsis thaliana. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1784, 1975–1985.
- Duke, S.O.** (1990) Overview of herbicide mechanisms of action. *Environmental Health Perspectives*, 87, 263–271.
- Dunn, W.B.** (2008) Current trends and future requirements for the mass spectrometric investigation of microbial, mammalian and plant metabolomes. *Physical biology*, 5, 11001.
- Edwards, R. and Dixon, D.P.** (2005) Plant Glutathione Transferases. In *Methods in Enzymology: Glutathione Transferases and Gamma-Glutamyl Transpeptidases* (Helmut Sies and Lester Packer, ed): Academic Press, pp. 169–186.
- Edwards, R., Dixon, D.P., Cummins, I., Brazier-Hicks, M. and Skipsey, M.** (2011) New Perspectives on the Metabolism and Detoxification of Synthetic Compounds in Plants, 8, 125–148.
- Edwards, R., Dixon, D.P. and Walbot, V.** (2000) Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends in plant science*, 5, 193–198.
- El-Lithy, M.E., Rodrigues, G.C., van Rensen, Jack J S, Snel, Jan F H, Dassen, Hans J H A, Koornneef, M., Jansen, Marcel A K, Aarts, Mark G M and Vreugdenhil, D.** (2005) Altered photosynthetic performance of a natural Arabidopsis accession is associated with atrazine resistance. *Journal of experimental botany*, 56, 1625–1634.

- Fang, R., Chen, G.-h., Yi, L.-x., Shao, Y.-x., Zhang, L., Cai, Q.-h. and Xiao, J.** (2014) Determination of eight triazine herbicide residues in cereal and vegetable by micellar electrokinetic capillary chromatography with on-line sweeping. *Food Chem*, 145, 41–48.
- Feussner, I. and Wasternack, C.** (2002) THE LIPOXYGENASE PATHWAY. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53, 275–297.
- Frear, D.S. and Swanson, H.R.** (1973) Metabolism of substituted diphenylether herbicides in plants. I. Enzymatic cleavage of fluorodifen in peas (*Pisum sativum* L.). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 3, 473–482.
- Frova, C.** (2006) Glutathione transferases in the genomics era: New insights and perspectives. *Biomolecular engineering*, 23, 149–169.
- Fuerst, E.P. and Norman, M.A.** (1991) Interactions of Herbicides with Photosynthetic Electron Transport. *Weed Science*, 39, 458–464.
- Fuhrer, T., Heer, D., Begemann, B. and Zamboni, N.** (2011) High-throughput, accurate mass metabolome profiling of cellular extracts by flow injection-time-of-flight mass spectrometry. *Analytical chemistry*, 83, 7074–7080.
- Garcerá, A., Barreto, L., Piedrafita, L., Tamarit, J. and Herrero, E.** (2006) *Saccharomyces cerevisiae* cells have three Omega class glutathione S-transferases acting as 1-Cys thiol transferases. *Biochem. J.*, 398, 187.
- Gayler, S., Trapp, S., Matthies, M., Schroll, R. and Behrendt, H.** (1995) Uptake of terbuthylazine and its medium polar metabolites into maize plants. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2, 98–103.
- Geu-Flores, F., Moldrup, M.E., Bottcher, C., Olsen, C.E., Scheel, D. and Halkier, B.A.** (2011) Cytosolic gamma -Glutamyl Peptidases Process Glutathione Conjugates in the Biosynthesis of Glucosinolates and Camalexin in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE*, 23, 2456–2469.
- Giavalisco, P., Hummel, J., Lisec, J., Inostroza, A.C., Catchpole, G. and Willmitzer, L.** (2008) High-Resolution Direct Infusion-Based Mass Spectrometry in Combination with Whole 13 C Metabolome Isotope Labeling Allows Unambiguous Assignment of Chemical Sum Formulas. *Anal. Chem.*, 80, 9417–9425.
- Giavalisco, P., Li, Y., Matthes, A., Eckhardt, A., Hubberten, H.-M., Hesse, H., Segu, S., Hummel, J., Köhl, K. and Willmitzer, L.** (2011) Elemental formula annotation of polar and lipophilic metabolites using (13) C, (15) N and (34) S isotope labelling, in combination with high-resolution mass spectrometry. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 68, 364–376.
- Gietz, R.D. and Schiestl, R.H.** (2007) High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. *Nat Protoc*, 2, 31–34.
- Gläser, K., Kanawati, B., Kubo, T., Schmitt-Kopplin, P. and Grill, E.** (2014) Exploring the Arabidopsis sulfur metabolome. *Plant J*, 77, 31–45.
- Glombitza, S., Dubuis, P.-H., Thulke, O., Welzl, G., Bovet, L., Götz, M., Affenzeller, M., Geist, B., Hehn, A., Asnaghi, C., Ernst, D., Seidlitz, H.K., Gundlach, H., Mayer, K.F., Martinoia, E., Werck-Reichhart, D., Mauch, F. and Schäffner, A.R.** (2004) Crosstalk and differential response to abiotic and biotic stressors reflected at the transcriptional level of effector genes from secondary metabolism. *Plant Mol. Biol.*, 54, 817–835.
- Godat, E., Madalinski, G., Muller, L., Heilier, J.-F., Labarre, J. and Junot, C.** (2010) Mass spectrometry-based methods for the determination of sulfur and related metabolite concentrations in cell extracts. *Methods in enzymology*, 473, 41–76.
- Goloubinoff, P., Edelman, M. and Hallick, R.B.** (1984) Chloroplast-coded atrazine resistance in *Solanum nigrum*: psbA loci from susceptible and resistant biotypes are isogenic except for a single codon change. *Nucleic Acids Research*, 12, 9489–9496.
- Gong, H., Jiao, Y., Hu, W.-w. and Pua, E.-C.** (2005) Expression of glutathione-S-transferase and its role in plant growth and development in vivo and shoot morphogenesis in vitro. *Plant Mol Biol*, 57, 53–66.
- Govindarajan, S., Mannervik, B., Silverman, J.A., Wright, K., Regitsky, D., Hegazy, U., Purcell, T.J., Welch, M., Minshull, J. and Gustafsson, C.** (2014) Mapping of Amino Acid Substitutions Conferring Herbicide Resistance in Wheat Glutathione Transferase. *ACS Synth Biol*.
- Graminski, G.F., Kubo, Y. and Armstrong, R.N.** (1989) Spectroscopic and kinetic evidence for the thiolate anion of glutathione at the active site of glutathione S-transferase. *Biochemistry*. *Biochemistry*, 28, 3562–3568.
- Gray, J.A., Balke, N.E. and Stoltenberg, D.E.** (1996) Increased Glutathione Conjugation of Atrazine Confers Resistance in a Wisconsin Velvetleaf (*Abutilon theophrasti*) Biotype. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 55, 157–171.

- Grill, E., Löffler, S., Winnacker, E.-L. and Zenk, M.H. (1989) Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific  $\gamma$ -glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatase synthase). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 86, 6838–6842.
- Grzam, A., Martin, M.N., Hell, R. and Meyer, A.J. (2007) gamma-Glutamyl transpeptidase GGT4 initiates vacuolar degradation of glutathione S-conjugates in Arabidopsis. *FEBS letters*, 581, 3131–3138.
- Grzam, A., Tennstedt, P., Clemens, S., Hell, R. and Meyer, A.J. (2006) Vacuolar sequestration of glutathione S-conjugates outcompetes a possible degradation of the glutathione moiety by phytochelatase synthase. *FEBS letters*, 580, 6384–6390.
- Güldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J. and Hegemann, J.H. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res.*, 24, 2519–2524.
- Güldener, U., Heinisch, J., Koehler, G.J., Voss, D. and Hegemann, J.H. (2002) A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Res.*, 30, e23.
- Gunning, V., Tzafestas, K., Sparrow, H., Johnston, E.J., Brentnall, A.S., Potts, J.R., Rylott, E.L. and Bruce, N.C. (2014) Arabidopsis Glutathione Transferases U24 and U25 Exhibit a Range of Detoxification Activities with the Environmental Pollutant and Explosive, 2,4,6-Trinitrotoluene. *Plant Physiol.*, 165, 854–865.
- Hanscho, M., Ruckerbauer, D.E., Chauhan, N., Hofbauer, H.F., Krahulec, S., Nidetzky, B., Kohlwein, S.D., Zanghellini, J. and Natter, K. (2012) Nutritional requirements of the BY series of *Saccharomyces cerevisiae* strains for optimum growth. *FEMS yeast research*, 12, 796–808.
- Hatton, P.J., Cummins, I., Cole, D.J. and Edwards, R. (1999) Glutathione transferases involved in herbicide detoxification in the leaves of *Setaria faberi* (giant foxtail). *Physiol Plant*, 105, 9–16.
- Hatton, P.J., Dixon, D., Cole, D.J. and Edwards, R. (1996) Glutathione Transferase Activities and Herbicide Selectivity in Maize and Associated Weed Species. *Pestic. Sci.*, 46, 267–275.
- Hayes, J.D., J. Judah, D., McLellan, L.I. and Neal, G.E. (1991) Contribution of the glutathione S-transferases to the mechanisms of resistance to aflatoxin B1. *Pharmacology & Therapeutics*, 50, 443–472.
- Hayeshi, R., Mutingwende, I., Mavengere, W., Masiyanise, V. and Mukanganyama, S. (2007) The inhibition of human glutathione S-transferases activity by plant polyphenolic compounds ellagic acid and curcumin. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 286–295.
- Heap, I. (2014) Global perspective of herbicide-resistant weeds. *Pest. Manag. Sci.*, 70, 1306–1315.
- Heap, I. (2016) The International Survey of Herbicide Resistant Weeds., [www.weedscience.org](http://www.weedscience.org).
- Hegeman, A.D., Schulte, C.F., Cui, Q., Lewis, I.A., Huttlin, E.L., Eghbalian, H., Harms, A.C., Ulrich, E.L., Markley, J.L. and Sussman, M.R. (2007) Stable isotope assisted assignment of elemental compositions for metabolomics. *Analytical chemistry*, 79, 6912–6921.
- Hellens, R.P., Edwards, E.A., Leyland, N.R., Bean, S. and Mullineaux, P.M. (2000) pGreen: a versatile and flexible binary Ti vector for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 42, 819–832.
- Hirose, S., Kawahigashi, H., Ozawa, K., Shiota, N., Inui, H., Ohkawa, H. and Ohkawa, Y. (2005) Transgenic Rice Containing Human CYP2B6 Detoxifies Various Classes of Herbicides. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 3461–3467.
- Hirschberg, J. and McIntosh, L. (1983) Molecular Basis of Herbicide Resistance in *Amaranthus hybridus*. *Science*, 222, 1346–1349.
- Hoffmann, O.L. (1953) Inhibition of Auxin Effects by 2,4,6-Trichlorophenoxyacetic acid. *PLANT PHYSIOLOGY*, 28, 622–628.
- Holt, D.C., Lay, V.J., Clarke, E.D., Dinsmore, A., Jepson, I., Bright, S.W. and Greenland, A.J. (1995) Characterization of the safener-induced glutathione S-transferase isoform II from maize. *Planta*, 196, 295–302.
- Hu, T., Qv, X., Xiao, G. and Huang, X. (2009) Enhanced tolerance to herbicide of rice plants by over-expression of a glutathione S-transferase. *Mol Breeding*, 24, 409–418.
- Hubatsch, I., Ridderström, M. and Mannervik, B. (1998) Human glutathione transferase A4-4: an Alpha class enzyme with high catalytic efficiency in the conjugation of 4-hydroxynonenal and other genotoxic products of lipid peroxidation. *Biochemical Journal*, 330, 175–179.
- Huber, C., Bartha, B., Harpaintner, R. and Schröder, P. (2009) Metabolism of acetaminophen (paracetamol) in plants—two independent pathways result in the formation of a glutathione and a glucose conjugate. *Environmental science and pollution research international*, 16, 206–213.
- Hutson, D.H., ed. (1998) *Metabolic Pathways of Agrochemicals. Herbicides and plant growth regulators.*: Royal Society of Chemistry.

- Hutson, D.H., Roberts, T.R. and Lee, P.W., eds.** (1998) *Metabolic Pathways of Agrochemicals. Herbicides and plant growth regulators*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Inui, H. and Ohkawa, H.** (2005) Herbicide resistance in transgenic plants with mammalian P450 monooxygenase genes. *Pest management science*, 61, 286–291.
- Jablonkai, I. and Hatzios, K.K.** (1991) Role of glutathione and glutathione S-transferase in the selectivity of acetochlor in maize and wheat. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 41, 221–231.
- Jablonowski, N.D., Schäffer, A. and Burauel, P.** (2011) Still present after all these years: persistence plus potential toxicity raise questions about the use of atrazine. *Environmental science and pollution research international*, 18, 328–331.
- Jain, M., Ghanashyam, C. and Bhattacharjee, A.** (2010) Comprehensive expression analysis suggests overlapping and specific roles of rice glutathione S-transferase genes during development and stress responses. *BMC Genomics*, 11, 1–17.
- Jansen, M.A., Depka, B., Trebst, A. and Edelman, M.** (1993) Engagement of specific sites in the plastoquinone niche regulates degradation of the D1 protein in photosystem II. *The Journal of biological chemistry*, 268, 21246–21252.
- Jeppesen, M.G., Ortiz, P., Shepard, W., Kinzy, T.G., Nyborg, J. and Andersen, G.R.** (2003) The Crystal Structure of the Glutathione S-Transferase-like Domain of Elongation Factor 1B from *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 47190–47198.
- Johnston, M., Flick, J.S. and Pexton, T.** (1994) Multiple mechanisms provide rapid and stringent glucose repression of GAL gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and cellular biology*, 14, 3834–3841.
- Jungwirth, H. and Kuchler, K.** (2006) Yeast ABC transporters—a tale of sex, stress, drugs and aging. *FEBS letters*, 580, 1131–1138.
- Kalgutkar, A.S. and Soglia, J.R.** (2005) Minimising the potential for metabolic activation in drug discovery. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 1, 91–142.
- Karavangeli, M., Labrou, N.E., Clonis, Y.D. and Tsaftaris, A.** (2005) Development of transgenic tobacco plants overexpressing maize glutathione S-transferase I for chloroacetanilide herbicides phytoremediation. *Biomolecular engineering*, 22, 121–128.
- Katsuhara, M., Otsuka, T. and Ezaki, B.** (2005) Salt stress-induced lipid peroxidation is reduced by glutathione S-transferase, but this reduction of lipid peroxides is not enough for a recovery of root growth in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 169, 369–373.
- Kelley, L.A., Mezulis, S., Yates, C.M., Wass, M.N. and Sternberg, M.J.E.** (2015) The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat. Protocols*, 10, 845–858.
- Keren, N., Berg, A., van Kan PJ, Levanon, H. and Ohad, I.** (1997) Mechanism of photosystem II photoinactivation and D1 protein degradation at low light: the role of back electron flow. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94, 1579–1584.
- Kilili, K.G., Atanassova, N., Vardanyan, A., Clatot, N., Al-Sabarna, K., Kanellopoulos, P.N., Makris, A.M. and Kampranis, S.C.** (2004) Differential roles of tau class glutathione S-transferases in oxidative stress. *J. Biol. Chem.*, 279, 24540–24551.
- Kind, T. and Fiehn, O.** (2006) Metabolomic database annotations via query of elemental compositions: mass accuracy is insufficient even at less than 1 ppm. *BMC bioinformatics*, 7, 234.
- Kind, T. and Fiehn, O.** (2007) Seven Golden Rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. *BMC bioinformatics*, 8, 105.
- Kissoudis, C., Kalloniati, C., Flemetakis, E., Madesis, P., Labrou, N.E., Tsaftaris, A. and Nianiou-Obeidat, I.** (2015) Stress-inducible GmGSTU4 shapes transgenic tobacco plants metabolome towards increased salinity tolerance. *Acta Physiologiae Plantarum*, 37, 1–11.
- Kitamura, S., Shikazono, N. and Tanaka, A.** (2004) TRANSPARENT TESTA 19 is involved in the accumulation of both anthocyanins and proanthocyanidins in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 37, 104–114.
- Klein, M., Burla, B. and Martinoia, E.** (2006) The multidrug resistance-associated protein (MRP/ABCC) subfamily of ATP-binding cassette transporters in plants. *FEBS letters*, 580, 1112–1122.
- Kluger, B., Bueschl, C., Lemmens, M., Berthiller, F., Häubl, G., Jaunecker, G., Adam, G., Krska, R. and Schuhmacher, R.** (2012) Stable isotopic labelling-assisted untargeted metabolic profiling reveals novel conjugates of the mycotoxin deoxynivalenol in wheat. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 405, 5031–5036.
- Kobayashi, S., Kidou, S. and Ejiri, S.** (2001) Detection and Characterization of Glutathione S-Transferase Activity in Rice EF-1 $\beta\beta'$  and EF-1 $\gamma$  Expressed in *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 288, 509–514.

- Kolm, R.H., Danielson, U.H., Zhang, Y., Talalay, P. and Mannervik, B.** (1995) Isothiocyanates as substrates for human glutathione transferases: structure-activity studies. *The Biochemical journal*, 311 (Pt 2), 453–459.
- Koonin, E.V., Mushegian, A.R., Tatusov, R.L., Altschul, S.F., Bryant, S.H., Bork, P. and Valencia, A.** (1994) Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma contains a glutathione transferase domain—study of a diverse, ancient protein superfamily using motif search and structural modeling. *Protein science : a publication of the Protein Society*, 3, 2045–2054.
- Kraehmer, H., Laber, B., Rosinger, C. and Schulz, A.** (2014) Herbicides as weed control agents: state of the art: I. Weed control research and safener technology: the path to modern agriculture. *PLANT PHYSIOLOGY*, 166, 1119–1131.
- Kraehmer, H., van Almsick, A., Beffa, R., Dietrich, H., Eckes, P., Hacker, E., Hain, R., Streck, H.J., Stuebler, H. and Willms, L.** (2014) Herbicides as weed control agents: state of the art: II. Recent achievements. *PLANT PHYSIOLOGY*, 166, 1132–1148.
- Krajewski, M.** (2012) *Charakterisierung der Proteinfamilie der Glutathion-S-Transferasen aus Arabidopsis thaliana in Saccharomyces cerevisiae*, Dissertation, Technische Universität München.
- Krajewski, M.P., Kanawati, B., Fekete, A., Kowalski, N., Schmitt-Kopplin, P. and Grill, E.** (2013) Analysis of Arabidopsis glutathione-transferases in yeast. *Phytochemistry*, 91, 198–207.
- Kreuz, K., Gaudin, J., Stingelin, J. and Ebert, E.** (1991) Metabolism of the aryloxyphenoxypropanoate herbicide, CGA 184927, in wheat, barley and maize: differential effects of the safener, CGA 185072. *Zeitschrift für Naturforschung*, 46, 901–905.
- Krueger, S., Giavalisco, P., Krall, L., Steinhauser, M.-C., Büssis, D., Usadel, B., Flügge, U.-I., Fernie, A.R., Willmitzer, L. and Steinhauser, D.** (2011) A Topological Map of the Compartmentalized Arabidopsis thaliana Leaf Metabolome. *PLoS ONE*, 6, e17806 EP -.
- Kueger, S., Steinhauser, D., Willmitzer, L. and Giavalisco, P.** (2012) High-resolution plant metabolomics: from mass spectral features to metabolites and from whole-cell analysis to subcellular metabolite distributions. *The Plant Journal*, 70, 39–50.
- Kurtovic, S., Modén, O., Shokeer, A. and Mannervik, B.** (2008) Structural Determinants of Glutathione Transferases with Azathioprine Activity Identified by DNA Shuffling of Alpha Class Members. *Journal of molecular biology*, 375, 1365–1379.
- Kurtovic, S., Shokeer, A. and Mannervik, B.** (2008) Emergence of Novel Enzyme Quasi-Species Depends on the Substrate Matrix. *Journal of molecular biology*, 382, 136–153.
- Labrou, N.E., Karavangeli, M., Tsaftaris, A. and Clonis, Y.D.** (2005) Kinetic analysis of maize glutathione S-transferase I catalysing the detoxification from chloroacetanilide herbicides. *Planta*, 222, 91–97.
- Labrou, N.E., Kotzia, G.A. and Clonis, Y.D.** (2004) Engineering the xenobiotic substrate specificity of maize glutathione S-transferase I. *Protein Engineering Design and Selection*, 17, 741–748.
- Labrou, N.E., Mello, L.V. and Clonis, Y.D.** (2001) Functional and structural roles of the glutathione-binding residues in maize (*Zea mays*) glutathione S-transferase I. *Biochem. J.*, 358, 101–110.
- Labrou, N.E., Papageorgiou, A.C., Pavli, O. and Flemetakis, E.** (2015) Plant GSTome: structure and functional role in xenome network and plant stress response. *Current opinion in biotechnology*, 32C, 186–194.
- Laemmli, U.K.** (1970) Most commonly used discontinuous buffer system for SDS electrophoresis. *Nature*, 227, 680–685.
- Lafaye, A., Junot, C., Pereira, Y., Lagniel, G., Tabet, J.-C., Ezan, E. and Labarre, J.** (2005) Combined proteome and metabolite-profiling analyses reveal surprising insights into yeast sulfur metabolism. *J. Biol. Chem.*, 280, 24723–24730.
- Lallement, P.-A., Brouwer, B., Keech, O., Hecker, A. and Rouhier, N.** (2014) The still mysterious roles of cysteine-containing glutathione transferases in plants. *Frontiers in pharmacology*, 5, 192.
- Lallement, P.-A., Meux, E., Gualberto, J.M., Prosper, P., Didierjean, C., Saul, F., Haouz, A., Rouhier, N. and Hecker, A.** (2014) Structural and enzymatic insights into Lambda glutathione transferases from *Populus trichocarpa*, monomeric enzymes constituting an early divergent class specific to terrestrial plants. *Biochemical Journal*, 462, 39–52.
- Lam, L.K., Zhang, Z., Board, P.G. and Xun, L.** (2012) Reduction of Benzoquinones to Hydroquinones via Spontaneous Reaction with Glutathione and Enzymatic Reaction by S-Glutathionyl-Hydroquinone Reductases. *Biochemistry*, 51, 5014–5021.

- Lamoureux, G.L. and Rusness, D.G.** (1980) In vitro metabolism of pentachloronitrobenzene to pentachloromethylthiobenzene by onion: Characterization of glutathione S-transferase, cysteine C-S lyase, and S-adenosylmethionine methyl transferase activities. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 14, 50–61.
- Lamoureux, G.L. and Rusness, D.G.** (1987) EPTC metabolism in corn, cotton, and soybean: identification of a novel metabolite derived from the metabolism of a glutathione conjugate. *J. Agric. Food Chem.*, 35, 1–7.
- Lamoureux, G.L. and Rusness, D.G.** (1989) Propachlor metabolism in soybean plants, excised soybean tissues, and soil. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 34, 187–204.
- Lamoureux, G.L., Shimabukuro, R., Swanson, H. and Frear, D.S.** (1970) Metabolism of 2-chloro-4-ethylamino-6-isopropylamino-s-triazine (atrazine) in excised sorghum leaf sections. *J. Agric. Food Chem.*, 18, 81–86.
- Lamoureux, G.L., Stafford, L.E., Shimabukuro, R.H. and Zaylskie, R.G.** (1973) Atrazine metabolism in sorghum. Catabolism of the glutathione conjugate of atrazine. *J. Agric. Food Chem.*, 21, 1020–1030.
- Lan, T., Wang, X.-R. and Zeng, Q.-Y.** (2013) Structural and Functional Evolution of Positively Selected Sites in Pine Glutathione S-Transferase Enzyme Family. *Journal of Biological Chemistry*, 288, 24441–24451.
- Lan, T., Yang, Z.-L., Yang, X., Liu, Y.-J., Wang, X.-R. and Zeng, Q.-Y.** (2009) Extensive functional diversification of the *Populus* glutathione S-transferase supergene family. *The Plant cell*, 21, 3749–3766.
- Larson, R.A.** (1988) The antioxidants of higher plants. *Phytochemistry*, 27, 969–978.
- Leah, J.M., Worrall, T.L. and Cobb, A.H.** (1992) Isolation and characterisation of two glucosyltransferases from Glycine max associated with bentazone metabolism. *Pesticide science*, 34, 81–87.
- Leavitt, J.R.C. and Penner, D.** (1979) In vitro conjugation of glutathione and other thiols with acetanilide herbicides and EPTC sulfoxide and the action of the herbicide antidote R-25788. *J. Agric. Food Chem.*, 27, 533–536.
- LeBaron, H.M., McFarland, J.E. and Burnside, O., eds.** (2008) *The triazine herbicides. 50 years revolutionizing agriculture*. Amsterdam, London: Elsevier.
- Lee, J.-J., Jo, H.-J. and Kong, K.-H.** (2011) A Plant-specific Tau Class Glutathione S-transferase from *Oryza sativa* Having Significant Detoxification Activity Towards Chloroacetanilide Herbicides. *Bulletin of the Korean Chemical Society*, 32, 3756–3759.
- Li, Z.-S., Alfenito, M., Rea, P.A., Walbot, V. and Dixon, R.A.** (1997) Vacuolar uptake of the phytoalexin medicarpin by the glutathione conjugate pump. *The International Journal of Plant Biochemistry and Molecular Biology*, 45, 689–693.
- Li, X., Gao, P., Cui, D., Wu, L., Parkin, I., Saberianfar, R., Menassa, R., Pan, H., Westcott, N., and Gruber, M.Y.** (2011) The Arabidopsis tt19-4 mutant differentially accumulates proanthocyanidin and anthocyanin through a 3' amino acid substitution in glutathione S-transferase. *Plant, Cell & Environment*, 34, 374–388.
- Liao, S., Ewing, N.P., Boucher, B., Materne, O. and Brummel, C.L.** (2012) High-throughput screening for glutathione conjugates using stable-isotope labeling and negative electrospray ionization precursor-ion mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 26, 659–669.
- Lim, H.-K., Chen, J., Cook, K., Sensenhauser, C., Silva, J. and Evans, D.C.** (2008) A generic method to detect electrophilic intermediates using isotopic pattern triggered data-dependent high-resolution accurate mass spectrometry. *Rapid communications in mass spectrometry : RCM*, 22, 1295–1311.
- Liu, H.-J., Tang, Z.-X., Han, X.-M., Yang, Z.-L., Zhang, F.-M., Yang, H.-L., Liu, Y.-J. and Zeng, Q.-Y.** (2015) Divergence in Enzymatic Activities in the Soybean GST Supergene Family Provides New Insight into the Evolutionary Dynamics of Whole-Genome Duplicates. *Molecular Biology and Evolution*, 32, 2844–2859.
- Liu, J., Brazier-Hicks, M. and Edwards, R.** (2009) A kinetic model for the metabolism of the herbicide safener fenclorim in *Arabidopsis thaliana*. *Biophys. Chem.*, 143, 85–94.
- Liu, Y.-J., Han, X.-M., Ren, L.-L., Yang, H.-L. and Zeng, Q.-Y.** (2013) Functional divergence of the glutathione S-transferase supergene family in *Physcomitrella patens* reveals complex patterns of large gene family evolution in land plants. *PLANT PHYSIOLOGY*, 161, 773–786.
- Lo Cicero, L., Madesis, P., Tsaftaris, A. and Lo Piero, A.R.** (2015) Tobacco plants over-expressing the sweet orange tau glutathione transferases (CsGSTUs) acquire tolerance to the diphenyl ether herbicide fluorodifen and to salt and drought stresses. *Phytochemistry*, 116, 69–77.
- Loutre, C., Dixon, D.P., Brazier, M., Slater, M., Cole, D.J. and Edwards, R.** (2003) Isolation of a glucosyltransferase from *Arabidopsis thaliana* active in the metabolism of the persistent pollutant 3,4-dichloroaniline. *The Plant Journal*, 34, 485–493.

- Loyall, L., Uchida, K., Braun, S., Furuya, M. and Frohnmeyer, H. (2000) Glutathione and a UV Light-Induced Glutathione S-Transferase Are Involved in Signaling to Chalcone Synthase in Cell Cultures. *THE PLANT CELL ONLINE*, 12, 1939–1950.
- Madalinski, G., Godat, E., Alves, S., Lesage, D., Genin, E., Levi, P., Labarre, J., Tabet, J.-C., Ezan, E. and Junot, C. (2008) Direct introduction of biological samples into a LTQ-Orbitrap hybrid mass spectrometer as a tool for fast metabolome analysis. *Analytical chemistry*, 80, 3291–3303.
- Marrs, K.A. (1996) THE FUNCTIONS AND REGULATION OF GLUTATHIONE S-TRANSFERASES IN PLANTS. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47, 127–158.
- Martinoia, E., Grill, E., Tommasini, R., Kreuz, K. and Amrhein, N. (1993) ATP-dependent glutathione S-conjugate 'export' pump in the vacuolar membrane of plants. *Nature*, 364, 247–249.
- Mashiyama, S.T., Malabanan, M.M., Akiva, E., Bhosle, R., Branch, M.C., Hillerich, B., Jagessar, K., Kim, J., Patskovsky, Y., Seidel, R.D., Stead, M., Toro, R., Vetting, M.W., Almo, S.C., Armstrong, R.N. and Babbitt, P.C. (2014) Large-scale determination of sequence, structure, and function relationships in cytosolic glutathione transferases across the biosphere. *PLoS biology*, 12, e1001843.
- Maxwell, K. and Johnson, G.N. (2000) Chlorophyll fluorescence—a practical guide. *Journal of experimental botany*, 51, 659–668.
- McGonigle, B., Keeler, S.J., Lau, S.M., Koeppe, M.K. and O'Keefe, D.P. (2000) A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize. *PLANT PHYSIOLOGY*, 124, 1105–1120.
- Menendez, J. and Prado, R. de (1996) Diclofop-methyl Cross-Resistance in a Chlorotoluron-Resistant Biotype of *Alopecurus myosuroides*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 56, 123–133.
- Miller, K.D., Irzyk, G.P., Fuerst, E.P., McFarland, J.E., Barringer, M., Cruz, S., Eberle, W.J. and Förty, W. (1996) Identification of Metabolites of the Herbicide Safener Benoxacor Isolated from Suspension-Cultured Zea mays Cells 3 and 24 h after Treatment †. *J. Agric. Food Chem.*, 44, 3335–3341.
- Milligan, A., Daly, A., Parry, M., Lazzeri, P. and Jepson, I. (2001) The expression of a maize glutathione S-transferase gene in transgenic wheat confers herbicide tolerance, both in planta and in vitro. *Molecular Breeding*, 7, 301–315.
- Mitsutake, K., Iwamura, H., Shimizu, R. and Fujita, T. (1986) Quantitative structure-activity relationship of photosystem II inhibitors in chloroplasts and its link to herbicidal action. *J. Agric. Food Chem.*, 34, 725–732.
- Mittler, R., Vanderauwera, S., Suzuki, N., Miller, G., Tognetti, V.B., Vandepoele, K., Gollery, M., Shulaev, V. and van Breusegem, F. (2011) ROS signaling: the new wave? *Trends in plant science*, 16, 300–309.
- Moridani, M.Y., Scobie, H., Jamshidzadeh, A., Salehi, P. and O'Brien, P.J. (2001) Caffeic Acid, Chlorogenic Acid, and Dihydrocaffeic Acid Metabolism: Glutathione Conjugate Formation. *Drug Metabolism and Disposition*, 29, 1432–1439.
- Mougous, J.D., Leavell, M.D., Senaratne, R.H., Leigh, C.D., Williams, S.J., Riley, L.W., Leary, J.A. and Bertozzi, C.R. (2002) Discovery of sulfated metabolites in mycobacteria with a genetic and mass spectrometric approach. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 17037–17042.
- Mueller, S., Hilbert, B., Dueckershoff, K., Roitsch, T., Krischke, M., Mueller, M.J. and Berger, S. (2008) General Detoxification and Stress Responses Are Mediated by Oxidized Lipids through TGA Transcription Factors in Arabidopsis. *THE PLANT CELL ONLINE*, 20, 768–785.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497.
- Nafisi, M., Goregaoker, S., Botanga, C.J., Glawischning, E., Olsen, C.E., Halkier, B.A. and Glazebrook, J. (2007) Arabidopsis Cytochrome P450 Monooxygenase 71A13 Catalyzes the Conversion of Indole-3-Acetaldoxime in Camalexin Synthesis. *The Plant cell*, 19, 2039–2052.
- Nakabayashi, R. and Saito, K. (2015) Integrated metabolomics for abiotic stress responses in plants. *Current opinion in plant biology*, 24, 10–16.
- Naoumkina, M.A., ZHAO, Q., Gallego-Giraldo, L., DAI, X., Zhai, P.X. and Dixon, R.A. (2010) Genome-wide analysis of phenylpropanoid defence pathways. *Molecular Plant Pathology*, 11, 829–846.
- Neuefeind, T., Huber, R., Dasenbrock, H., Prade, L. and Bieseler, B. (1997) Crystal structure of herbicide-detoxifying maize glutathione S-transferase-I in complex with lactoylglutathione: evidence for an induced-fit mechanism. *Journal of molecular biology*, 274, 446–453.
- Neve, P. and Powles, S. (2005) High survival frequencies at low herbicide use rates in populations of *Lolium rigidum* result in rapid evolution of herbicide resistance. *Heredity*, 95, 485–492.

- Nikolskiy, I., Mahieu, N.G., Chen, Y.-J., Tautenhahn, R. and Patti, G.J.** (2013) An untargeted metabolomic workflow to improve structural characterization of metabolites. *Analytical chemistry*, 85, 7713–7719.
- Nilsson, L.O., Edalat, M., Pettersson, P.L. and Mannervik, B.** (2002) Aromatic residues in the C-terminal region of glutathione transferase A1-1 influence rate-determining steps in the catalytic mechanism. *Biochimica et biophysica acta*, 1598, 199–205.
- Nilsson, L.O., Gustafsson, A. and Mannervik, B.** (2000) Redesign of substrate-selectivity determining modules of glutathione transferase A1-1 installs high catalytic efficiency with toxic alkenal products of lipid peroxidation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97, 9408–9412.
- Norrgård, M.A. and Mannervik, B.** (2011) Engineering GST M2-2 for High Activity with Indene 1,2-Oxide and Indication of an H-Site Residue Sustaining Catalytic Promiscuity. *Journal of molecular biology*, 412, 111–120.
- Obayashi, T. and Kinoshita, K.** (2010) Coexpression landscape in ATTED-II: usage of gene list and gene network for various types of pathways. *J. Plant Res.*, 123, 311–319.
- O’connell, K.M., Breaux, E.J. and Fraley, R.T.** (1988) Different rates of metabolism of two chloroacetanilide herbicides in pioneer 3320 corn. *Plant Physiol.*, 86, 359–363.
- Odell, J.T., Nagy, F. and Chua, N.-H.** (1985) Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313, 810–812.
- Ohkama-Ohtsu, N., Radwan, S., Peterson, A., Zhao, P., Badr, A.F., Xiang, C. and Oliver, D.J.** (2007) Characterization of the extracellular  $\gamma$ -glutamyl transpeptidases, GGT1 and GGT2, in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 49, 865–877.
- Ohkama-Ohtsu, N., Zhao, P., Xiang, C. and Oliver, D.J.** (2007) Glutathione conjugates in the vacuole are degraded by  $\gamma$ -glutamyl transpeptidase GGT3 in Arabidopsis. *The Plant Journal*, 49, 878–888.
- Oikawa, A., Nakamura, Y., Ogura, T., Kimura, A., Suzuki, H., Sakurai, N., Shinbo, Y., Shibata, D., Kanaya, S. and Ohta, D.** (2006) Clarification of pathway-specific inhibition by Fourier transform ion cyclotron resonance/mass spectrometry-based metabolic phenotyping studies. *PLANT PHYSIOLOGY*, 142, 398–413.
- Paquette, S., Møller, B.L. and Bak, S.** (2003) On the origin of family 1 plant glycosyltransferases. *Phytochemistry*, 62, 399–413.
- Pettersson, P.L., Johansson, A.-S. and Mannervik, B.** (2002) Transmutation of Human Glutathione Transferase A2-2 with Peroxidase Activity into an Efficient Steroid Isomerase. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 30019–30022.
- Plaisance, K.L. and Gronwald, J.W.** (1999) Enhanced Catalytic Constant for Glutathione-S-Transferase (Atrazine) Activity in an Atrazine-Resistant Abutilon theophrasti Biotype. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 63, 34–49.
- Pompon, D., Gautier, J.C., Perret, A., Truan, G. and Urban, P.** (1997) Simulation of human xenobiotic metabolism in microorganisms. Yeast a good compromise between E. coli and human cells. *Journal of hepatology*, 26 Suppl 2, 81–85.
- Pourcel, L., Routaboul, J.-M., Cheynier, V., Lepiniec, L. and Debeaujon, I.** (2007) Flavonoid oxidation in plants: from biochemical properties to physiological functions. *Trends in plant science*, 12, 29–36.
- Powles, S.B. and Yu, Q.** (2010) Evolution in action: plants resistant to herbicides. *Annual review of plant biology*, 61, 317–347.
- Prade, L., Huber, R. and Bieseler, B.** (1998) Structures of herbicides in complex with their detoxifying enzyme glutathione S-transferase - explanations for the selectivity of the enzyme in plants. *Structure*, 6, 1445–1452.
- Preston, C., Tardif, F.J., Christopher, J.T. and Powles, S.B.** (1996) Multiple Resistance to Dissimilar Herbicide Chemistries in a Biotype of *Lolium rigidum* Due to Enhanced Activity of Several Herbicide Degrading Enzymes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 54, 123–134.
- Qi, Y. and O’Connor, P.B.** (2014) Data processing in Fourier transform ion cyclotron resonance mass spectrometry. *Mass Spec Rev*, 33, 333–352.
- Rausher, M.D.** (2006) The Evolution of Flavonoids and Their Genes. In *The Science of Flavonoids* (Grotewold, E., ed). New York, NY: Springer New York, pp. 175–211.
- Raveton, M., Ravel, P., Kaouadji, M., Bastide, J. and Tissut, M.** (1997) The Chemical Transformation of Atrazine in Corn Seedlings. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 58, 199–208.
- Reemtsma, T., Alder, L. and Banasiak, U.** (2013) A multimethod for the determination of 150 pesticide metabolites in surface water and groundwater using direct injection liquid chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1271, 95–104.

- Reinemer, P., Dirr, H.W., Ladenstein, R., Schäffer, J., Gallay, O. and Huber, R. (1991) The three-dimensional structure of class pi glutathione S-transferase in complex with glutathione sulfonate at 2.3 Å resolution. *The EMBO Journal*, 10, 1997–2005.
- Reinemer, P., Prade, L., Hof, P., Neufeind, T., Huber, R., Zettl, R., Palme, K., Schell, J., Koelln, I., Bartunik, H.D. and Bieseler, B. (1996) Three-dimensional structure of glutathione S-transferase from *Arabidopsis thaliana* at 2.2 Å resolution: Structural characterization of herbicide-conjugating plant glutathione S-transferases and a novel active site architecture. *Journal of Molecular Biology*, 255, 289–309.
- Ro, D.-K. and Douglas, C.J. (2004) Reconstitution of the Entry Point of Plant Phenylpropanoid Metabolism in Yeast (*Saccharomyces cerevisiae*): IMPLICATIONS FOR CONTROL OF METABOLIC FLUX INTO THE PHENYLPROPANOID PATHWAY. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 2600–2607.
- Robineau, T., Batard, Y., Nedelkina, S., Cabello-Hurtado, F., LeRet, M., Sorokine, O., Didierjean, L. and Werck-Reichhart, D. (1998) The Chemically Inducible Plant Cytochrome P450 CYP76B1 Actively Metabolizes Phenylureas and Other Xenobiotics. *PLANT PHYSIOLOGY*, 118, 1049–1056.
- Romanos, M.A., Scorer, C.A. and Clare, J.J. (1992) Foreign gene expression in yeast: a review. *Yeast*, 8, 423–488.
- Rosman, K.J.R. and Taylor, P.D.P. (1998) Isotopic Compositions of the Elements 1997. *Journal of Physical and Chemical Reference Data*, 27, 1275–1287.
- Rossini, L., Frova, C., Pè, M.E., Mizzi, L. and Gorla, M.S. (1998) Alachlor Regulation of Maize Glutathione S-Transferase Genes. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 60, 205–211.
- Rossini, L., Jepson, I., Greenland, A.J. and Gorla, M.S. (1996) Characterization of Glutathione S-Transferase Isoforms in Three Maize Inbred Lines Exhibiting Differential Sensitivity to Alachlor. *Plant Physiol.*, 112, 1595–1600.
- Roxas, V.P., Lodhi, S.A., Garrett, D.K., Mahan, J.R. and Allen, R.D. (2000) Stress Tolerance in Transgenic Tobacco Seedlings that Overexpress Glutathione S-Transferase/Glutathione Peroxidase. *Plant and Cell Physiology*, 41, 1229–1234.
- Rozema, J., van de Staaij, J., Björn, L.O. and Caldwell, M. (1997) UV-B as an environmental factor in plant life: stress and regulation. *Trends in Ecology & Evolution*, 12, 22–28.
- Ryan, G. F. (1970) Resistance of Common Groundsel to Simazine and Atrazine. *Weed Science*, 18, 614–616.
- Saari, L.L., Cotterman, J.C., Smith, W.F. and Primiani, M.M. (1992) Sulfonylurea herbicide resistance in common chickweed, perennial ryegrass, and Russian thistle. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 42, 110–118.
- Sá-Correia, I., dos Santos, Sandra C, Teixeira, M.C., Cabrito, T.R. and Mira, N.P. (2009) Drug:H<sup>+</sup> antiporters in chemical stress response in yeast. *Trends in microbiology*, 17, 22–31.
- Saito, K., Yonekura-Sakakibara, K., Nakabayashi, R., Higashi, Y., Yamazaki, M., Tohge, T. and Fernie, A.R. (2013) The flavonoid biosynthetic pathway in *Arabidopsis*: Structural and genetic diversity. *Plant Phenolics: biosynthesis, genetics, and ecophysiology*, 72, 21–34.
- Sakihama, Y., Cohen, M.F., Grace, S.C. and Yamasaki, H. (2002) Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities: phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. *Toxicology*, 177, 67–80.
- Sánchez-Fernández, R., Davies, T. G. Emyr, Coleman, Julian O. D. and Rea, P.A. (2001) The *Arabidopsis thaliana* ABC Protein Superfamily, a Complete Inventory. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 30231–30244.
- Sappl, P.G., Carroll, A.J., Clifton, R., Lister, R., Whelan, J., Harvey Millar, A. and Singh, K.B. (2009) The *Arabidopsis* glutathione transferase gene family displays complex stress regulation and co-silencing multiple genes results in altered metabolic sensitivity to oxidative stress. *The Plant journal : for cell and molecular biology*, 58, 53–68.
- Scarponi, L., Perucci, P. and Martientti, L. (1991) Conjugation of 2-chloroacetanilide herbicides with glutathione: role of molecular structures and of glutathione S-transferase enzymes. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 2010–2013.
- Schultz, T.W., Yarbrough, J.W., Hunter, R.S. and Aptula, A.O. (2007) Verification of the Structural Alerts for Michael Acceptors. *Chem. Res. Toxicol.*, 20, 1359–1363.
- Schulz, B. and Kolukisaoglu, H.U. (2006) Genomics of plant ABC transporters: the alphabet of photosynthetic life forms or just holes in membranes? *FEBS letters*, 580, 1010–1016.
- Schwöbel, Johannes A H, Koleva, Y.K., Enoch, S.J., Bajot, F., Hewitt, M., Madden, J.C., Roberts, D.W., Schultz, T.W. and Cronin, Mark T D (2011) Measurement and estimation of electrophilic reactivity for predictive toxicology. *Chemical reviews*, 111, 2562–2596.
- Seitz, T., Hoffmann, M.G. and Krähmer, H. (2003) Herbicide für die Landwirtschaft: Chemische Unkrautbekämpfung. *Chemie in unserer Zeit*, 37, 112–126.

- Seo J. and Shneiderman, B.** (2004) A Rank-by-Feature Framework for Unsupervised Multidimensional Data Exploration Using Low Dimensional Projections. *Information Visualization, 2004. INFOVIS 2004. IEEE Symposium on*, 65–72.
- Sharma, R., Sahoo, A., Devendran, R. and Jain, M.** (2014) Over-expression of a rice tau class glutathione s-transferase gene improves tolerance to salinity and oxidative stresses in Arabidopsis. *PLoS ONE*, 9, e92900.
- Shimabukuro, R.H., Frear, D.S., Swanson, H.R. and Walsh, W.C.** (1971) Glutathione conjugation. An enzymatic basis for atrazine resistance in corn. *Plant Physiol.*, 47, 10–14.
- Shimabukuro, R.H., Kadunce, R.E. and Frear, D.S.** (1966) Dealkylation of Atrazine in Mature Pea Plants. *J. Agric. Food Chem.*, 14, 392–395.
- Shimabukuro, R.H., Swanson, H.R. and Walsh, W.C.** (1970) Glutathione conjugation: atrazine detoxication mechanism in corn. *PLANT PHYSIOLOGY*, 46, 103–107.
- Siminszky, B.** (2006) Plant cytochrome P450-mediated herbicide metabolism. *Phytochem Rev*, 5, 445–458.
- Siminszky, B., Corbin, F.T., Ward, E.R., Fleischmann, T.J. and Dewey, R.E.** (1999) Expression of a Soybean Cytochrome P450 Monooxygenase cDNA in Yeast and Tobacco Enhances the Metabolism of Phenylurea Herbicides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 96, 1750–1755.
- Sinning, I., Kleywegt, G.J., Cowan, S.W., Reinemer, P., Dirr, H.W., Huber, R., Gilliland, G.L., Armstrong, R.N., Ji, X., Board, P.G., Olin, B., Mannervik, B. and Jones, T.** (1993) Structure Determination and Refinement of Human Alpha Class Glutathione Transferase A1-1, and a Comparison with the Mu and Pi Class Enzymes. *Journal of molecular biology*, 232, 192–212.
- Skopelitou, K., Muleta, A.W., Papageorgiou, A.C., Chronopoulou, E. and Labrou, N.E.** (2015) Catalytic features and crystal structure of a tau class glutathione transferase from Glycine max specifically upregulated in response to soybean mosaic virus infections. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*, 1854, 166–177.
- Smith, A.P., DeRidder, B.P., Guo, W.-J., Seeley, E.H., Regnier, F.E. and Goldsbrough, P.B.** (2004) Proteomic Analysis of Arabidopsis Glutathione S-transferases from Benoxacor- and Copper-treated Seedlings. *Journal of Biological Chemistry*, 279, 26098–26104.
- Smith, A.P., Nourizadeh, S.D., Peer, W.A., Xu, J., Bandyopadhyay, A., Murphy, A.S. and Goldsbrough, P.B.** (2003) Arabidopsis AtGSTF2 is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids. *The Plant Journal*, 36, 433–442.
- Sommer, A. and Böger, P.** (1999) Characterization of Recombinant Corn GlutathioneS-Transferase Isoforms I, II, III, and IV. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 63, 127–138.
- Sønderby, I.E., Geu-Flores, F. and Halkier, B.A.** (2010) Biosynthesis of glucosinolates – gene discovery and beyond. *Trends in plant science*, 15, 283–290.
- Su, T., Xu, J., Li, Y., Lei, L., Zhao, L., Yang, H., Feng, J., Liu, G. and Ren, D.** (2011) Glutathione-indole-3-acetonitrile is required for camalexin biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell*, 23, 364–380.
- Sun, Y., Li, H. and Huang, J.-R.** (2012) Arabidopsis TT19 Functions as a Carrier to Transport Anthocyanin from the Cytosol to Tonoplasts. *Molecular Plant*, 5, 387–400.
- Tanaka, Y., Higashi, T., Rakwal, R., Wakida, S.-i. and Iwahashi, H.** (2007) Quantitative analysis of sulfur-related metabolites during cadmium stress response in yeast by capillary electrophoresis-mass spectrometry. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 44, 608–613.
- Theilin, G.P. and Stone, W.W.** (2013) *Estimation of annual agricultural pesticide use for counties of the conterminous United States, 1992–2009. U.S. Geological Survey Scientific Investigations Report.*
- Thom, R., Cummins, I., Dixon, D.P., Edwards, R., Cole, D.J. and Laphorn, A.J.** (2002) Structure of a Tau Class Glutathione S- Transferase from Wheat Active in Herbicide Detoxification †,‡. *Biochemistry*, 41, 7008–7020.
- Timmerman, K.P.** (1989) Molecular characterization of corn glutathione S-transferase isozymes involved in herbicide detoxication. *Physiologia Plantarum*, 77, 465–471.
- Tohge, T., Ramos, M.S., Nunes-Nesi, A., Mutwil, M., Giavalisco, P., Steinhauser, D., Schellenberg, M., Willmitzer, L., Persson, S., Martinoia, E. and Fernie, A.R.** (2011) Toward the Storage Metabolome: Profiling the Barley Vacuole. *PLANT PHYSIOLOGY*, 157, 1469–1482.
- Tohge, T., Souza, L.P. de and Fernie, A.R.** (2014) Genome-enabled plant metabolomics. *Metabolomics II*, 966, 7–20.
- Torres, M.A., Jones, J.D. and Dangl, J.L.** (2006) Reactive Oxygen Species Signaling in Response to Pathogens. *PLANT PHYSIOLOGY*, 141, 373–378.

- Trenkamp, S., Martin, W. and Tietjen, K.** (2004) Specific and differential inhibition of very-long-chain fatty acid elongases from *Arabidopsis thaliana* by different herbicides. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 11903–11908.
- Tu, B.P., Mohler, R.E., Liu, J.C., Dombek, K.M., Young, E.T., Synovec, R.E. and McKnight, S.L.** (2007) Cyclic changes in metabolic state during the life of a yeast cell. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104, 16886–16891.
- van Leeuwen, J.S., Vredenburg, G., Dragovic, S., Tjong, T F Jennifer, Vos, J.C. and Vermeulen, Nico P E** (2011) Metabolism related toxicity of diclofenac in yeast as model system. *Toxicology letters*, 200, 162–168.
- van Zanden, J.J., Ben Hamman, O., van Iersel, M.L., Boeren, S., Cnubben, N.H., Lo Bello, M., Vervoort, J., van Bladeren, P.J. and Rietjens, I.M.** (2003) Inhibition of human glutathione S-transferase P1-1 by the flavonoid quercetin. *Chemico-Biological Interactions*, 145, 139–148.
- VanGessel, M.J.** (2001) Glyphosate-resistant horseweed from Delaware. *Weed Science*, 49, 703–705.
- Verpoorte, R., van der Heijden, R., Hoopen, H. ten and Memelink, J.** (1999) Metabolic engineering of plant secondary metabolite pathways for the production of fine chemicals. *Biotechnology Letters*, 21, 467–479.
- Villas-Bôas, S.G., Mas, S., Akesson, M., Smedsgaard, J. and Nielsen, J.** (2005) Mass spectrometry in metabolome analysis. *Mass spectrometry reviews*, 24, 613–646.
- Vollenweider, S., Weber, H., Stolz, S., Chételat, A. and Farmer, E.E.** (2000) Fatty acid ketodienes and fatty acid ketotrienes: Michael addition acceptors that accumulate in wounded and diseased *Arabidopsis* leaves. *The Plant Journal*, 24, 467–476.
- Vredenburg, G., Vassell, Kadene P T, Commandeur, Jan N M, Vermeulen, Nico P E and Vos, J.C.** (2013) Reconstitution of the interplay between cytochrome P450 and human glutathione S-transferases in clozapine metabolism in yeast. *Toxicology letters*, 222, 247–256.
- Wagner, U., Edwards, R., Dixon, D.P. and Mauch, F.** (2002) Probing the Diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-Transferase Gene Family. *Plant Molecular Biology*, 49, 515–532.
- Wang, C.-L. and Yang, H.-L.** (2011) Conserved Residues in the Subunit Interface of tau Glutathione S-transferase Affect Catalytic and Structural Functions. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53, 35–43.
- Wang, W. and Ballatori, N.** (1998) Endogenous Glutathione Conjugates: Occurrence and Biological Functions. *Pharmacological Reviews*, 50, 335–356.
- Wen, B. and Fitch, W.L.** (2009) Analytical strategies for the screening and evaluation of chemically reactive drug metabolites. *Expert opinion on drug metabolism & toxicology*, 5, 39–55.
- Whitbread, A.K., Masoumi, A., Tetlow, N., Schmuck, E., Coggan, M. and Board, P.G.** (2005) Characterization of the omega class of glutathione transferases. *Methods in enzymology*, 401, 78–99.
- Wilson, I.D. and Nicholson, J.K.** (2003) Topics in Xenobiochemistry: do metabolic pathways exist for xenobiotics? The micro-metabolism hypothesis. *Xenobiotica; the fate of foreign compounds in biological systems*, 33, 887–901.
- Winayanuwattikun, P. and Ketterman, A.J.** (2005) An Electron-sharing Network Involved in the Catalytic Mechanism Is Functionally Conserved in Different Glutathione Transferase Classes. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 31776–31782.
- Windram, O., Madhou, P., McHattie, S., Hill, C., Hickman, R., Cooke, E., Jenkins, D.J., Penfold, C.A., Baxter, L., Breeze, E., Kiddle, S.J., Rhodes, J., Atwell, S., Kliebenstein, D.J., Kim, Y.S., Stegle, O., Borgwardt, K., Zhang, C., Tabrett, A., Legaie, R., Moore, J., Finkensadt, B., Wild, D.L., Mead, A., Rand, D., Beynon, J., Ott, S., Buchanan-Wollaston, V. and Denby, K.J.** (2012) *Arabidopsis* defense against *Botrytis cinerea*: chronology and regulation deciphered by high-resolution temporal transcriptomic analysis. *The Plant cell*, 24, 3530–3557.
- Windsor, B., Roux, S.J. and Lloyd, A.** (2003) Multiherbicide tolerance conferred by AtPgp1 and apyrase overexpression in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Biotech*, 21, 428–433.
- Wolf, A.E., Dietz, K.-J. and Schröder, P.** (1996) Degradation of glutathione S-conjugates by a carboxypeptidase in the plant vacuole. *FEBS letters*, 384, 31–34.
- Wünschmann, J., Krajewski, M., Letzel, T., Huber, E.M., Ehrmann, A., Grill, E. and Lenzian, K.J.** (2010) Dissection of glutathione conjugate turnover in yeast. *Phytochemistry*, 71, 54–61.
- Yuan, J.S., Tranel, P.J. and Stewart, C.N.** (2007) Non-target-site herbicide resistance: a family business. *Trends in plant science*, 12, 6–13.
- Yun, M.-S., Yogo, Y., Miura, R., Yamasue, Y. and Fischer, A.J.** (2005) Cytochrome P-450 monooxygenase activity in herbicide-resistant and -susceptible late watergrass (*Echinochloa phyllopogon*). *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 83, 107–114.

- Zeng, Q.-Y. and Wang, X.-R.** (2005) Catalytic properties of glutathione-binding residues in a tau class glutathione transferase (PtGSTU1) from *Pinus tabulaeformis*. *FEBS letters*, 579, 2657–2662.
- Zhang, H., Zhang, D., Ray, K. and Zhu, M.** (2009) Mass defect filter technique and its applications to drug metabolite identification by high-resolution mass spectrometry. *Journal of mass spectrometry : JMS*, 44, 999–1016.
- Zhang, J.J., Lu, Y.C. and Yang, H.** (2014) Chemical Modification and Degradation of Atrazine in *Medicago sativa* through Multiple Pathways. *J. Agric. Food Chem.*, 62, 9657–9668.
- Zhang, K. and Das, N.P.** (1994) Inhibitory effects of plant polyphenols on rat liver glutathione S-transferases. *Biochemical Pharmacology*, 47, 2063–2068.
- Zhao, J.** (2015) Flavonoid transport mechanisms: how to go, and with whom. *Trends in plant science*, 20, 576–585.
- Zhou, S., Chan, E., Duan, W., Huang, M. and Chen, Y.-Z.** (2005) Drug bioactivation, covalent binding to target proteins and toxicity relevance. *Drug Metabolism Reviews*, 37, 41–213.
- Zhu, M., Ma, L., Zhang, H. and Humphreys, W.G.** (2007) Detection and structural characterization of glutathione-trapped reactive metabolites using liquid chromatography-high-resolution mass spectrometry and mass defect filtering. *Analytical chemistry*, 79, 8333–8341.

## 6. Anhang

**Tabelle 6.1 In der vorliegenden Arbeit verwendete Primer.**

Aufgelistet wurden die, in einer PCR verwendeten, Primer mit ihrer Sequenz, dem Genlokus des Zielgens und einer, wenn nötig, kurzen Beschreibung, in welchem Rahmen sie eingesetzt wurden.

| Primer  | Sequenz (5'- 3')  | Genlokus  | Beschreibung  |
|---|---|-----------|---|
| <b>Generierung von Deletionsmutanten in <i>S. cerevisiae</i></b>      |   |           |   |
| cis2_lox_for  | AAGACAAGACAAAAAGTAGCGTACTAGACTTACAGTTATGcagctgaagcttctg<br>acgc | YLR299W   | genomische<br>Deletion von Genen<br>in <i>S. cerevisiae</i>       |
| cis2_lox_rev  | AACTATATTACAGTACCATTCTTACCCACATCTTAgcataggccactagtgatctg        |           |   |
| cpy_lox_for   | TTGTTTCTTTTCTACTCAACTTAAAGTATACATACGCTATGcagctgaagcttctg<br>cgc | YMR297W   |   |
| cpy_lox_rev   | AATAAAAACGGTATGCCTACACATACACGCTTTAgcataggccactagtgatctg         |           |   |
| CPC_loxP_for  | TTTAAAACAGCTATACAAAAAGTGATACCGACATACAATGcagctgaagcttctg<br>acgc | YBR139W   |   |
| CPC_loxP_rev  | GCAAGGTTAAGAGTGAAACATTTTTAGAGCACTACTAgcataggccactagtgat<br>ctg  |           |   |
| TEF4_del_for  | ACTCAATTCTTTGATTTTGGCCCTCGATAGATTCAAGATGCAGCTGAAGCTTC<br>GTACGC | YKL081W   |   |
| TEF4_del_rev  | TTGGGAAGAAAATATGGAAGAAGAGTTATTGAGATTAGCATAGGCCACTAG<br>TGGATCTG |           |   |
| URA_3'_for  | CAGACCGATCTTCTACCC  | YEL021W   | Überprüfen der<br>Insertion der<br>Deletionskassette<br>ins Genom |
| URA_5'_rev  | TTGGCTAATCATGACCCC  |           |   |
| LEU_5'_rev  | AGTTATCCTTGGATTTGG  | YCL018W   |   |
| LEU_3'_for  | ATCTCATGGATGATATCC  |           |   |
| cis2_chk_for  | ATGTGTGTGTGCGCCTGTGTGTA   | YLR299W   | Überprüfen der<br>erfolgreichen Gen-<br>Deletion                  |
| Cis2_Chk_rev  | CGCGCAGTATCAAGCCATCA  |           |   |
| CPC_Chk5_for  | CGGCGCTAGCATTCTACGAA  | YBR139W   |   |
| CPC_Chk3_rev  | CAGTTGTGAAGCCTCTGGAT  |           |   |
| CPY_Chk1_for  | GCGATGTTGGTCATCCAGTA  | YMR297W   |   |
| CPY_Chk6_rev  | TACGTAGCCAGGTTACCTT   |           |   |
| TEF4_chk_for  | CTCATTACACACCTTTGCCTCTATT                                       | YKL081W   |   |
| TEF4_chk_rev  | AATATTGTTAGAGTAACCGCAGCAG                                       |           |   |
| Grx1_chk_for  | TCATGCACAAGTGAGCTGTC  | YCL035C   |   |
| Grx1_chk_rev  | AGACGTACGAGAGCCTAAAG  |           |   |
| Grx2_chk_for  | GATCAAATGCCTCTCGGCAA  | YDR513W   |   |
| Grx2_chk_rev  | AGCAAATGGGGCAGATG   |           |   |
| Gtt1_chk_for  | GCCAAGGCTAGCCTAATA  | YIR038C   |   |
| Gtt1_chk_rev  | CAACTGAACTATGGCGTGAC  |           |   |
| Gtt2_chk_for  | GTGCGCGTGAAGTGTAGGAA  | YLL060C   |   |
| Gtt2_chk_rev  | CCGCGGCAATATCGATGCAA  |           |   |
| GTO1_chk_for  | CTTGGGTGAAGTTGAAGTTG  | YGR154C   |   |
| GTO1_chk_rev  | AAATCGAGAAAAGACAAATGC   |           |   |
| GTO2_chk_for  | CCATCTTTATTTACCTCTTC  | YKR076W   |   |
| GTO2_chk_rev  | ACAACAATTGAAGGTGATTGGTAAT                                       |           |   |
| GTO3_chk_for  | AATATACCGCCCCCTATATGTATGT                                       | YMR251W   |   |
| GTO3_chk_rev  | CCAGCACCATTTAGTCATAG  |           |   |
| <b>Integration von <i>MET15</i> in das <i>S. cerevisiae</i>-Genom</b> |   |           |   |
| MET15 gDNA for  | CCAACACTAAGAAATAATTTTCGCC                                       | YLR303W   | Amplifikation von<br><i>MET15</i>                                 |
| MET15 gDNA rev  | ATTAGCACGGTGCCTTAACCAA  |           |   |
| MET15 Chk BamHI<br>for  | gtgcgatccGTAGAATATACTAGAAGTT                                    |           |   |
| MET15 Chk Sall<br>rev   | gcgcgtcgacGGAGAAGTCAAGACTAT                                     |           | Nachweis der<br>Insertion von<br><i>MET15</i>                     |
| <b>Klonierung von GSTs</b>  |   |           |   |
| F5 BamHI for2   | gcgcgatccATGGGCATAAAC   | AT1G02940 |   |
| F5 Sall rev2  | gcgcgtcgacTTAATTCCTCTCTTA                                       |           |   |

|                        |                                   |                   |      |
|------------------------|-----------------------------------|-------------------|------|
| F7 BamHI for           | gcgcgatccATGGCAGGAAT              | AT1G02920         |      |
| F7 Sall rev            | gcgctcgacTTAAAGAACCTT             |                   |      |
| F12 BamHI for          | gcgcgatccATGGTTGTGAACTAT          | AT5G17220         |      |
| F12 Sall rev           | gcgctcgacTCAGTGACCAG              |                   |      |
| F13 BamHI for          | gtgcgatccATGGCGATGAAGC            | AT3G62760         |      |
| F13 Sall rev           | gcgctcgacTCAATTTGTGGTG            |                   |      |
| U9 BamHI for 2         | gcgcgatccATGGATGAAGAAGTTG         | AT3G62760         |      |
| U9 Sall rev 2          | gcgctcgacTTATGACTGATAAG           |                   |      |
| U20 BamHI for          | gtgcgatccATGGCGAACCTAC            | AT1G78370         |      |
| U20 Sall rev           | gcgctcgacTCAGAGATTGTTC            |                   |      |
| U28 BamHI for          | gcgcgatccATGGGAAAGAAAATAG         | AT1G53680         |      |
| U28 Sall rev           | gcgctcgacTCATTCAACACCAAAAAT       |                   |      |
| TCHQD BamHI for        | gcgcgatccATGCAGTTAT               | AT1G77290         |      |
| TCHQD Sall rev         | gcgctcgacTCAATATTTTCT             |                   |      |
| T3 Clal for            | gtgcatcgattATGAAGCTCAAAGTG        | AT5G41220         |      |
| T3 Sall rev            | gcgctcgacTTAGAGCATCTCATC          |                   |      |
| L2 BamHI for           | gtgcgatccATGAGTGTGGACTGA          | AT3G55040         |      |
| L2 Sall rev            | gcgctcgacTTAGAGACGTGCTTC          |                   |      |
| Z2 BamHI for           | gtgcgatccATGTCTTATGTTACCG         | AT2G02380         |      |
| Z2 Sall rev            | gcgctcgacTCAGATGGTGGAAAGG         |                   |      |
| MAPEG BamHI for        | gtgcgatccATGGCGCGATTACAGA         | AT1G65820         |      |
| MAPEG Sall rev         | gcgctcgacTCAAGCAAGGATCAGA         |                   |      |
| U21 for                | gcgcgatccATGGCAGCC                |                   |      |
| U21 Fus rev            | caaacatacaactgttcCTTCTTGTGATG     | AT1G78360         |      |
| U21 Fus for            | cgatttcatcgacaagaagGAACAGTTGTATG  |                   |      |
| U21 rev                | gcgctcgacTTACTCAATTCATA           |                   |      |
| T3 Fus rev             | cttagaatttcaaagGGGTACAACTACA      | AT5G41220         |      |
| T3 Fus for             | ggtgtagttgtaccCTTTGAAAATTCT       |                   |      |
| GST56 BamHI for        | tatcgatccATGGCTAGGTCTGGGGTTG      | AT5G45020         | GHR2 |
| GST56 Sall rev         | tagctcgacTCACGAGGAGAATCTGTC       |                   |      |
| GST57 BamHI for        | gcgcgatccATGTCTTATCCACGATC        | AT4G19880         | GHR1 |
| GST57 Sall rev         | gcgctcgacTCATTTGGAGAATCTGT        |                   |      |
| GST58 BamHI for        | gtacgatccATGGCCAATTGCTTCG         | AT5G44000         | GHR4 |
| GST58 Sall rev         | gcgctcgacTTAAACCGAAAGCTG          |                   |      |
| GST59 BamHI for        | gtacgatccATGGCTACACCAAT           | AT5G44990         | GHR3 |
| GST59 Sall rev         | gcgctcgac TTAAGAGAATCA            |                   |      |
| F2 BamHI for           | gtacgatccATGGCAGGTATCAAAGT        | AT4G02520         |      |
| F2 Sall rev            | gcgctcgacTCACTGAACCTTCTCG         |                   |      |
| ZmGSTI_BamHI_f<br>or   | gtatggatccATGGCTCCGATG            | GRMZM2G1162<br>73 |      |
| ZmGSTI_Sall_rev        | gcgctcgacTCAAGCAGAT               |                   |      |
| ZmBz2_BamHI_for        | gtacgatccATGCCAACAGAAGT           | GRMZM2G0162<br>41 |      |
| ZmBz2_Xhol_rev         | gcgtctcgagTTAGGACACGTGGA          |                   |      |
| ZmGST18_BamHI_<br>for  | gtatggatccATGGCGACCGAGA           | GRMZM2G0190<br>90 |      |
| ZmGST18_Sall_rev       | gcgctcgacTATGATGAAGGTG            |                   |      |
| ZmGST19_BamHI_<br>for  | gtacgatccATGCAGGTAGC              | GRMZM2G3356<br>18 |      |
| ZmGST19_Sall_rev       | gcgctcgacCTACTCGATG               |                   |      |
| U5_I117A_for2          | GGGTTTgcaTCAATGGCAAGAGCAGAC       |                   |      |
| U5_I117A_rev2          | GCCATTGAtgcAAACCCACGTTTATA        |                   |      |
| U5_M119L_for2          | TTATATCActgGCAAGAGCAGACGAGA       | AT2G29450         |      |
| U5_M119L_rev2          | TCTTGcagTGATATAAAACCCACGT         |                   |      |
| U5_I117A<br>M119L_for2 | GGGTTTgcaTCActgGCAAGAGCAGACGAGA   |                   |      |
| U5_I117A<br>M119L_rev2 | CTCTTGcagTGAtgcAAACCCACGTTCA      |                   |      |
| U6_A117I_for2          | GGGATTTatcTCACTGGCCAAAACAGAGAAAG  |                   |      |
| U6_A117I_rev2          | GCCAGTGAgtAAATCCACATTTACTATCTT    | AT2G29440         |      |
| U6_L119M_for2          | GGGATTTGCTCAatgGCCAAAACAGAGAAAG   |                   |      |
| U6_L119M_rev2          | GTTTTGGCcatTGAGGCAAATCCACATTTACTA |                   |      |
| U6_K121R_for2          | TCACTGGCCagaACAGAGAAAGGAAGAG      |                   |      |

|   |                                      |               |  |
|---|--------------------------------------|---------------|--|
| U6_K121R_rev2                                       | CTCTGTtctGGCCAGTGAGGCAAATCCCACAT     |               |  |
| U6_A117I  | GGGATTTatcTCAatgGCCAAAACAGAGAAAG     |               |  |
| L119M_for2  |                                      |               |  |
| U6_A117I  | TTGGCcatTGAgatAAATCCCACATTACTATCTT   |               |  |
| L119M_rev2  |                                      |               |  |
| U6_A117I  | GGGATTTatcTCACTGGCCagaACAGAGAAAGGAAG |               |  |
| K121R_for2  |                                      |               |  |
| U6_A117I  | CTCTGTtctGGCCAGTGAgatAAATCCCACATTTA  |               |  |
| K121R_for2  |                                      |               |  |
| U6_L119M  | cagaACAGAGAAAGGAAGAGAAGTTC           |               |  |
| K121R_for   |                                      |               |  |
| U6_L119M  | gccatTGAGGCAAATCCCACATTTAC           |               |  |
| K121R_rev   |                                      |               |  |
| <b>Sequenzierungsprimer</b>                         |                                      |               |  |
| NosT_Seq  | CATCGCAAGACCGCAAC                    |               |  |
| CYC1-Term_rev                                       | TTCGGTTAGAGCGGATGTGG                 |               |  |
| Gal1_Seq (GC)                                       | CATAACCACTTAACTAATACTTTCAAC          |               |  |
| <b>RNA und qPCR</b>                                 |                                      |               |  |
| 18S_253_for   | CATGATAACTCGACGGATCG                 |               |  |
| 18S_895_rev   | AGGCCAACACAATAGGATCG                 |               |  |
| U5_RT for   | TCCAAAGCTCGTTTCTTTGC                 |               |  |
| U5_RT rev   | CCTTTCTCGTCTGCTCTTGC                 | AT2G29450     |  |
| U18_RT for  | ATCGGTTACCTCGACATTGC                 |               |  |
| U18_RT rev  | GCATCCAACCTCGACACTCT                 | AT1G10360     |  |
| U22_RT for  | TTCAGCATCGAACCAGAGTG                 |               |  |
| U22_RT rev  | GGACTGAACCACGCTTTCTC                 | AT1G78340     |  |
| U1_RT_for   | GGAAGAAGATTTGCCCAACA                 |               |  |
| U1_RT_rev   | CGGAACTTTCTGTGAAGC                   | AT2G29490     |  |
| U7_RT_for   | GGATATTGTGGCGACTTTGG                 |               |  |
| U7_RT_rev   | GACGATCTCCTCCGTTCTCA                 | AT2G29420     |  |
| U8_RT_for   | ATGAAAACAGGAGCCCTATG                 |               |  |
| U8_RT_rev   | TGAGGACAGGGACCTTCTTG                 | AT3G09270     |  |
| U17_RT_for  | ACGAGTTCCTCCAAGAGACG                 |               |  |
| U17_RT_rev  | GAACCGGGATCTTCTGTGA                  | AT1G10370     |  |
| U23_RT_for  | CAAACCCGATTCTTCTTCA                  |               |  |
| U23_RT_rev  | TTGCATGGCACGTATGTCTT                 | AT1G78320     |  |
| U25_RT_for  | CCCCTTCTTCTTCTGATCC                  |               |  |
| U25_RT_rev  | CAACCTCGCTGAAGCATAACA                | AT1G17180     |  |
| F8_RT_for   | GCAAGAAAGTCAAGGCAACC                 |               |  |
| F8_RT_rev   | GAGGCGTTAGGGTCAAACCTG                | AT2G47730     |  |
| ZmGSTI_RT_for                                       | ATGTTTGGATCGAGGTGGAG                 |               |  |
| ZmGSTI_RT_rev                                       | GGACTGATGAGGACCTGGAA                 | GRMZM2G116273 |  |
| <b>Nachweis der TDNA-Integration in Arabidopsis</b> |                                      |               |  |
| LBa1  | TGGTTCACGTAGTGGCCATCG                |               | Insertspezifischer<br>Primer SALK-Linien         |
| o8760   | CTACACTGAATTGGTAGCTC                 |               | Insertspezifischer<br>Primer GABI-KAT-<br>Linien |
| SALK_107148C for                                    | ATCGTGAGGTGGTGAGTCTTG                |               |  |
| SALK_107148C rev                                    | TTCCTTTCTCGTCTGCTCTTG                | AT2G29450     |  |
| SALK_096297_for                                     | TTAATCGTTTCATTGTTGGCC                |               |  |
| SALK_096297_rev                                     | CAATCGTTGAATGCTTTCTCC                | AT1G10360     |  |
| GK_308E05 for                                       | TAAAACGGCTGTCAATTACGC                |               |  |
| GK_308E05 rev                                       | TTCTTGTAACCGGATTCATC                 | AT1G78340     |  |

**Tabelle 6.2 In dieser Arbeit erzeugte und verwendete *E. coli*-Stämme.**

*E. coli*, die für die Klonierung und Amplifizierung von Plasmiden, welche für pflanzliche GSTs kodierten, verwendet wurden, sind mit ihrer Stammsammlungsnummer aufgelistet. Mit (\*) gekennzeichnete Plasmide waren bereits im Labor vorhanden und wurden nicht im Rahmen dieser Arbeit kloniert.

| Gen            | Lokus     | # Stammsammlung |       |          |        |        |      |
|----------------|-----------|-----------------|-------|----------|--------|--------|------|
|                |           | pSH62           | pSH47 | pGreg563 | pSK355 | pGreen | pBI  |
| F2             | AT4G02520 | 2484*           |       |          |        |        |      |
| F3             | AT2G02930 | 2497*           |       |          |        |        |      |
| F4             | AT1G02950 | 2493*           | 4698  |          |        |        |      |
| F5             | AT1G02940 | 4942            | 4701  |          |        |        |      |
| F6             | AT1G02930 | 2517*           |       |          |        |        |      |
| F7             | AT1G02920 | 4703            | 4690  |          |        |        |      |
| F8             | AT2G47730 | 2520*           | 4705  | 6219     | 6229   |        |      |
| F9             | AT2G30860 | 2494*           |       |          |        |        |      |
| F10            | AT2G30870 | 2521*           |       |          |        |        |      |
| F11            | AT3G03190 | 2506*           |       |          |        |        |      |
| F12            | AT5G17220 | 4692            | 4693  |          |        |        |      |
| F13            | AT3G62760 | 4943            | 4702  |          |        |        |      |
| F14            | AT1G49860 | 2508*           |       |          |        |        |      |
| U1             | AT2G29490 | 2496*           |       | 6220     | 6230   |        |      |
| U2             | AT2G29480 | 2491*           |       |          |        |        |      |
| U3             | AT2G29470 | 2507*           |       |          |        |        |      |
| U4             | AT2G29460 | 2514*           |       | 6221     | 6231   |        |      |
| U5             | AT2G29450 | 2501*           | 4704  | 6222     | 6187   | 6193   | 6196 |
| U5 I117A       |           | 6481            |       |          |        |        |      |
| U5 M119L       |           | 6482            |       |          |        |        |      |
| U5 I117A M119L |           | 6483            |       |          |        |        |      |
| U6             | AT2G29440 | 2526*           | 6424  |          |        |        |      |
| U6 A117I       |           | 6484            |       |          |        |        |      |
| U6 K121R       |           | 6485            |       |          |        |        |      |
| U6 A117I L119M |           | 6486            |       |          |        |        |      |
| U6 A117I K121R |           | 6487            |       |          |        |        |      |
| U6 L119M K121R |           | 6488            |       |          |        |        |      |
| U7             | AT2G29420 | 2502*           |       | 6223     | 6401   |        |      |
| U8             | AT3G09270 | 4696            | 2523* |          | 6402   |        |      |
| U9             | AT5G62480 | 4934            |       |          |        |        |      |
| U10            | AT1G74590 | 2516*           |       |          |        |        |      |
| U11            | AT1G69930 | 2503*           |       |          |        |        |      |
| U12            | AT1G69920 | 2515*           |       |          |        |        |      |
| U13            | AT1G27130 | 2504*           |       | 6224     |        |        |      |
| U14            | AT1G27140 | 4944            | 2524* |          |        |        |      |
| U15            | AT1G59670 | 2510*           |       |          | 6403   |        |      |
| U16            | AT1G59700 | 2512*           |       |          |        |        |      |
| U17            | AT1G10370 | 2505*           | 6425  | 6225     | 6404   |        |      |
| U18            | AT1G10360 | 2519*           | 6426  |          | 6188   | 6194   | 6197 |
| U19            | AT1G78380 | 2485*           |       |          | 6406   |        |      |
| U20            | AT1G78370 | 4691            |       |          |        |        |      |
| U21            | AT1G78360 | 4805            | 4806  |          |        |        |      |
| U22            | AT1G78340 | 2511*           |       | 6226     | 6405   | 6195   | 6198 |
| U23            | AT1G78320 | 2518*           |       |          | 6407   |        |      |
| U24            | AT1G17170 | 2492*           |       |          |        |        |      |
| U25            | AT1G17180 | 2498*           |       | 6227     | 6408   |        |      |
| U26            | AT1G17190 | 2513*           |       |          |        |        |      |
| U27            | AT3G43800 | 2527*           |       |          |        |        |      |
| U28            | AT1G53680 | 4935            | 4936  |          |        |        |      |
| Z1             | AT2G02390 | 2499*           |       |          |        |        |      |

|            |               |       |       |      |
|------------|---------------|-------|-------|------|
| Z2         | AT2G02380     | 4938  |       |      |
| T1         | AT5G41210     | 2509* |       |      |
| T2         | AT5G41240     | 2495* |       |      |
| T3         | AT5G41220     | 5083  |       |      |
| L1         | AT5G02780     | 4941  | 2525* |      |
| L2         | AT3G55040     | 4940  | 4937  |      |
| L3         | AT5G02790     | 2530* |       |      |
| DHAR1      | AT1G19570     | 5750  |       |      |
| DHAR2      | AT1G75270     | 5751  |       |      |
| DHAR3      | AT5G16710     | 2522* |       |      |
| TCHQD      | AT1G77290     | 4803  |       |      |
| MAPEG      | AT1G65820     | 4804  | 6489  | 6493 |
| GHR1       | AT4G19880     | 5390* |       |      |
| GHR2       | AT5G45020     | 5389* |       |      |
| GHR4       | AT5G44000     | 5391* |       |      |
| ZmGSTI     | GRMZM2G116273 |       | 6228  | 6409 |
| ZmGST19    | GRMZM2G335618 |       |       | 6411 |
| ZmBz2      | GRMZM2G016241 | 6202  |       | 6410 |
| Leervektor |               | 2481* |       |      |

**Tabelle 6.3 *S. cerevisiae*-Deletionsmutanten.**

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit mittels homologer Rekombination generierten und verwendeten Deletionsmutanten von *S. cerevisiae* aufgelistet. Die mit (\*) gekennzeichneten Stämme wurden nicht im Rahmen dieser Arbeit hergestellt.

| Genotyp  | # Stammsammlung |
|--|-----------------|
| BY4741 WT MAT $\alpha$ his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 met15 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0                        | 1505*           |
| BY4742 WT MAT $\alpha$ his3 $\Delta$ 1 leu2 $\Delta$ 0 lys2 $\Delta$ 0 ura3 $\Delta$ 0                         | 1506*           |
| BY4741 +MET15  | 5145            |
| BY4742 $\Delta$ gto1 $\Delta$ gto2 $\Delta$ gto3 $\Delta$ tef4   | 2542*           |
| BY4742 $\Delta$ gto1 $\Delta$ gto2 $\Delta$ gto3 $\Delta$ tef4 $\Delta$ cpc                                    | 5061            |
| BY4742 $\Delta$ gto1 $\Delta$ gto2 $\Delta$ gto3 $\Delta$ tef4 $\Delta$ cpc $\Delta$ cpy                       | 5084            |
| BY4742 $\Delta$ gto1 $\Delta$ gto2 $\Delta$ gto3 $\Delta$ tef4 $\Delta$ cpc $\Delta$ cpy $\Delta$ cis2         | 5649            |
| BY4741 $\Delta$ grx1 $\Delta$ grx2 $\Delta$ gtt1 $\Delta$ gtt2   | 2021*           |
| BY4741 $\Delta$ grx1 $\Delta$ grx2 $\Delta$ gtt1 $\Delta$ gtt2 + MET15   | 5328            |
| BY4741 $\Delta$ grx1 $\Delta$ grx2 $\Delta$ gtt1 $\Delta$ gtt2 $\Delta$ tef4                                   | 5331            |
| BY4741 $\Delta$ grx1 $\Delta$ grx2 $\Delta$ gtt1 $\Delta$ gtt2 $\Delta$ tef4 + MET15                           | 5651            |
| BY4741 $\Delta$ grx1 $\Delta$ grx2 $\Delta$ gtt1 $\Delta$ gtt2 $\Delta$ tef4 $\Delta$ cpy +MET15               | 5634            |
| BY4741 $\Delta$ grx1 $\Delta$ grx2 $\Delta$ gtt1 $\Delta$ gtt2 $\Delta$ tef4 $\Delta$ cpc +MET15               | 5635            |
| BY4741 $\Delta$ grx1 $\Delta$ grx2 $\Delta$ gtt1 $\Delta$ gtt2 $\Delta$ tef4 $\Delta$ cpc $\Delta$ cis2 +MET15 | 5653            |
| BY4741 $\Delta$ cpc $\Delta$ cpy $\Delta$ cis2   | 1536*           |
| BY4741 $\Delta$ cpc $\Delta$ cpy $\Delta$ cis2 + MET15   | 5146            |

**Tabelle 6.4 GST-exprimierende *S. cerevisiae*.**

Verschiedene Hefe-WT und –Deletionsmutanten wurden im Laufe dieser Arbeit für die Expression von pflanzlichen GSTs generiert und sind nachfolgend aufgelistet. Mit (\*) gekennzeichnete Mutanten waren bereits vorhanden und wurden nicht im Laufe dieser Arbeit generiert.

| Gen              | Lokus     | BY4742   |  | BY4741  |   | BY4741           |                  |        |
|------------------|-----------|--|--|---|---|------------------|------------------|--------|
|                  |           | $\Delta$ tef4 $\Delta$ gto1<br>$\Delta$ gto2 $\Delta$ gto3<br>$\Delta$ cis2 $\Delta$ cpc<br>$\Delta$ cpy | BY4742<br>$\Delta$ tef4 $\Delta$ gto1<br>$\Delta$ gto2 $\Delta$ gto3 | $\Delta$ tef4 $\Delta$ grx1<br>$\Delta$ grx2 $\Delta$ gtt1<br>$\Delta$ gtt2 $\Delta$ cpc<br>$\Delta$ cis2<br>+MET15 | BY4741<br>$\Delta$ tef4 $\Delta$ grx1<br>$\Delta$ grx2 $\Delta$ gtt1<br>$\Delta$ gtt2<br>+MET15 | BY4741<br>+MET15 | BY4741<br>+MET15 | BY4742 |
| <b>pSH62-GST</b> |           |  |  |   |   |                  |                  |        |
| F2               | AT4G02520 | 5729   | 2489*  | 5738  | 5733  |                  | 5726             | 5723   |
| F3               | AT2G02930 | 6018   | 3806*  | 5741  | 5736  |                  |                  |        |
| F4               | AT1G02950 | 5731   | 3829*  | 5740  | 5735  |                  |                  |        |
| F5               | AT1G02940 | 5754   | 5051   |   | 5773  |                  |                  |        |
| F6               | AT1G02930 | 5716   | 3830*  | 5674  | 6022  |                  |                  | 5656   |
| F7               | AT1G02920 | 5755   | 4677   | 5778  | 5774  |                  |                  |        |
| F8               | AT2G47730 | 5663   | 5059   | 5675  | 5801  |                  |                  | 5657   |
| F9               | AT2G30860 | 5756   | 3804*  | 5779  | 5775  |                  |                  |        |
| F10              | AT2G30870 | 5717   | 3807*  | 5804  | 5782  |                  |                  |        |
| F11              | AT3G03190 | 5757   | 3782*  | 5780  | 5776  |                  |                  |        |
| F12              | AT5G17220 | 5715   | 4678   | 5805  | 5802  |                  |                  |        |
| F13              | AT3G62760 | 5758   | 5049   | 5806  | 5803  |                  |                  |        |
| F14              | AT1G49860 | 5759   | 3805*  | 5781  | 5777  |                  |                  |        |
| U1               | AT2G29490 | 5760   | 3799*  | 5924  | 5783  |                  |                  |        |
| U2               | AT2G29480 | 5761   | 3779*  |   | 6023  |                  |                  |        |
| U3               | AT2G29470 | 5714   | 3783*  | 5925  | 5784  |                  |                  |        |
| U4               | AT2G29460 | 5763   |  | 5933  | 5785  |                  |                  |        |
| U5               | AT2G29450 | 5730   | 3800*  | 5739  | 5734  | 5721             | 5727             | 5724   |
| U6               | AT2G29440 | 5764   | 3809*  | 5926  | 5921  |                  |                  |        |
| U7               | AT2G29420 | 5765   | 3801*  | 5934  | 5786  |                  |                  |        |
| U8               | AT3G09270 | 5766   | 3808*  |   | 5787  |                  |                  |        |
| U9               | AT5G62480 | 5913   | 5942   | 5927  | 5923  |                  |                  |        |
| U10              | AT1G74590 | 5767   | 2558*  | 5936  | 5928  |                  |                  |        |
| U11              | AT1G69930 | 5768   | 2559*  | 5937  | 5929  |                  |                  |        |
| U12              | AT1G69920 | 5769   | 3810*  | 5945  | 5930  |                  |                  |        |
| U13              | AT1G27130 | 5770   | 3811*  | 5946  | 5931  |                  |                  |        |
| U14              | AT1G27140 | 5771   | 5043   | 5947  | 5932  |                  |                  |        |
| U15              | AT1G59670 | 5772   | 3802*  | 5948  | 6024  |                  |                  |        |
| U16              | AT1G59700 | 5788   | 2535*  | 5949  | 6025  |                  |                  |        |
| U17              | AT1G10370 | 5789   | 3832*  | 5950  | 6026  |                  |                  |        |
| U18              | AT1G10360 | 5790   | 3812*  | 5951  | 6027  |                  |                  |        |
| U19              | AT1G78380 | 5791   | 2490*  | 5952  | 5671  |                  |                  | 5659   |
| U20              | AT1G78370 | 5792   | 4675   | 5953  | 6028  |                  |                  |        |
| U21              | AT1G78360 | 5793   | 4831   |   | 6029  |                  |                  |        |
| U22              | AT1G78340 | 5794   | 2536*  |   |   |                  |                  |        |
| U23              | AT1G78320 | 5795   | 5943   |   |   |                  |                  |        |
| U24              | AT1G17170 | 5796   | 3780*  |   |   |                  |                  |        |
| U25              | AT1G17180 | 5797   | 3781*  | 5678  | 5672  |                  |                  | 5660   |
| U26              | AT1G17190 | 5798   | 3813*  |   |   |                  |                  |        |
| U27              | AT3G43800 | 5799   | 3761*  |   |   |                  |                  |        |
| U28              | AT1G53680 | 5914   | 4679   |   |   |                  |                  |        |
| Z1               | AT2G02390 | 5800   | 2553*  |   |   |                  |                  |        |
| Z2               | AT2G02380 | 5939   | 4802   |   |   |                  |                  |        |
| T1               | AT5G41210 | 5938   | 2551*  |   |   |                  |                  |        |
| T2               | AT5G41240 | 6016   | 2552*  |   |   |                  |                  |        |
| T3               | AT5G41220 | 6017   |  |   |   |                  |                  |        |
| L1               | AT5G02780 | 5919   | 5046   |   |   |                  |                  |        |
| L2               | AT3G55040 | 5920   | 5048   |   |   |                  |                  |        |

| Gen                     | Lokus         | BY4742            |                   | BY4741            |                   | BY4741            |                   |              |               |
|-------------------------|---------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|-------------------|--------------|---------------|
|                         |               | <i>Δtef4Δgto1</i> | <i>Δgto2Δgto3</i> | <i>Δtef4Δgrx1</i> | <i>Δgrx2Δgtt1</i> | <i>Δtef4Δgrx1</i> | <i>Δgrx2Δgtt1</i> | <i>Δgtt2</i> | <i>+MET15</i> |
| L3                      | AT5G02790     | 6015              | 3762*             |                   |                   |                   |                   |              |               |
| DHAR1                   | AT1G19570     | 5915              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| DHAR2                   | AT1G75270     | 5916              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| DHAR3                   | AT5G16710     | 5917              | 3784*             |                   |                   |                   |                   |              |               |
| TCHQD                   | AT1G77290     | 5940              | 4801              |                   |                   |                   |                   |              |               |
| MAPEG                   | AT1G65820     | 5941              | 4833              |                   |                   |                   |                   |              |               |
| GHR1                    | AT4G19880     | 6184*             |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| GHR2                    | AT5G45020     | 6186*             |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| ZmGSTI                  | GRMZM2G116273 | 6199              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| ZmGST19                 | GRMZM2G335618 | 6200              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| ZmBz2                   | GRMZM2G016241 | 6208              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| Leervektor              |               | 5728              | 2487*             | 5737              | 5732              | 5720              | 5725              | 5722         |               |
| <b>pGreg563-GFP:GST</b> |               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| GSTF8                   | AT2G47730     | 6210              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| GSTU1                   | AT2G29490     | 6211              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| GSTU4                   | AT2G29460     | 6212              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| GSTU5                   | AT2G29450     | 6213              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| GSTU7                   | AT2G29420     | 6214              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| GSTU17                  | AT1G10370     | 6215              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| GSTU22                  | AT1G78340     | 6216              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| GSTU25                  | AT1G17180     | 6217              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| ZmGSTI                  | GRMZM2G116273 | 6218              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| Leervektor              |               | 6209              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| <b>Coexpression</b>     |               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH47-AtGSTF8           |               | 6428              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH62-eV                |               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH47-AtGSTF8           |               | 6429              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH62-AtGSTU5           |               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH47-AtGSTF8           |               | 6430              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH62-AtGSTU18          |               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH47-AtGSTF8           |               | 6431              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH62-AtGSTU22          |               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH47-AtGSTU5           |               | 6432              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH62-eV                |               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH47-AtGSTU5           |               | 6433              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH62-AtGSTU5           |               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH47-AtGSTU5           |               | 6434              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH62-AtGSTU1           |               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH47-AtGSTU5           |               | 6435              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH62-AtGSTU2           |               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH47-AtGSTU5           |               | 6436              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH62-AtGSTU4           |               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH47-AtGSTU5           |               | 6437              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH62-AtGSTU6           |               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH47-AtGSTU5           |               | 6438              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH62-AtGSTU17          |               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH47-AtGSTU5           |               | 6439              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH62-AtGSTU18          |               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH47-AtGSTU5           |               | 6440              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH62-AtGSTU22          |               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH47-AtGSTU5           |               | 6441              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH62-AtGSTU23          |               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH47-AtGSTU6           |               | 6442              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH62-eV                |               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH47-AtGSTU6           |               | 6443              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH62-AtGSTU5           |               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH47-AtGSTU6           |               | 6444              |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |
| pSH62-AtGSTU4           |               |                   |                   |                   |                   |                   |                   |              |               |

| Gen            | Lokus | BY4742<br><i>Δtef4Δgto1</i><br><i>Δgto2Δgto3</i><br><i>Δcis2Δcpc</i><br><i>Δcpy</i> | BY4742<br><i>Δtef4Δgto1</i><br><i>Δgto2Δgto3</i> | BY4741<br><i>Δtef4Δgrx1</i><br><i>Δgrx2Δgtt1</i><br><i>Δgtt2Δcpc</i><br><i>Δcis2</i><br><i>+MET15</i> | BY4741<br><i>Δtef4Δgrx1</i><br><i>Δgrx2Δgtt1</i><br><i>Δgtt2</i><br><i>+MET15</i> | BY4741<br><i>+MET15</i> | BY4742 |
|----------------|-------|---|--|---|---|-------------------------|--------|
| pSH47-AtGSTU6  |       | 6445  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU6  |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU6  |       | 6446  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU18 |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU17 |       | 6447  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-eV       |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU17 |       | 6448  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU5  |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU17 |       | 6449  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU17 |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU17 |       | 6450  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU18 |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU17 |       | 6451  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU22 |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU17 |       | 6452  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU23 |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU18 |       | 6453  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-eV       |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU18 |       | 6454  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU5  |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU18 |       | 6455  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU1  |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU18 |       | 6456  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU2  |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU18 |       | 6457  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU4  |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU18 |       | 6458  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU6  |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU18 |       | 6459  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU17 |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU18 |       | 6460  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU18 |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU18 |       | 6461  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU22 |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU18 |       | 6462  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU23 |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU22 |       | 6463  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-eV       |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU22 |       | 6464  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU5  |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU22 |       | 6465  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU1  |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU22 |       | 6466  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU2  |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU22 |       | 6467  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU4  |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU22 |       | 6468  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU6  |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU22 |       | 6469  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU17 |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU22 |       | 6470  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU18 |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU22 |       | 6471  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU22 |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH47-AtGSTU22 |       | 6472  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU23 |       |   |  |   |   |                         |        |
| <b>SDMs</b>    |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU5  |       | 6473  |  |   |   |                         |        |
| I117A          |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU5  |       | 6474  |  |   |   |                         |        |
| M119L          |       |   |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU6  |       | 6475  |  |   |   |                         |        |
| A117I          |       |   |  |   |   |                         |        |

| Gen                          | Lokus | BY4742<br><i>Δtef4Δgto1</i><br><i>Δgto2Δgto3</i><br><i>Δcis2Δcpc</i><br><i>Δcpy</i> | BY4742<br><i>Δtef4Δgto1</i><br><i>Δgto2Δgto3</i> | BY4741<br><i>Δtef4Δgrx1</i><br><i>Δgrx2Δgtt1</i><br><i>Δgtt2Δcpc</i><br><i>Δcis2</i><br><i>+MET15</i> | BY4741<br><i>Δtef4Δgrx1</i><br><i>Δgrx2Δgtt1</i><br><i>Δgtt2</i><br><i>+MET15</i> | BY4741<br><i>+MET15</i> | BY4742 |
|------------------------------|-------|---|--|---|---|-------------------------|--------|
| pSH62-AtGSTU6<br>L119M       |       | 6476  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU6<br>K121R       |       | 6477  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU6<br>A117I L119M |       | 6478  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU6<br>A117I K121R |       | 6479  |  |   |   |                         |        |
| pSH62-AtGSTU6<br>L119M K121R |       | 6480  |  |   |   |                         |        |

**Tabelle 6.5** Verwendete Deletions- und Überexpressionlinien von *A. thaliana*.

Aufgelistet sind die verwendeten TDNA-Insertionslinien mit der entsprechenden NASC-Bestellnummer und die Anzahl der unabhängigen Überexpressionlinien und der entsprechende *A. tumefaciens*-Stamm sind angegeben.

| TDNA-Insertionslinie | Lokus         | Bezeichnung               | # NASC                                   |
|----------------------|---------------|---------------------------|--|
| U5                   | AT2G29450     | SALK_107148               | N686622                                  |
| U18                  | AT1G10360     | SALK_096297               | N2106067                                 |
| U22                  | AT1G78340     | GK-308E05                 | N429525                                  |
| GST-Überexpression   | Lokus         | <i>A. thaliana</i> Linien | <i>A. tumefaciens</i><br># Stammsammlung |
| F8                   | AT2G47730     | 1-8                       | 6413                                     |
| U1                   | AT2G29490     | 1-8                       | 6414                                     |
| U5                   | AT2G29450     | 1-6                       | 6203                                     |
| U7                   | AT2G29420     | 1-8                       | 6415                                     |
| U8                   | AT3G09270     | 1-9                       | 6416                                     |
| U17                  | AT1G10370     | 1-5                       | 6417                                     |
| U18                  | AT1G10360     | 1-4                       | 6204                                     |
| U19                  | AT1G78380     |                           | 6418                                     |
| U22                  | AT1G78340     | 1-4                       | 6419                                     |
| U23                  | AT1G78320     | 1-8                       | 6420                                     |
| U25                  | AT1G17180     | 2-6                       | 6421                                     |
| MAPEG                | AT1G65820     |                           | 6494                                     |
| ZmGSTI               | GRMZM2G116273 | 1-7                       | 6422                                     |
| ZmBz2                | GRMZM2G016241 |                           | 6423                                     |
| Leervektor           |               | 1-3                       | 6412                                     |

**Tabelle 6.6 In Hefeextrakten mittels ICR-FT/MS identifizierte schwefelhaltige Massen.**

Proteinfreie Extrakte von Hefe, welche in Medium mit leichtem bzw. schwerem Schwefel kultiviert wurden, wurden mittels ICR-FT/MS analysiert. Schwefelhaltige Massen wurden aufgrund ihrer Änderung von 1,99579 u pro enthaltenem Schwefelatom nachgewiesen. Dabei wurden die Ergebnisse einer vollständigen Markierung von schwefelhaltigen Metaboliten (100 % und HCA) mit einer teilweisen Markierung (50 %) verglichen. Die Suche in einer Metabolitdatenbank ermöglichte die Identifizierung von 31 Metaboliten. Mit (\*) markierte Metabolite stellen nur eines von mehreren möglichen Isomeren dar.

| <sup>32</sup> S<br>[m-H] | <sup>34</sup> S<br>[m-H] | Identifizierung            | Summenformel  | ppm | identifiziert mittels |     |     |
|--------------------------|--------------------------|----------------------------|---|-----|-----------------------|-----|-----|
|                          |                          |                            |   |     | 100%                  | HCA | 50% |
| 146,14003                | 148,13444                |                            |   |     | x                     | x   |     |
| 150,00736                | 152,00359                |                            |   |     | x                     |     |     |
| 154,66522                | 156,66102                |                            |   |     |                       | x   |     |
| 155,6175                 | 159,61047                |                            |   |     | x                     |     |     |
| 166,31091                | 168,30671                |                            |   |     |                       | x   |     |
| 169,19877                | 171,19457                |                            |   |     |                       | x   |     |
| 177,03392                | 179,02972                | Cysteinyl-Glycin           | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> S  | 0   |                       | x   |     |
| 178,76363                | 180,75806                |                            |   |     | x                     |     |     |
| 190,0544                 | 192,05011                | N-Acetyl-Methionin         | C <sub>7</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>3</sub> S                | 0   | x                     | x   |     |
| 221,06015                | 223,05594                | Cystathionin               | C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S  | 0   | x                     | x   | x   |
| 222,04412                | 224,03992                |                            |   |     | x                     | x   | x   |
| 231,03141                | 233,02765                |                            |   |     | x                     |     |     |
| 231,04444                | 233,04029                |                            |   |     | x                     | x   |     |
| 235,07579                | 237,0716                 | Methionyl-Serin            | C <sub>8</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S  | 0   | x                     | x   | x   |
| 236,07913                | 238,07477                |                            |   |     | x                     | x   |     |
| 248,03321                | 250,03095                |                            |   |     | x                     |     |     |
| 249,05507                | 251,05086                | γ-Glutamyl-Cystein         | C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S  | 0   | x                     | x   | x   |
| 255,05461                | 257,05022                |                            |   |     | x                     |     |     |
| 257,05773                | 259,05353                |                            |   |     |                       | x   |     |
| 257,05783                | 259,05353                |                            |   |     | x                     |     |     |
| 257,13946                | 259,1341                 |                            |   |     | x                     |     |     |
| 263,0015                 | 264,99904                |                            |   |     | x                     |     |     |
| 263,07074                | 265,0665                 | Acetylcystathionin         | C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S  | 0   | x                     | x   | x   |
| 267,05437                | 269,05026                |                            |   |     | x                     |     |     |
| 268,00253                | 269,99846                |                            |   |     | x                     | x   |     |
| 268,08599                | 270,08183                |                            |   |     | x                     | x   | x   |
| 269,07004                | 271,06585                |                            |   |     | x                     | x   | x   |
| 271,03703                | 273,0328                 |                            |   |     | x                     | x   |     |
| 272,09404                | 274,08985                |                            |   |     | x                     |     |     |
| 273,03172                | 275,02742                | Cystathioninsulfoxid       | C <sub>7</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S  | 0   | x                     |     |     |
| 277,08634                | 279,08201                | γ-Glutamyl-Methionin       | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S | 0   | x                     | x   |     |
| 277,12275                | 279,11855                | Pantethein                 | C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S | 0   | x                     | x   | x   |
| 278,12607                | 280,12185                | <sup>13</sup> C-Pantethein | C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S |     | x                     | x   | x   |
| 281,1368                 | 283,1326                 |                            |   |     |                       | x   |     |
| 285,06497                | 287,0605                 |                            |   |     | x                     |     |     |
| 287,01096                | 289,00673                |                            |   |     | x                     | x   |     |
| 288,06597                | 290,06176                |                            |   |     | x                     | x   |     |
| 288,0672                 | 290,063                  |                            |   |     |                       |     | x   |

| <sup>32</sup> S<br>[m-H] | <sup>34</sup> S<br>[m-H] | Identifizierung                              | Summenformel   | ppm | identifiziert mittels |     |     |
|--------------------------|--------------------------|--|--|-----|-----------------------|-----|-----|
|                          |                          |  |  |     | 100%                  | HCA | 50% |
| 289,06932                | 291,06512                |  |  |     | x                     | x   | x   |
| 289,08396                | 291,07984                |  |  |     | x                     | x   |     |
| 290,07021                | 292,0658                 |  |  |     | x                     |     |     |
| 293,05917                | 297,04925                |  |  |     | x                     |     |     |
| 297,09421                | 301,08466                |  |  |     | x                     |     |     |
| 297,97972                | 299,97673                |  |  |     | x                     |     |     |
| 303,13822                | 305,13436                |  |  |     | x                     |     |     |
| 305,04493                | 307,04064                |  |  |     | x                     | x   | x   |
| 305,06871                | 307,06451                |  |  |     | x                     | x   | x   |
| 306,07652                | 308,07232                | Glutathion                                   | C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S  | 0   | x                     | x   | x   |
| 307,07988                | 309,07568                | <sup>13</sup> C-Glutathion                   | C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S  |     | x                     | x   | x   |
| 308,08077                | 310,07658                | <sup>13</sup> C <sub>2</sub> -Glutathion     | C <sub>10</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S  |     | x                     | x   | x   |
| 308,08323                | 310,07906                |  |  |     | x                     | x   | x   |
| 309,08413                | 311,0799                 |  |  |     | x                     | x   | x   |
| 314,08422                | 316,08029                |  |  |     |                       |     | x   |
| 314,12069                | 316,11664                |  |  |     |                       |     | x   |
| 319,03706                | 321,03292                |  |  |     | x                     | x   | x   |
| 319,13333                | 321,12909                |  |  |     | x                     | x   | x   |
| 320,09223                | 322,088                  | S-Methyl-Glutathion                          | C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S  | 0   | x                     | x   | x   |
| 321,11259                | 323,10833                | D-Pantothenoyl-Cystein                       | C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S  | 0   | x                     |     |     |
| 328,0024                 | 329,99725                |  |  |     | x                     |     |     |
| 328,04601                | 330,04173                |  |  |     | x                     | x   |     |
| 328,04609                | 330,04193                |  |  |     | x                     |     |     |
| 328,05847                | 330,05427                |  |  |     | x                     | x   | x   |
| 329,06182                | 331,05765                |  |  |     | x                     | x   |     |
| 332,09232                | 334,088044               | Cys-Pro-Asp*                                 | C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S  | 0   |                       | x   |     |
| 332,116715               | 334,112515               |  |  |     |                       | x   |     |
| 339,07851                | 341,07441                |  |  |     | x                     |     | x   |
| 340,11848                | 342,11426                |  |  |     | x                     | x   |     |
| 342,042465               | 344,038265               |  |  |     |                       | x   |     |
| 342,07654                | 344,0723                 |  |  |     | x                     |     |     |
| 344,03241                | 346,0282                 |  |  |     | x                     | x   | x   |
| 345,02946                | 347,02511                |  |  |     | x                     |     |     |
| 345,03576                | 347,03155                |  |  |     | x                     | x   | x   |
| 345,03923                | 349,02961                |  |  |     | x                     |     |     |
| 346,03057                | 348,02632                |  |  |     | x                     | x   | x   |
| 346,03696                | 348,03253                |  |  |     | x                     | x   |     |
| 347,03395                | 349,02961                |  |  |     | x                     | x   |     |
| 349,02653                | 351,02228                | Met-Gly-OH*                                  | C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S  | 0   | x                     | x   |     |
| 350,04036                | 352,0362                 |  |  |     | x                     |     |     |
| 350,10275                | 352,09856                | S-(2-Hydroxyethyl)glutathion                 | C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S  | 0   | x                     | x   | x   |
| 351,1060733              | 353,101915               | <sup>13</sup> C-S-(2-Hydroxyethyl)glutathion | C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S  |     |                       | x   |     |
| 357,02897                | 359,0237                 |  |  |     | x                     |     |     |
| 357,08909                | 359,08488                | D-Pantethein-4'-phosphat                     | C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> PS | 0   | x                     | x   | x   |
| 358,09242                | 360,08827                | <sup>13</sup> C-D-Pantethein-4'-phosphat     | C <sub>11</sub> H <sub>23</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> PS |     | x                     | x   | x   |

| <sup>32</sup> S<br>[m-H] | <sup>34</sup> S<br>[m-H] | Identifizierung   | Summenformel   | ppm | identifiziert mittels |     |     |
|--------------------------|--------------------------|---|--|-----|-----------------------|-----|-----|
|                          |                          |   |  |     | 100%                  | HCA | 50% |
| 363,09794                | 365,0938                 | Glu-Cys-Gly-Gly*  | C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S              | 0   | x                     | x   | x   |
| 364,11848                | 366,11421                | Ser-Met-Glu*  | C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S              | 0   | x                     | x   |     |
| 366,01432                | 368,01016                |   |  |     | x                     | x   | x   |
| 367,99011                | 369,9858                 |   |  |     | x                     | x   |     |
| 369,98696                | 371,98247                |   |  |     | x                     | x   |     |
| 371,98572                | 373,98143                |   |  |     | x                     | x   |     |
| 375,05839                | 377,05544                |   |  |     | x                     |     |     |
| 381,98825                | 383,98397                |   |  |     | x                     | x   | x   |
| 382,12897                | 384,12482                |   |  |     | x                     | x   | x   |
| 383,11433                | 385,11013                | S-Adenosylhomocystein                                   | C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S              | 0   | x                     | x   | x   |
| 384,11775                | 386,11342                | <sup>13</sup> C-S-Adenosylhomocystein                   | C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>6</sub> O <sub>5</sub> S              |     | x                     | x   | x   |
| 384,15446                | 388,14781                |   |  |     | x                     |     |     |
| 384,98811                | 386,98364                |   |  |     | x                     |     |     |
| 388,0587283              | 390,05442                |   |  |     |                       | x   |     |
| 391,05402                | 393,04988                |   |  |     | x                     | x   |     |
| 393,10863                | 395,10411                | Glu-Cys-Gly-Ser*  | C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> S              | 0   | x                     | x   |     |
| 393,53504                | 395,53156                |   |  |     | x                     |     |     |
| 399,09967                | 401,09548                | S-Acetylphosphopantethein                               | C <sub>13</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> PS             | 0   | x                     | x   | x   |
| 400,10299                | 402,09884                | <sup>13</sup> C-S-Acetylphosphopantethein               | C <sub>13</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> PS             |     | x                     | x   | x   |
| 401,10409                | 403,09967                | <sup>13</sup> C <sub>2</sub> -S-Acetylphosphopantethein | C <sub>13</sub> H <sub>25</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> PS             |     | x                     | x   |     |
| 403,55936                | 405,55511                |   |  |     | x                     | x   |     |
| 404,05346                | 406,04924                |   |  |     | x                     | x   | x   |
| 405,03448                | 407,0286                 |   |  |     | x                     |     |     |
| 405,05702                | 407,05254                |   |  |     | x                     | x   | x   |
| 406,092775               | 408,0882483              | S-Succinylglutathion                                    | C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S              |     |                       | x   |     |
| 407,02805                | 409,02389                |   |  |     | x                     | x   | x   |
| 407,12421                | 409,12003                | Glu-Cys-Gly-Thr*  | C <sub>14</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> S              | 0   | x                     | x   |     |
| 407,14957                | 409,14498                |   |  |     | x                     |     |     |
| 408,10805                | 410,10388                |   |  |     | x                     |     |     |
| 412,01996                | 414,01588                |   |  |     | x                     |     |     |
| 419,04483                | 421,04095                |   |  |     |                       |     | x   |
| 419,16052                | 421,1563                 | Glu-Cys-Ala-Val*  | C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S              | 0   | x                     |     |     |
| 421,16506                | 423,16082                |   |  |     | x                     | x   | x   |
| 422,124                  | 424,11983                |   |  |     | x                     |     |     |
| 422,16838                | 424,16425                |   |  |     | x                     | x   | x   |
| 425,08064                | 429,07205                | S-Glutathionyl-Cystein                                  | C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub> | 0   | x                     |     |     |
| 426,03541                | 428,03122                |   |  |     | x                     | x   | x   |
| 426,03948                | 428,03528                |   |  |     |                       | x   |     |
| 427,03872                | 429,0346                 |   |  |     | x                     | x   | x   |
| 427,95138                | 429,94696                |   |  |     | x                     |     |     |
| 429,01001                | 431,00583                |   |  |     | x                     | x   | x   |
| 432,1083567              | 434,103535               |   |  |     |                       | x   |     |
| 438,1916                 | 440,18739                |   |  |     | x                     |     | x   |
| 442,00935                | 444,00516                |   |  |     | x                     | x   | x   |
| 442,012525               | 444,008115               |   |  |     |                       | x   |     |

| <sup>32</sup> S | <sup>34</sup> S | Identifizierung  | Summenformel   | ppm | identifiziert mittels |     |     |
|-----------------|-----------------|------------------|--|-----|-----------------------|-----|-----|
| [m-H]           | [m-H]           |                  |  |     | 100%                  | HCA | 50% |
| 443,01265       | 445,00852       |                  |  |     | x                     | x   | x   |
| 444,00755       | 446,00334       |                  |  |     | x                     | x   |     |
| 444,01409       | 446,0088        |                  |  |     | x                     |     |     |
| 444,98402       | 446,97978       |                  |  |     | x                     | x   | x   |
| 445,98089       | 447,97661       |                  |  |     | x                     |     |     |
| 445,98723       | 447,98321       |                  |  |     |                       | x   | x   |
| 445,98749       | 447,98344       |                  |  |     | x                     |     |     |
| 446,98226       | 448,978         |                  |  |     | x                     | x   |     |
| 446,98231       | 448,97782       |                  |  |     | x                     |     |     |
| 447,10423       | 449,10006       |                  |  |     | x                     | x   |     |
| 448,01736       | 450,01317       |                  |  |     | x                     | x   | x   |
| 450,11904       | 452,11464       |                  |  |     |                       | x   |     |
| 450,99277       | 452,98758       |                  |  |     | x                     |     |     |
| 454,08517       | 456,08192       |                  |  |     | x                     |     |     |
| 463,99131       | 465,98713       |                  |  |     | x                     | x   | x   |
| 464,99468       | 466,99044       |                  |  |     | x                     |     |     |
| 465,98923       | 467,98512       |                  |  |     | x                     | x   |     |
| 466,96597       | 468,96183       |                  |  |     | x                     |     |     |
| 468,9858        | 470,98327       |                  |  |     | x                     |     |     |
| 469,09861       | 471,09456       |                  |  |     | x                     | x   |     |
| 470,00439       | 472,0003067     |                  |  |     |                       | x   |     |
| 470,88013       | 472,87693       |                  |  |     | x                     |     |     |
| 475,09903       | 477,09486       |                  |  |     | x                     | x   |     |
| 475,11173       | 477,10738       |                  |  |     | x                     | x   |     |
| 477,14981       | 481,14099       |                  |  |     | x                     |     |     |
| 477,99285       | 479,98914       |                  |  |     | x                     |     |     |
| 479,14541       | 481,14099       | Glu-Glu-Cys-Thr* | C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> S | 0   | x                     |     |     |
| 479,96524       | 481,96103       |                  |  |     | x                     | x   | x   |
| 480,18835       | 482,18419       |                  |  |     | x                     | x   | x   |
| 480,96861       | 482,96474       |                  |  |     | x                     | x   |     |
| 481,09118       | 483,08694       |                  |  |     | x                     | x   | x   |
| 481,1918017     | 483,187522      | Phe-Trp-Met*     | C <sub>25</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S  | 0   |                       | x   |     |
| 481,9635        | 483,9592        |                  |  |     | x                     | x   |     |
| 485,07269       | 487,06846       |                  |  |     | x                     |     | x   |
| 485,0727567     | 487,0685567     |                  |  |     |                       | x   |     |
| 485,97338       | 487,96896       |                  |  |     | x                     | x   |     |
| 486,07557       | 488,07127       |                  |  |     | x                     |     |     |
| 491,0861        | 493,0815        |                  |  |     | x                     | x   | x   |
| 497,09368       | 499,08946       |                  |  |     | x                     | x   |     |
| 501,04664       | 503,04238       |                  |  |     | x                     | x   | x   |
| 501,095265      | 503,091065      |                  |  |     |                       | x   |     |
| 501,13139       | 503,12719       |                  |  |     | x                     | x   | x   |
| 501,94707       | 503,94288       |                  |  |     | x                     |     |     |
| 501,947115      | 503,942915      |                  |  |     |                       | x   |     |
| 502,13469       | 504,1304        |                  |  |     | x                     |     |     |

| <sup>32</sup> S<br>[m-H] | <sup>34</sup> S<br>[m-H] | Identifizierung    | Summenformel  | ppm | identifiziert mittels |     |     |
|--------------------------|--------------------------|--------------------|---|-----|-----------------------|-----|-----|
|                          |                          |                    |   |     | 100%                  | HCA | 50% |
| 502,17019                | 504,16606                |                    |   |     | x                     | x   | x   |
| 505,98832                | 507,98402                |                    |   |     | x                     |     |     |
| 513,06765                | 515,06329                |                    |   |     | x                     | x   | x   |
| 517,92129                | 519,91699                |                    |   |     | x                     | x   |     |
| 518,14421                | 520,13998                |                    |   |     | x                     | x   | x   |
| 523,99977                | 525,99538                |                    |   |     | x                     | x   |     |
| 524,01247                | 526,00825                |                    |   |     | x                     | x   | x   |
| 529,0415                 | 531,03724                |                    |   |     | x                     | x   | x   |
| 529,96115                | 531,95692                |                    |   |     | x                     |     |     |
| 535,0496                 | 537,0454                 |                    |   |     |                       | x   |     |
| 535,04974                | 537,04542                |                    |   |     | x                     |     |     |
| 539,98631                | 541,982                  |                    |   |     |                       |     | x   |
| 543,15816                | 547,14808                | Glu-Cys-Met-Tyr*   | C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub>  | 1   | x                     |     |     |
| 544,11209                | 546,10798                |                    |   |     | x                     |     | x   |
| 545,11529                | 547,11105                |                    |   |     | x                     |     |     |
| 545,93608                | 547,93072                |                    |   |     | x                     |     |     |
| 545,99427                | 547,99004                |                    |   |     | x                     | x   |     |
| 545,99438                | 547,98974                |                    |   |     |                       |     | x   |
| 551,02325                | 553,01932                |                    |   |     | x                     |     |     |
| 551,02344                | 553,01924                |                    |   |     |                       | x   |     |
| 551,08699                | 553,08293                |                    |   |     | x                     |     |     |
| 551,087125               | 553,082925               |                    |   |     |                       | x   |     |
| 551,08726                | 553,08308                |                    |   |     |                       |     | x   |
| 557,05388                | 559,04965                |                    |   |     | x                     | x   |     |
| 559,05078                | 561,04612                |                    |   |     | x                     | x   |     |
| 561,96835                | 563,96397                |                    |   |     | x                     | x   | x   |
| 564,94293                | 566,93841                |                    |   |     | x                     |     |     |
| 566,09421                | 568,08921                |                    |   |     | x                     |     |     |
| 566,9973233              | 568,993105               |                    |   |     |                       | x   |     |
| 567,97533                | 569,97243                |                    |   |     | x                     |     |     |
| 577,94222                | 579,93806                |                    |   |     | x                     | x   | x   |
| 578,16533                | 580,16101                |                    |   |     | x                     | x   | x   |
| 578,3482733              | 580,34387                |                    |   |     |                       | x   |     |
| 579,94068                | 581,93681                |                    |   |     | x                     |     |     |
| 582,0679329              | 584,0638433              |                    |   |     |                       | x   |     |
| 583,95013                | 585,94598                |                    |   |     | x                     | x   | x   |
| 599,92416                | 601,91992                |                    |   |     | x                     | x   | x   |
| 600,14711                | 602,1427                 |                    |   |     | x                     | x   | x   |
| 611,04452                | 613,04036                |                    |   |     | x                     |     |     |
| 611,14461                | 615,13629                | Glutathiondisulfid | C <sub>20</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>12</sub> S <sub>2</sub> | 0   | x                     |     |     |
| 615,89839                | 617,89387                |                    |   |     | x                     | x   | x   |
| 616,12111                | 618,11716                |                    |   |     | x                     | x   | x   |
| 621,00581                | 623,00061                |                    |   |     | x                     | x   |     |
| 627,01946                | 629,01416                |                    |   |     | x                     |     |     |
| 638,10281                | 640,09922                |                    |   |     | x                     | x   | x   |

| <sup>32</sup> S<br>[m-H] | <sup>34</sup> S<br>[m-H] | Identifizierung | Summenformel  | ppm | identifiziert mittels |     |     |
|--------------------------|--------------------------|-----------------|---|-----|-----------------------|-----|-----|
|                          |                          |                 |   |     | 100%                  | HCA | 50% |
| 649,00021                | 650,99638                |                 |   |     |                       | x   |     |
| 653,1399233              | 655,135555               |                 |   |     |                       | x   |     |
| 659,94524                | 661,94051                |                 |   |     | x                     | x   |     |
| 664,974545               | 666,970484               |                 |   |     |                       | x   |     |
| 675,91979                | 677,91529                |                 |   |     | x                     |     |     |
| 676,14311                | 678,13895                |                 |   |     | x                     |     |     |
| 686,1421                 | 688,13751                | Dephospho-CoA   | C <sub>21</sub> H <sub>35</sub> N <sub>7</sub> O <sub>13</sub> P <sub>2</sub> S | 0   | x                     | x   | x   |
| 695,78522                | 697,78015                |                 |   |     | x                     |     |     |
| 714,09829                | 716,09395                |                 |   |     | x                     |     |     |
| 715,36954                | 717,3642                 |                 |   |     | x                     |     |     |
| 728,15233                | 730,14814                |                 |   |     | x                     |     |     |
| 808,11885                | 810,11438                | Acetyl-CoA      | C <sub>23</sub> H <sub>38</sub> N <sub>7</sub> O <sub>17</sub> P <sub>3</sub> S | 0   | x                     |     |     |
| 846,0750567              | 848,0713283              |                 |   |     |                       | x   |     |
| 906,91695                | 910,9081                 |                 |   |     | x                     |     |     |

**Tabelle 6.7 In der Mutante  $\Delta cis2\Delta cpc\Delta cpy + MET15$  angereicherte schwefelhaltige Massen.**

Aufgelistet sind Schwefelmassen, deren Intensität in der Deletionsmutante  $\Delta cis2\Delta cpc\Delta cpy + MET15$  im Vergleich zu WT BY4741 +  $MET15$  höher war. Diesen Massen wurde eine Summenformel, mit einer Varianz von 0,5 ppm, zugeordnet. Neben der theoretischen Massen dieser Summenformeln und der Abweichung zu den gemessenen Schwefelmassen, wurden in einer Datenbanksuche den GSH-bereinigten Summenformeln mögliche Metabolite zugeordnet.

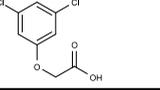
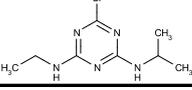
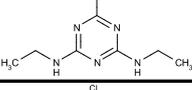
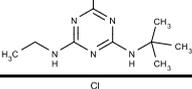
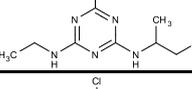
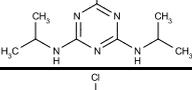
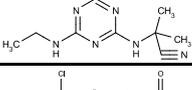
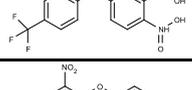
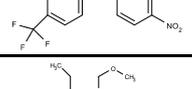
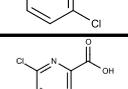
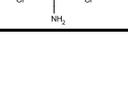
| gemessene Masse [m-H] | putative Summenformel   | theoretische Masse [m-H] | Fehler (ppm) | Ergebnis Datenbanksuche      |
|-----------------------|---|--------------------------|--------------|------------------------------|
| 249,05507             | C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S  | 249,05507                | 0,027        | γ-Glutamylcystein            |
| 263,07074             | C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S  | 263,07072                | 0,064        |                              |
| 268,086               | C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> NO <sub>6</sub> S                | 268,08603                | -0,114       |                              |
| 287,01096             | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> PS | 287,01083                | 0,434        |                              |
| 304,09727             | C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S | 304,09727                | 0,001        |                              |
| 305,04492             | C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> S | 305,0449                 | 0,088        |                              |
| 318,1129              | C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S | 318,11292                | -0,055       |                              |
| 318,14925             | C <sub>13</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S | 318,1493                 | -0,149       |                              |
| 319,03708             | C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> PS | 319,03705                | 0,104        |                              |
| 319,09692             | C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> S | 319,09693                | -0,026       |                              |
| 320,09222             | C <sub>11</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S | 320,09218                | 0,102        | S-Methylglutathion           |
| 328,05848             | C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>3</sub> OS <sub>2</sub>  | 328,05838                | 0,305        |                              |
| 337,12275             | C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S | 337,12275                | 0,005        | S-Acetylglutathion           |
| 348,08711             | C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S | 348,0871                 | 0,036        |                              |
| 350,10275             | C <sub>12</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S | 350,10275                | 0,018        | S-(2-Hydroxyethyl)glutathion |
| 351,10609             | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>3</sub> S                | 351,10604                | 0,128        |                              |
| 360,15984             | C <sub>15</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S | 360,15987                | -0,083       |                              |
| 363,09797             | C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S | 363,098                  | -0,069       |                              |
| 364,11845             | C <sub>13</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S | 364,1184                 | 0,145        |                              |
| 374,17553             | C <sub>16</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S | 374,17552                | 0,04         |                              |
| 375,17078             | C <sub>15</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S | 375,17077                | 0,036        |                              |

| gemessene Masse [m-H] | putative Summenformel   | theoretische Masse [m-H] | Fehler (ppm) | Ergebnis Datenbanksuche |
|-----------------------|---|--------------------------|--------------|-------------------------|
| 375,1789              | C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> OS  | 375,17881                | 0,245        |                         |
| 384,98798             | C <sub>15</sub> H <sub>14</sub> O <sub>6</sub> S <sub>3</sub>                               | 384,98798                | 0,02         |                         |
| 388,05868             | C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> PS                            | 388,05851                | 0,419        |                         |
| 389,18642             | C <sub>16</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S                             | 389,18642                | 0,003        |                         |
| 391,17381             | C <sub>25</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> S  | 391,17373                | 0,203        |                         |
| 400,19123             | C <sub>18</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S                             | 400,19117                | 0,156        |                         |
| 404,05346             | C <sub>10</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> PS                           | 404,05343                | 0,088        |                         |
| 406,09267             | C <sub>14</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S                             | 406,09256                | -0,291       | S-Succinylglutathione   |
| 408,15989             | C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S                             | 408,15987                | 0,055        |                         |
| 417,18142             | C <sub>17</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S                             | 417,18133                | 0,224        |                         |
| 419,19711             | C <sub>17</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S                             | 419,19698                | 0,312        |                         |
| 421,16507             | C <sub>17</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S                             | 421,16501                | 0,136        |                         |
| 422,94383             | C <sub>13</sub> H <sub>13</sub> O <sub>8</sub> PS <sub>3</sub>                              | 422,94374                | 0,217        |                         |
| 424,15485             | C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S                             | 424,15478                | 0,153        |                         |
| 425,15819             | C <sub>28</sub> H <sub>26</sub> O <sub>2</sub> S  | 425,15808                | 0,275        |                         |
| 432,10268             | C <sub>15</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>3</sub> P <sub>2</sub> S <sub>3</sub>               | 432,1025                 | 0,414        |                         |
| 434,17559             | C <sub>21</sub> H <sub>29</sub> N <sub>3</sub> O <sub>5</sub> S                             | 434,17552                | 0,161        |                         |
| 435,11921             | C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub> S                             | 435,11913                | 0,181        | γ-Glutamylglutathion    |
| 440,14977             | C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S                             | 440,1497                 | 0,153        |                         |
| 442,00938             | C <sub>17</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>7</sub> S <sub>3</sub>                              | 442,00944                | -0,148       |                         |
| 443,01265             | C <sub>18</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>                | 443,01255                | 0,232        |                         |
| 445,21279             | C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S                             | 445,21263                | 0,361        |                         |
| 446,2079              | C <sub>18</sub> H <sub>33</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> S                             | 446,20788                | 0,032        |                         |
| 447,10423             | C <sub>14</sub> H <sub>31</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P <sub>3</sub> S              | 447,10429                | -0,138       |                         |
| 447,19207             | C <sub>18</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S                             | 447,1919                 | 0,382        |                         |
| 448,01737             | C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> P <sub>2</sub> S <sub>2</sub> | 448,01726                | 0,253        |                         |
| 450,20727             | C <sub>14</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>5</sub> P <sub>2</sub> S              | 450,20744                | -0,378       |                         |
| 451,16572             | C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S                             | 451,16568                | 0,091        |                         |
| 461,20765             | C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S                             | 461,20755                | 0,224        |                         |
| 462,21107             | C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> NO <sub>3</sub> S   | 462,21084                | 0,493        |                         |
| 474,20301             | C <sub>19</sub> H <sub>33</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> S                             | 474,2028                 | 0,447        |                         |
| 475,22362             | C <sub>22</sub> H <sub>43</sub> N <sub>2</sub> OP <sub>3</sub> S                            | 475,22362                | 0,007        |                         |
| 476,21863             | C <sub>19</sub> H <sub>35</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> S                             | 476,21845                | 0,393        |                         |
| 477,20254             | C <sub>19</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> S                             | 477,20246                | 0,164        |                         |
| 480,18836             | C <sub>24</sub> H <sub>35</sub> NO <sub>5</sub> S <sub>2</sub>                              | 480,18839                | -0,053       |                         |
| 485,07271             | C <sub>16</sub> H <sub>26</sub> N <sub>2</sub> O <sub>9</sub> S <sub>3</sub>                | 485,07277                | -0,12        |                         |
| 489,23911             | C <sub>23</sub> H <sub>45</sub> N <sub>2</sub> OP <sub>3</sub> S                            | 489,23927                | -0,32        |                         |
| 490,19797             | C <sub>21</sub> H <sub>40</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> P <sub>3</sub> S              | 490,19813                | -0,318       |                         |
| 491,08603             | C <sub>32</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S                             | 491,08597                | 0,109        |                         |
| 497,13495             | C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub> S                             | 497,13478                | 0,359        |                         |
| 503,25467             | C <sub>22</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S                             | 503,2545                 | 0,344        |                         |
| 504,2136              | C <sub>20</sub> H <sub>35</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> S                             | 504,21336                | 0,475        |                         |
| 512,08362             | C <sub>17</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S <sub>3</sub>                | 512,08367                | -0,087       |                         |
| 513,06762             | C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> N <sub>2</sub> OP <sub>4</sub> S <sub>2</sub>               | 513,06772                | -0,208       |                         |

| gemessene Masse [m-H] | putative Summenformel   | theoretische Masse [m-H] | Fehler (ppm) | Ergebnis Datenbanksuche |
|-----------------------|---|--------------------------|--------------|-------------------------|
| 517,23393             | C <sub>22</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> S                             | 517,23376                | 0,335        |                         |
| 517,24499             | C <sub>21</sub> H <sub>38</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> S                             | 517,24499                | -0,004       |                         |
| 523,99981             | C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub> P <sub>3</sub> S <sub>2</sub> | 523,9999                 | -0,175       |                         |
| 528,05747             | C <sub>20</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> S <sub>3</sub>                | 528,05745                | 0,023        |                         |
| 531,23176             | C <sub>23</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>                | 531,23165                | 0,202        |                         |
| 532,24485             | C <sub>22</sub> H <sub>39</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> S                             | 532,24466                | 0,346        |                         |
| 539,98635             | C <sub>17</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>11</sub> PS <sub>3</sub>                            | 539,98634                | 0,014        |                         |
| 550,23434             | C <sub>25</sub> H <sub>37</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> S                             | 550,2341                 | 0,453        |                         |
| 566,99748             | C <sub>28</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>6</sub> P <sub>2</sub> S              | 566,99751                | -0,051       |                         |
| 577,94228             | C <sub>25</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>8</sub> P <sub>3</sub> S                            | 577,94237                | -0,162       |                         |
| 578,16534             | C <sub>24</sub> H <sub>38</sub> NO <sub>9</sub> PS <sub>2</sub>                             | 578,16529                | 0,09         |                         |
| 645,30387             | C <sub>23</sub> H <sub>55</sub> N <sub>2</sub> O <sub>14</sub> PS                           | 645,30389                | -0,023       |                         |
| 673,33531             | C <sub>30</sub> H <sub>57</sub> N <sub>6</sub> O <sub>3</sub> P <sub>3</sub> S              | 673,33529                | 0,029        |                         |
| 744,37257             | C <sub>41</sub> H <sub>66</sub> NOP <sub>3</sub> S <sub>2</sub>                             | 744,37259                | -0,029       |                         |
| 745,37583             | C <sub>42</sub> H <sub>61</sub> N <sub>4</sub> P <sub>3</sub> S                             | 745,3757                 | 0,171        |                         |

**Tabelle 6.8** Untersuchte putative GST-Substrate.

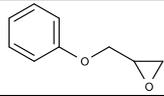
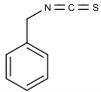
Eine Übersicht aller, hinsichtlich ihrer Eigenschaft als GST-Substrat untersuchten, Substanzen, den dazugehörigen Summenformeln und negativ geladenen Massen. Ob mit einem der drei Systeme, *S. cerevisiae*, *in vitro* und Arabidopsis, spezifische Schwefelmassen für die jeweilige Substanz nachgewiesen wurden, ist mit einem Haken (Schwefelmassen gefunden) oder Kreuz (keine spezifischen Schwefelmassen gefunden) markiert.

| <i>in vitro</i> | Hefe | Arabidopsis | Pestizidklasse               | Xenobiotikum               | IUPAC  | Struktur   | Summenformel   | Masse [m-H]   |
|-----------------|------|-------------|------------------------------|----------------------------|--|--|--|---|
| ✓               | ✗    | ✓           | Phenoxycarbonsäure-Herbizide | 2,4D                       | 2-(2,4-dichlorphenoxy)acetic acid  |    | C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                         | 218.96211   |
| ✓               | ✗    | ✗           | Chlortriazin-Herbizide       | Atrazin                    | 6-chloro-N-ethyl-N'-(1-methylethyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine               |    | C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub>                                      | 214.08648   |
| ✓               | ✓    | ✓           |                              | Simazin                    | 6-chloro-N,N'-diethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine                             |    | C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>5</sub>                                      | 200.07084   |
| ✓               | ✗    | ✓           |                              | Terbutylazin               | 6-chloro-N-(1,1-dimethylethyl)-N'-ethyl-1,3,5-triazine-2,4-diamine           |    | C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>5</sub>                                      | 228.10213   |
| ✓               | ✗    | ✓           |                              | Sebutylazin                | 6-chloro-N-ethyl-N'-(1-methylpropyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine              |   | C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>5</sub>                                      | 228.10215   |
| ✓               | ✗    | ✓           |                              | Propazin                   | 6-chloro-N,N'-bis(1-methylethyl)-1,3,5-triazine-2,4-diamine                  |  | C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>5</sub>                                      | 228.102147  |
| ✓               | ✓    | ✓           |                              | Cyanazin                   | 2-[[4-chloro-6-(ethylamino)-1,3,5-triazin-2-yl]amino]-2-methylpropanenitrile |  | C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>6</sub>                                      | 239.08173   |
| ✓               | ✗    |             |                              | Nitrophenylether-Herbizide | Acifluorfen  | 5-[2-chloro-4-(trifluoromethyl)phenoxy]-2-nitrobenzoic acid                          |  | C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> ClF <sub>3</sub> NO <sub>5</sub> |
| ✓               | ✓    | ✗           | Fluorodifen                  |                            | 2-nitro-1-(4-nitrophenoxy)-4-(trifluoromethyl)benzene                        |  | C <sub>13</sub> H <sub>7</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub>          | 327.023429  |
| ✓               | ✓    | ✓           | Chloracetamid-Herbizide      | Alachlor                   | 2-chloro-N-(2,6-diethylphenyl)-N-(methoxymethyl)acetamide                    |  | C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> ClNO <sub>2</sub>                                    | 268.11097   |
| ✓               | ✓    | ✓           |                              | Metolachlor                | 2-chloro-N-(2-ethyl-6-methylphenyl)-N-(2-methoxy-1-methylethyl)acetamide     |  | C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>2</sub>                                    | 282.12661   |
| ✓               | ✓    | ✓           |                              | Propachlor                 | 2-chloro-N-(1-methylethyl)-N-phenylacetamide                                 |  | C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> ClNO   | 210.0691  |
|                 | ✗    | ✓           | Benzoensäure-Herbizide       | Dicamba                    | 3,6-dichloro-2-methoxybenzoic acid   |  | C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                         | 218.96211   |
| ✗               | ✗    |             | Pyridin-Herbizide            | Clopyralid                 | 3,6-dichloro-2-pyridinecarboxylic acid                                       |  | C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>                        | 189.9468  |
| ✗               | ✗    | ✗           |                              | Picloram                   | 4-amino-3,5,6-trichloro-2-pyridinecarboxylic acid                            |  | C <sub>6</sub> H <sub>3</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>          | 238.91873   |

| <i>in vitro</i><br>Hefe<br>Arabidopsis | Pestizidklasse                    | Xenobiotikum         | IUPAC  | Struktur | Summenformel  | Masse [m-H] |
|--|-----------------------------------|----------------------|--|----------|---|-------------|
| ✓                                      | Anilid-Herbizide                  | Propanil             | 3',4'-dichloropropionanilide   |          | C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>2</sub> NO                              | 215.99883   |
| ✓                                      |                                   | Mefenacet            | 2-(1,3-Benzothiazol-2-yloxy)-N-methyl-N-phenylacetamide  |          | C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S               | 297.07031   |
| ✗                                      | Pyrimidinsulfonurea-Herbizide     | Mesosulfuron-methyl  | methyl 2-[[[(4,6-dimethoxy-2-pyrimidinyl)amino]carbonyl]amino]sulfonyl]-4-[[[(methylsulfonyl)amino]methyl]benzoate               |          | C <sub>17</sub> H <sub>21</sub> N <sub>5</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub>  | 502.07078   |
| ✗                                      |                                   | Ethoxysulfuron       | 2-ethoxyphenyl [[[(4,6-dimethoxy-2-pyrimidinyl)amino]carbonyl]sulfonyl]sulfamate   |          | C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S               | 397.08233   |
| ✗                                      | Triazinylsulfonurea-Herbizide     | Iodosulfuron-methyl  | methyl 4-iodo-2-[[[(4-methoxy-6-methyl-1,3,5-triazin-2-yl)amino]carbonyl]amino]sulfonyl]benzoate                                 |          | C <sub>14</sub> H <sub>14</sub> IN <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S              | 505.96385   |
| ✗                                      | Nitril-Herbizide                  | loxynil              | 4-hydroxy-3,5-diiodobenzonitrile   |          | C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> I <sub>2</sub> NO                               | 369.8235    |
| ✗                                      |                                   | Bromoxynil           | 3,5-dibromo-4-hydroxybenzonitrile  |          | C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> Br <sub>2</sub> NO                              | 273.85096   |
| ✗                                      | Carbamat-Herbizide                | Phenmedipham         | 3-[[[(methoxycarbonyl)amino]phenyl N-(3-methylphenyl)carbamate   |          | C <sub>16</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub>                 | 299.10372   |
| ✗                                      | Thiocarbat-Herbizide              | EPTC                 | S-ethyl N,N-dipropylcarbamothioate   |          | C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> NOS  | 188.11145   |
| ✗                                      | Oxadiazol-Herbizide               | Oxadiazon            | 3-[2,4-dichloro-5-(1-methylethoxy)phenyl]-5-(1,1-dimethylethyl)-1,3,4-oxadiazol-2(3H)-one  |          | C <sub>15</sub> H <sub>18</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 343.06216   |
| ✗                                      | Triazol-Herbizide                 | Thiencarbazon-methyl | methyl 4-[[[(4,5-dihydro-3-methoxy-4-methyl-5-oxo-1H-1,2,4-triazol-1-yl)carbonyl]amino]sulfonyl]-5-methyl-3-thiophenecarboxylate |          | C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub>  | 389.0231    |
| ✗                                      | Cyclopropylisoxazol-Herbizide     | Isoxaflutol          | (5-cyclopropyl-4-isoxazolyl)[2-(trifluoromethyl)phenyl]methanone   |          | C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> F <sub>3</sub> NO <sub>4</sub> S              | 358.03662   |
| ✓ ✗                                    | Benzocyclohexanediol-Herbizide    | Tembotrion           | 2-[2-chloro-4-(methylsulfonyl)-3-[(2,2,2-trifluoroethoxy)methyl]benzoyl]-1,3-cyclohexanedione                                    |          | C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> ClF <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S             | 439.02353   |
| ✗                                      | Benzofuranalkylsulfonat-Herbizide | Ethofumesat          | 2-ethoxy-2,3-dihydro-3,3-dimethyl-5-benzofuranyl methanesulfonate  |          | C <sub>13</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> S                              | 285.0802    |
| ✓ ✗                                    | Amid-Herbizide                    | Fentrazamid          | 4-(2-chlorophenyl)-N-cyclohexyl-N-ethyl-4,5-dihydro-5-oxo-1H-tetrazole-1-carboxamide   |          | C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>               | 348.12326   |

| <i>in vitro</i><br>Hefe<br>Arabidopsis | Pestizidklasse                            | Xenobiotikum      | IUPAC   | Struktur | Summenformel  | Masse [m-H] |
|--|---|-------------------|---|----------|---|-------------|
| ✗                                      | Pyrimidinoyl-<br>benzoesäure<br>Herbizide | Bispyribac-sodium | sodium 2,6-bis[[4,6-dimethoxy-2-pyrimidinyl]oxy]benzoate                                    |          | C <sub>19</sub> H <sub>17</sub> N <sub>4</sub> NaO <sub>8</sub>             | 451.08714   |
| ✗                                      | organophosphatische<br>Herbizide          | Glufosinat        | 2-amino-4-(hydroxymethylphosphinyl)butanoic acid  |          | C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>5</sub> P                             | 168.00672   |
| ✓ ✓ ✓                                  | Herbizidsafener                           | Fenclorim         | 4,6-dichloro-2-phenylpyrimidine   |          | C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub>               | 222.98352   |
| ✓                                      |   | Benoxacor         | 4-(2,2-dichloroacetyl)-3,4-dihydro-3-methyl-2H-1,4-benzoxazine                              |          | C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>             | 258.0094    |
| ✓ ✓                                    | Triazin-<br>Fungizide                     | Anilazin          | 4,6-dichloro-N-(2-chlorophenyl)-1,3,5-triazin-2-amine                                       |          | C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>4</sub>                | 272.9507    |
| ✓                                      | Diphenyl-<br>Fungizide                    | Bithionol         | 2,2'-thiobis[4,6-dichlorophenol]  |          | C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S             | 352.87698   |
| ✗                                      | Urea-<br>Fungizide                        | Pencycuron        | N-[(4-chlorophenyl)methyl]-N-cyclopentyl-N'-phenylurea                                      |          | C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> ClN <sub>2</sub> O                          | 327.12695   |
| ✗ ✓                                    | aromatische Fungizide                     | Quintozen         | 1,2,3,4,5-pentachloro-6-nitrobenzene  |          | C <sub>6</sub> Cl <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>                              | 291.82989   |
| ✗                                      |   | Dicloran          | 2,6-dichloro-4-nitrobenzenamine   |          | C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> | 204.9577    |
| ✓                                      |   | Chloroneb         | 1,4-dichloro-2,5-dimethoxybenzene   |          | C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                | 204.98285   |
| ✓                                      | Quinon-Fungizide                          | Dichlon           | 2,3-dichloro-1,4-naphthalenedione   |          | C <sub>10</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>2</sub>               | 224.95155   |
| ✓ ✓                                    |   | Chloranil         | 2,3,5,6-tetrachlorocyclohexa-2,5-diene-1,4-dione  |          | C <sub>6</sub> Cl <sub>4</sub> O <sub>2</sub>                               | 242.85796   |
| ✓                                      | Conazol-Fungizide                         | Tebuconazol       | α-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-α-(1,1-dimethylethyl)-1H-1,2,4-triazole-1-ethanol               |          | C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O                          | 306.13785   |
| ✗                                      |   | Epoxiconazol      | rel-1-[[[(2R,3S)-3-(2-chlorophenyl)-2-(4-fluorophenyl)-2-oxiranyl]methyl]-1H-1,2,4-triazole |          | C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> ClFN <sub>3</sub> O                         | 328.06583   |
| ✗                                      |   | Triadimefon       | 1-(4-chlorophenoxy)-3,3-dimethyl-1-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-2-butanone                       |          | C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>3</sub> O <sub>2</sub>             | 292.08581   |
| ✓ ✗                                    |   | Fluquinconazol    | 3-(2,4-dichlorophenyl)-6-fluoro-2-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)-4(3H)-quinazolinone               |          | C <sub>16</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>3</sub> O            | 374.00171   |

| <i>in vitro</i><br>Hefe<br>Arabidopsis | Pestizidklasse                            | Xenobiotikum  | IUPAC  | Struktur | Summenformel  | Masse [m-H] |
|--|---|---------------|--|----------|---|-------------|
| ✓ ✓                                    | Phenylsulfamid-Fungizide                  | Tolyfluamid   | 1,1-dichloro- <i>N</i> -<br>[[dimethylamino)sulfonyl]-1-fluoro- <i>N</i> -<br>(4-methylphenyl)methanesulfenamide     |          | C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> | 344.97067   |
| ✓                                      |   | Dichlofluamid | 1,1-dichloro- <i>N</i> -<br>[[dimethylamino)sulfonyl]-1-fluoro- <i>N</i> -<br>phenylmethanesulfenamide               |          | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>  | 330.95502   |
| ✗                                      | Thiazol-<br>Fungizide                     | Thiabenzazol  | 2-(4-thiazolyl)-1 <i>H</i> -benzimidazole  |          | C <sub>10</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> S   | 200.02878   |
| ✗                                      | Benzimidazol-<br>ylcarbamat-<br>Fungizide | Carbendazim   | methyl <i>N</i> -1 <i>H</i> -benzimidazol-2-<br>ylcarbamate  |          | C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>                                   | 190.06219   |
| ✗ ✗                                    | Pyrethroidester-<br>Fungizide             | Permethrin    | (3-phenoxyphenyl)methyl 3-(2,2-<br>dichloroethenyl)-2,2-<br>dimethylcyclopropanecarboxylate                          |          | C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                                | 389.07166   |
| ✗                                      | Benzoylphenyl-<br>lurea-<br>Insektizide   | Triflumuron   | 2-chloro- <i>N</i> -[[[4-<br>(trifluoromethoxy)phenyl]amino]carb-<br>onyl]benzamide                                  |          | C <sub>15</sub> H <sub>10</sub> ClF <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                | 357.02591   |
| ✗                                      | Tetrensäure-Insektizide                   | Spirodiclofen | 3-(2,4-dichlorophenyl)-2-oxo-1-<br>oxaspiro[4.5]dec-3-en-4-yl 3,2,2-<br>dimethylbutanoate                            |          | C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>4</sub>                                | 409.09787   |
| ✓                                      |   | Spiromesifen  | 2-oxo-3-(2,4,6-trimethylphenyl)-1-<br>oxaspiro[4.4]non-3-en-4-yl 3,3-<br>dimethylbutanoate                           |          | C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>  | 369.20711   |
| ✓                                      | Carbamat-<br>Insektizide                  | Carbaryl      | 1-naphthalenyl <i>N</i> -methylcarbamate   |          | C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>   | 200.07169   |
| ✗                                      | Carbamat-Insektizide                      | Methiocarb    | 3,5-dimethyl-4-(methylthio)phenyl <i>N</i> -<br>methylcarbamate  |          | C <sub>11</sub> H <sub>15</sub> NO <sub>2</sub> S   | 224.07506   |
| ✗                                      |   | Thiodicarb    | dimethyl <i>N,N'</i> -<br>[thiobis((methylimino)carbonyloxy)]bi-<br>[ethanimidothioate]                              |          | C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> S <sub>3</sub>                  | 353.04173   |
| ✗                                      | Phenylpyrazol-<br>Insektizide             | Ethiprol      | 5-amino-1-[2,6-dichloro-4-<br>(trifluoromethyl)phenyl]-4-<br>(ethylsulfinyl)-1 <i>H</i> -pyrazole-3-<br>carbonitrile |          | C <sub>13</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>3</sub> N <sub>4</sub> OS               | 394.97533   |
| ✓                                      |   | Chloroxazon   | 5-chloro-3 <i>H</i> -benzooxazol-2-one   |          | C <sub>7</sub> H <sub>4</sub> ClNO <sub>2</sub>   | 167.98577   |
| ✗                                      |   | Sulfamerazin  | 4-amino- <i>N</i> -(4-methylpyrimidin-2-<br>yl)benzenesulfonamide  |          | C <sub>11</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S                               | 263.06081   |
| ✗                                      |   | Sulfamethazin | 4-Amino- <i>N</i> -(4,6-dimethyl-2-<br>pyrimidinyl)benzenesulfonamide  |          | C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> N <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S                               | 277.07646   |
| ✓                                      |   | Etacrynsäure  | [2,3-dichloro-4-(2-<br>methylenebutanoyl)phenoxy]acetic<br>acid  |          | C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>4</sub>                                | 301.00398   |

| in vitro<br>Hefe<br>Arabidopsis | Pestizidklasse | Xenobiotikum        | IUPAC                               | Struktur   | Summenformel                                  | Masse [m-H] |
|---------------------------------|----------------|---------------------|-------------------------------------|--|---|-------------|
| ✓<br>✓<br>✓                     |                | EPP                 | 1,2-Epoxy-3-(4-nitrophenoxy)propane |  | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> | 149.06079   |
| ✓                               |                | Benzylisothiocyanat |                                     |  | C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NS              | 148.02264   |

**Tabelle 6.9 Übersicht der spezifischen schwefelhaltigen Massen in *S. cerevisiae*, nach Exposition mit verschiedenen Xenobiotika.**

Hefekulturen waren in Medium mit leichtem oder schwerem Schwefel verschiedenen Xenobiotika für 1 h exponiert. Die proteinfreien Extrakte der Zellen wurden mittels ICR-FT/MS gemessen und auf spezifische Schwefelmassen hin analysiert. Diesen Massen wurde, wenn möglich, eine Summenformel im Rahmen von C<sub>10-80</sub>H<sub>n</sub>N<sub>3-20</sub>O<sub>6-50</sub>P<sub>0-10</sub>S<sub>1-5</sub>Cl<sub>0-5</sub>Br<sub>0-3</sub>F<sub>0-3</sub> zugeordnet, welche anschließend anhand der sieben Regeln von Kind und Fiehn überprüft wurde (Kind und Fiehn, 2007). Die Subtraktion der Summenformel von GSH (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S) erleichterte die Identifizierung der GSH-Konjugate, welche mit (x) markiert sind.

| Xenobiotikum | Summenformel  | Masse [m-H] | identifizierte Schwefelmassen  | Abweichung [ppm]         | Summenformel   | Summenformel -GSH   | GSH-Konjugat |
|--------------|---|-------------|--|--------------------------|--|---|--------------|
| Simazin      | C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>5</sub>                             | 200,07084   | 450,02977  | 0,38                     | C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub>   | C <sub>5</sub> N <sub>4</sub> S   |              |
| Cyanazin     | C <sub>6</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>6</sub>                             | 239,08173   | 417,91417  |                          |  |   |              |
| Fluorodifen  | C <sub>13</sub> H <sub>7</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | 327,023429  | 662,10869<br>559,0885<br>495,08043   | 0,102<br>-0,306<br>0,272 | C <sub>31</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>12</sub> S<br>C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub> F <sub>2</sub><br>C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> SF <sub>3</sub> | C <sub>21</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub><br>C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> N <sub>3</sub> OSF <sub>2</sub><br>C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> F <sub>3</sub> | x            |
| Alachlor     | C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> ClNO <sub>2</sub>                           | 268,11097   | 821,51656<br>633,59189<br>582,88776<br>487,22267<br>480,27427<br>462,20248<br>440,27875<br>413,63113<br>390,17491<br>374,18307<br>360,94392<br>350,09985<br>347,24367<br>331,06161 |                          |  |   |              |
| Metolachlor  | C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>2</sub>                           | 282,12661   | 919,28752<br>725,23656<br>488,21952<br>437,85229<br>417,17499<br>399,12895<br>398,21553<br>393,21641<br>364,35811<br>347,24408<br>333,22424<br>330,14205<br>324,15637              |                          |  |   |              |
| Propachlor   | C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> ClNO  | 210,0691    | 823,12428<br>756,40741<br>579,15268  |                          |  |   |              |

| Xenobiotikum | Summenformel  | Masse [m-H] | identifizierte Schwefelmassen   | Abweichung [ppm]   | Summenformel  | Summenformel -GSH  | GSH-Konjugat |
|--------------|---|-------------|---|--|---|--|--------------|
|              |   |             | 519,13255<br>500,24822<br>482,17969<br>481,176255<br>395,17181<br>369,15274<br>358,16179<br>351,05756<br>343,11838<br>308,6112  | 0,018  | C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S   | C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> NO   | x            |
| Propanil     | C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> Cl <sub>2</sub> NO  | 215,99883   | 892,38704<br>870,06878<br>853,53104<br>440,20555<br>413,42444<br>362,13585<br>350,91931<br>348,50932<br>331,08156<br>322,27298<br>317,07899<br>311,10244  |  |   |  |              |
| Fenclozim    | C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub>                                 | 222,98352   | 676,14223<br>600,13469<br>566,99742<br>557,05368<br>532,04672<br>494,09075<br>478,05976   | -0,488<br>-0,141<br>0,373  | C <sub>15</sub> H <sub>40</sub> N <sub>5</sub> O <sub>18</sub> S <sub>2</sub> Cl<br>C <sub>16</sub> H <sub>44</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> S <sub>5</sub> Cl<br>C <sub>22</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub>   | C <sub>9</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>12</sub> SCl<br>C <sub>6</sub> H <sub>28</sub> O <sub>2</sub> S <sub>4</sub> Cl<br>C <sub>12</sub> H <sub>2</sub> NSCl <sub>2</sub>   |              |
|              |   |             | 532,04672<br>494,09075<br>478,05976   | -0,162<br>0,185<br>0,411   | C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> N <sub>3</sub> O <sub>11</sub> S <sub>2</sub> Cl<br>C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> SCl<br>C <sub>16</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S <sub>2</sub>  | C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>5</sub> SCl<br>C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> Cl<br>C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub> S   | x            |
| Anilazin     | C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>4</sub>                                  | 272,9507    | 582,01374<br>544,05817<br>508,08144<br>417,01235<br>407,07903   | -0,064<br>-0,008   | C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> SCl <sub>3</sub><br>C <sub>19</sub> H <sub>21</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub> SCl <sub>2</sub>  | C <sub>8</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> OCl <sub>3</sub><br>C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> N <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>  | x            |
| Bithionol    | C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>4</sub> O <sub>2</sub> S                               | 352,87698   | 727,19523   |  |   |  |              |
| Quintozen    | C <sub>6</sub> Cl <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>  | 291,82989   | 407,01653   |  |   |  |              |
| Tolylfuanid  | C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> | 344,97067   | 693,07278<br>675,91855<br>655,11698<br>604,06968<br>576,33253<br>573,35793<br>564,1826<br>563,08873<br>524,01221<br>480,20212<br>467,09108<br>465,20224<br>438,19149<br>409,08559<br>408,10829<br>400,103<br>393,10853<br>332,0921<br>327,05473 | 0,161<br>-0,077<br>-0,149<br>-0,403<br>0,203<br>-0,446<br>-0,125<br>-0,016<br>-0,251<br>-0,476<br>-0,166<br>-0,311<br>0,153<br>-0,359<br>-0,08<br>-0,248 | C <sub>26</sub> H <sub>23</sub> N <sub>6</sub> O <sub>12</sub> S <sub>2</sub> F<br>C <sub>25</sub> H <sub>7</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub> SCl <sub>2</sub> F <sub>2</sub><br>C <sub>22</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>15</sub> S <sub>2</sub><br>C <sub>28</sub> H <sub>20</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> SCl<br>C <sub>27</sub> H <sub>51</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> S<br>C <sub>21</sub> H <sub>56</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> SClF<br>C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> N <sub>6</sub> O <sub>7</sub> SCl <sub>2</sub><br>C <sub>19</sub> H <sub>35</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S<br>C <sub>15</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub><br>C <sub>18</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> S<br>C <sub>17</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> S<br>C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub><br>C <sub>14</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S<br>C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S<br>C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> S<br>C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S | C <sub>16</sub> H <sub>7</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> SF<br>C <sub>15</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> F <sub>2</sub><br>C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>9</sub> S<br>C <sub>18</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> OCl<br>C <sub>17</sub> H <sub>35</sub> O <sub>2</sub><br>C <sub>11</sub> H <sub>40</sub> N <sub>3</sub> ClF<br>C <sub>10</sub> H <sub>10</sub> N <sub>3</sub> OCl <sub>2</sub><br>C <sub>9</sub> H <sub>19</sub> O <sub>3</sub><br>C <sub>5</sub> H <sub>8</sub> NO <sub>3</sub> S<br>C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> NO <sub>2</sub><br>C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> O <sub>2</sub><br>C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> NOS<br>C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> O <sub>3</sub><br>C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub><br>C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>2</sub><br>C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> |              |
| EPP          | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>   | 149,06079   | 815,5622<br>592,0779<br>544,33115<br>494,10065<br>458,15107<br>457,14805<br>456,14463<br>451,10133<br>417,07454   | 0,038  | C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> S   | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub>  | x            |

| Xenobiotikum        | Summenformel                     | Masse [m-H] | identifizierte Schwefelmassen   | Abweichung [ppm]        | Summenformel  | Summenformel -GSH   | GSH-Konjugat |
|---------------------|----------------------------------|-------------|---|-------------------------|---|---|--------------|
|                     |                                  |             | 384,13192<br>355,1245<br>328,48087<br>314,45974   |                         |   |   |              |
| Benzylisothiocyanat | C <sub>8</sub> H <sub>7</sub> NS | 148,02264   | 712,20954<br>689,01639<br>653,14007<br>627,01865<br>591,03945<br>575,06565<br>471,10138<br>455,09358<br>424,15481 | 0,027<br>0,017<br>0,065 | C <sub>18</sub> H <sub>24</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub><br>C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub><br>C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> NOS<br>C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NS<br>C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> | x            |

**Tabelle 6.10 Übersicht der spezifischen schwefelhaltigen Massen *in vitro*, nach Inkubation verschiedener Xenobiotika mit GSH.**

Substanzen wurden mit einem Überschuss von GSH bei pH 9 für 24 h bei RT inkubiert. Die Lösungen wurden anschließend in einer 1:200 Verdünnung und 50 Scans mittels ICR-FT/MS analysiert. Massen, die unique für eine Belastung waren, wurden auf das Vorkommen von Schwefel mit der natürlichen Abundanz von 4 % hin untersucht. Den positiv selektierten Massen wurde eine Summenformel im Rahmen von C<sub>10-80</sub>H<sub>n</sub>N<sub>3-20</sub>O<sub>6-50</sub>P<sub>0-10</sub>S<sub>1-5</sub>Cl<sub>0-5</sub>Br<sub>0-3</sub>F<sub>0-3</sub> zugeordnet, welche anschließend anhand der sieben Regeln von Kind und Fiehn überprüft wurde (Kind und Fiehn, 2007). Die Subtraktion der Summenformel von GSH (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S) erleichterte die Identifizierung der GSH-Konjugate, welche mit (x) markiert sind.

| Xenobiotikum  | Summenformel  | Masse [m-H] | identifizierte Schwefelmassen   | Abweichung [ppm]          | Summenformel   | Summenformel -GSH  | GSH-Konjugat |
|---------------|---|-------------|---|---------------------------|--|--|--------------|
| 2,4-D         | C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                | 218,96211   | 480,87522<br>464,9077   |                           |  |  |              |
| Atrazin       | C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> ClN <sub>5</sub>                             | 214,08648   | 485,19373   | 0,211                     | C <sub>18</sub> H <sub>30</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub> S  | C <sub>8</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub>  | x            |
| Simazin       | C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>5</sub>                             | 200,07084   | 471,17812   | 0,303                     | C <sub>17</sub> H <sub>28</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub> S  | C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> N <sub>5</sub>  | x            |
| Terbuthylazin | C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>5</sub>                             | 228,10213   | 499,209314  | 0,073                     | C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub> S  | C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>5</sub>  | x            |
| Sebuthylazin  | C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>5</sub>                             | 228,10215   | 499,19221   | 0,105                     | C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub> S  | C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>5</sub>  | x            |
| Propazin      | C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>5</sub>                             | 228,102147  | 499,209314  | 0,073                     | C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> N <sub>8</sub> O <sub>6</sub> S  | C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>5</sub>  | x            |
| Cyanazin      | C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>6</sub>                             | 239,08173   | 817,27341<br>532,17095<br>510,1891  | -0,159<br>0,438           | C <sub>15</sub> H <sub>32</sub> N <sub>9</sub> O <sub>6</sub> SCI<br>C <sub>19</sub> H <sub>29</sub> N <sub>9</sub> O <sub>6</sub> S   | C <sub>5</sub> H <sub>16</sub> N <sub>6</sub> O <sub>2</sub> Cl<br>C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>6</sub>                             | x            |
| Acifluorfen   | C <sub>14</sub> H <sub>9</sub> ClF <sub>3</sub> NO <sub>5</sub>             | 362,00484   | 720,9861<br>457,96605<br>395,96563<br>359,98731<br>318,00354<br>315,99791 | 0,122                     | C <sub>14</sub> H <sub>4</sub> N <sub>5</sub> O <sub>8</sub> SF <sub>3</sub>   | C <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> F <sub>3</sub>  |              |
| Fluorodifen   | C <sub>13</sub> H <sub>7</sub> F <sub>3</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> | 327,023429  | 802,16504<br>596,02324<br>533,03642<br>517,06243<br>495,080395            | -0,059<br>0,201           | C <sub>18</sub> H <sub>20</sub> N <sub>5</sub> O <sub>11</sub> S <sub>3</sub> F<br>C <sub>17</sub> H <sub>19</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub> SF <sub>3</sub>   | C <sub>8</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> S <sub>2</sub> F<br>C <sub>7</sub> H <sub>3</sub> NO <sub>2</sub> F <sub>3</sub> | x            |
| Alachlor      | C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> ClNO <sub>2</sub>                           | 268,11097   | 561,20023<br>539,2182   | -0,071<br>0,164           | C <sub>20</sub> H <sub>39</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> SCI<br>C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> S  | C <sub>10</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub><br>C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>2</sub>   | x<br>x       |
| Metolachlor   | C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>2</sub>                           | 282,12661   | 553,23392   | 0,286                     | C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> S  | C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>2</sub>  | x            |
| Propachlor    | C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> ClNO  | 210,0691    | 788,26029<br>565,12873<br>555,09991<br>503,15816<br>481,17625             | -0,203<br>-0,486<br>0,007 | C <sub>21</sub> H <sub>34</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S <sub>4</sub><br>C <sub>17</sub> H <sub>33</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub> SCI<br>C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S | C <sub>11</sub> H <sub>18</sub> NS <sub>3</sub><br>C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub> Cl<br>C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> NO   | x<br>x       |
| Mefenacet     | C <sub>16</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S             | 297,07031   | 453,14495   | 0,008                     | C <sub>19</sub> H <sub>26</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S  | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> NO  | x            |
| Tembotriol    | C <sub>17</sub> H <sub>16</sub> ClF <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S           | 439,02353   | 443,02494<br>442,02405<br>441,02691<br>440,024                            | 0,168                     | C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub> F   | C <sub>3</sub> O <sub>3</sub> SF   |              |

| Xenobiotikum   | Summenformel   | Masse [m-H] | identifizierte Schwefelmassen   | Abweichung [ppm]                          | Summenformel  | Summenformel -GSH   | GSH-Konjugat |
|----------------|--|-------------|---|---|---|---|--------------|
|                |  |             | 439,02342<br>406,05448<br>405,04639<br>404,04032<br>403,04688<br>328,01891  | -0,011                                    | C <sub>11</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub> F <sub>2</sub>   | CHOSF <sub>2</sub>  |              |
| Fentrazamid    | C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> ClN <sub>5</sub> O <sub>2</sub>                              | 348,12326   | 459,19198   | 0,182                                     | C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S   | C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> NO   | x            |
| Fenclozim      | C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub>                                | 222,98352   | 504,15637<br>494,09075<br>476,08043   | 0,185                                     | C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> Cl  | C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> ClN <sub>2</sub>   | x            |
| Benoxacor      | C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> NO <sub>2</sub>                              | 258,0094    | 539,18184<br>441,60267  | 0,136                                     | C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub> S   | C <sub>13</sub> H <sub>16</sub> NO <sub>3</sub>   | x            |
| Anilazin       | C <sub>9</sub> H <sub>5</sub> Cl <sub>3</sub> N <sub>4</sub>                                 | 272,9507    | 635,99378<br>542,06902<br>508,081435<br>407,0789<br>358,0478  | -0,082<br>-0,27<br>0,145                  | C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> N <sub>7</sub> O <sub>14</sub> Cl <sub>3</sub><br>C <sub>20</sub> H <sub>28</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> Cl <sub>3</sub><br>C <sub>16</sub> H <sub>23</sub> N <sub>5</sub> O <sub>10</sub> S <sub>2</sub>  | C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> Cl <sub>3</sub><br>C <sub>10</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>3</sub><br>C <sub>6</sub> H <sub>7</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S   |              |
| Chloroneb      | C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                 | 204,98285   | 497,5655<br>407,01914   |   |   |   |              |
| Dichlon        | C <sub>10</sub> H <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>2</sub>                                | 224,95155   | 787,15644<br>581,15624<br>514,07755<br>478,09269<br>464,05351<br>460,08209<br>458,06646<br>457,1069333<br>442,07153<br>363,02929<br>331,03933<br>331,01962<br>329,02378 | 0,11<br>-0,205<br>0,169<br>0,213<br>0,232 | C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S<br>C <sub>16</sub> H <sub>20</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> Cl<br>C <sub>20</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> S<br>C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> S<br>C <sub>20</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S                            | C <sub>10</sub> H <sub>5</sub> O <sub>3</sub><br>C <sub>6</sub> H <sub>4</sub> O <sub>3</sub><br>C <sub>10</sub> H <sub>3</sub> O <sub>2</sub><br>C <sub>10</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub><br>C <sub>10</sub> HO   | x<br>x       |
| Chloranil      | C <sub>6</sub> Cl <sub>4</sub> O <sub>2</sub>  | 242,85796   | 616,06656<br>519,01346<br>503,01852<br>485,008<br>442,429<br>437,04091<br>364,08205   | 0,104                                     | C <sub>12</sub> H <sub>19</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> S   | C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>  | x            |
| Tebuconazol    | C <sub>16</sub> H <sub>22</sub> ClN <sub>3</sub> O   | 306,13785   | 590,4098<br>562,37827<br>427,2118<br>401,65268<br>352,14337<br>342,1145   |   |   |   |              |
| Fluquinconazol | C <sub>16</sub> H <sub>8</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>5</sub> O                             | 374,00171   | 791,07949<br>790,07575<br>616,04692<br>614,05<br>516,99717<br>464,0683<br>346,99834<br>345,00127<br>338,95674<br>326,98327<br>325,98158<br>324,98617<br>323,99261       | -0,282<br>-0,113<br>-0,262<br>0,273       | C <sub>15</sub> H <sub>26</sub> N <sub>7</sub> O <sub>10</sub> S <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> F<br>C <sub>16</sub> H <sub>28</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> S <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> F<br>C <sub>11</sub> H <sub>21</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> F<br>C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> SF | C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>4</sub> SCl <sub>2</sub> F<br>C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> N <sub>4</sub> OS <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> F<br>CH <sub>5</sub> N <sub>3</sub> S <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub> F<br>C <sub>8</sub> N <sub>2</sub> OF |              |
| Dichlofluanid  | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> | 330,95502   | 474,08805<br>394,0748<br>350,04859  | -0,047                                    | C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub>  | C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> OS  |              |
| Spiromesifen   | C <sub>23</sub> H <sub>30</sub> O <sub>4</sub>   | 369,20711   | 580,175535<br>405,1531  |   |   |   |              |

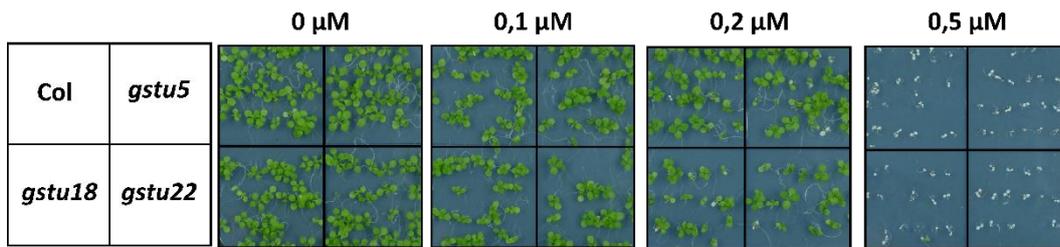
| Xenobiotikum | Summenformel   | Masse [m-H] | identifizierte Schwefelmassen  | Abweichung [ppm]               | Summenformel  | Summenformel -GSH  | GSH-Konjugat |
|--------------|--|-------------|--|--------------------------------|---|--|--------------|
|              |  |             | 314,02052  |                                |   |  |              |
| Carbaryl     | C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>2</sub>                | 200,07169   | 668,16654<br>539,12372<br>443,05495<br>329,02379<br>317,06422  | 0,311                          | C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> S <sub>2</sub>   | C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>4</sub> S  |              |
| Chlorzoxazon | C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> ClNO <sub>2</sub>                | 167,98577   | 327,03341  |                                |   |  |              |
| Etacrynsäure | C <sub>13</sub> H <sub>12</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>4</sub> | 301,00398   | 632,06721<br>610,08527<br>607,00972<br>492,10391<br>422,07797<br>382,9765                            | -0,267                         | C <sub>24</sub> H <sub>18</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub> SCl <sub>2</sub>  | C <sub>14</sub> H <sub>2</sub> NO <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub>   |              |
| EPP          | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>                  | 149,06079   | 801,17627<br>782,33684<br>763,22909<br>557,08762<br>554,12172<br>540,09723<br>515,21826<br>478,12666 | 0,1<br>0,024<br>0,036<br>0,288 | C <sub>36</sub> H <sub>42</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub> S <sub>4</sub><br>C <sub>37</sub> H <sub>40</sub> N <sub>4</sub> O <sub>12</sub> S<br>C <sub>19</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S <sub>4</sub><br>C <sub>22</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S | C <sub>26</sub> H <sub>26</sub> NO <sub>3</sub> S <sub>3</sub><br>C <sub>27</sub> H <sub>24</sub> NO <sub>6</sub><br>C <sub>9</sub> H <sub>15</sub> OS <sub>3</sub><br>C <sub>12</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>2</sub> |              |

**Tabelle 6.11 Übersicht der spezifischen schwefelhaltigen Massen in *A. thaliana*, nach Exposition von Keimlingen in Flüssigkultur gegenüber verschiedenen Xenobiotika.**

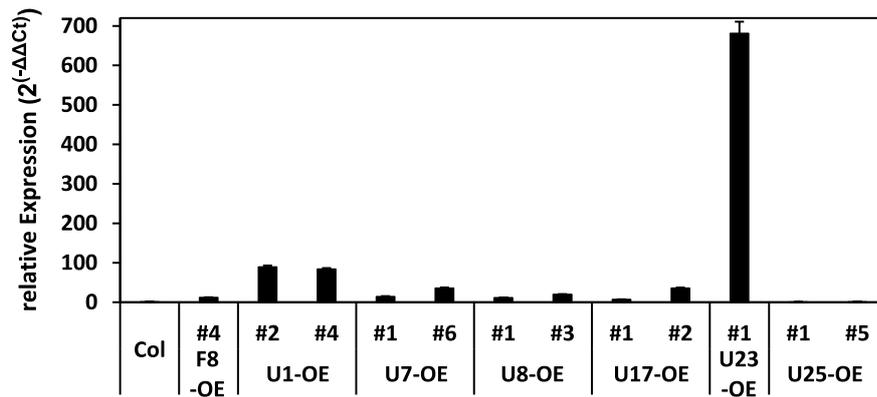
Arabidopsis-Keimlinge wurden 10 d auf MS-Platten angezogen und anschließend je 15 Keimlinge in 15 ml ¼ MS ohne Zucker überführt. Nach 24 h auf dem Schüttler wurden die Keimlinge 8 h mit 100 µM eines Xenobiotikas belastet, geerntet und proteinfreien Extrakte mittels ICR-FT/MS analysiert. Für eine Belastung spezifische Massen, die aufgrund der natürlichen Abundanz von <sup>34</sup>S als Schwefelmassen identifiziert wurden, wurden einer putativen Summenformel, die der Zusammensetzung C<sub>10-80</sub>H<sub>n</sub>N<sub>3-20</sub>O<sub>6-50</sub>P<sub>0-10</sub>S<sub>1-5</sub>Cl<sub>0-5</sub>Br<sub>0-3</sub>F<sub>0-3</sub> entsprechen konnte, zugeordnet. Von dieser wurde die Summenformel von GSH (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>N<sub>3</sub>O<sub>6</sub>S) abgezogen und mit dem ursprünglich eingesetzten Substrat verglichen. Als möglich eingestufte GSH-Konjugate wurden mit (x) in der Tabelle markiert. In einem Fall wurde die korrekte Masse des GSH-Konjugates identifiziert, konnte jedoch aufgrund zu hoher Abweichungen nicht der korrekten Summenformel zugeordnet werden (?).

| Xenobiotikum | Summenformel   | Masse [m-H] | identifizierte Schwefelmassen  | Abweichung [ppm]                              | Summenformel  | Summenformel -GSH  | GSH-Konjugat |
|--------------|--|-------------|--|---|---|--|--------------|
| 2,4-D        | C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 218,96211   | 529,08114<br>478,99186<br>446,00767<br>319,91365   | -0,366<br>0,263                               | C <sub>11</sub> H <sub>32</sub> N <sub>4</sub> O <sub>11</sub> S <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub><br>C <sub>14</sub> H <sub>13</sub> N <sub>4</sub> O <sub>11</sub> SCl   | CH <sub>16</sub> NO <sub>5</sub> SCl <sub>2</sub><br>C <sub>4</sub> NO <sub>5</sub> Cl   |              |
| Simazin      | C <sub>7</sub> H <sub>12</sub> ClN <sub>5</sub>              | 200,07084   | 669,0859<br>614,0286<br>536,86769<br>494,0703<br>486,99211<br>462,07342  | -0,085<br>-0,24<br>-0,139                     | C <sub>27</sub> H <sub>22</sub> N <sub>3</sub> O <sub>6</sub> S <sub>3</sub> Cl<br>C <sub>13</sub> H <sub>21</sub> N <sub>9</sub> O <sub>6</sub> S <sub>3</sub><br>C <sub>12</sub> H <sub>23</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub> SCl <sub>2</sub>   | C <sub>17</sub> H <sub>6</sub> S <sub>2</sub> Cl<br>C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> N <sub>6</sub> S <sub>2</sub><br>C <sub>2</sub> H <sub>7</sub> N <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub>  |              |
| Terbutylazin | C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>5</sub>              | 228,10213   | 629,10083<br>562,06723<br>546,05496<br>508,08121<br>491,98233<br>479,10803<br>472,96586<br>465,10087<br>463,93096<br>457,00131<br>451,05979<br>409,97931 | -0,122<br>-0,189<br>-0,298<br>0,436<br>-0,238 | C <sub>22</sub> H <sub>27</sub> N <sub>8</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub> Cl<br>C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> N <sub>5</sub> O <sub>13</sub> SCl<br>C <sub>19</sub> H <sub>20</sub> N <sub>7</sub> O <sub>6</sub> SCl<br>C <sub>12</sub> H <sub>26</sub> N <sub>7</sub> O <sub>9</sub> SCl<br>C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub> | C <sub>12</sub> H <sub>11</sub> N <sub>5</sub> O <sub>2</sub> SCl<br>C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> N <sub>2</sub> O <sub>7</sub> Cl<br>C <sub>9</sub> H <sub>4</sub> N <sub>4</sub> Cl<br>C <sub>2</sub> H <sub>10</sub> N <sub>4</sub> O <sub>3</sub> Cl<br>C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> S |              |
| Sebutylazin  | C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>5</sub>              | 228,10215   | 598,02625  | -0,158  | C <sub>25</sub> H <sub>18</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub> Cl   | C <sub>15</sub> H <sub>2</sub> N <sub>2</sub> O <sub>5</sub> Cl  |              |

| Xenobiotikum | Summenformel  | Masse [m-H] | identifizierte Schwefelmassen  | Abweichung [ppm]                           | Summenformel   | Summenformel -GSH   | GSH-Konjugat |
|--------------|---|-------------|--|--|--|---|--------------|
|              |   |             | 549,06681<br>499,20933<br>463,99128  | -0,035<br>0,105                            | C <sub>15</sub> H <sub>27</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub> Cl<br>C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S   | C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> Cl<br>C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> N <sub>5</sub>   | x            |
| Propazin     | C <sub>9</sub> H <sub>16</sub> ClN <sub>5</sub>   | 228,102147  | 656,15726<br>561,08675<br>505,02402<br>492,11514<br>480,06415<br>477,11582                                       | -0,054<br>0,346<br>0,1                     | C <sub>22</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub><br>C <sub>15</sub> H <sub>31</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S <sub>3</sub><br>C <sub>14</sub> H <sub>22</sub> N <sub>6</sub> O <sub>9</sub> S  | C <sub>12</sub> H <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub> S<br>C <sub>5</sub> H <sub>15</sub> O <sub>3</sub> S <sub>2</sub><br>C <sub>4</sub> H <sub>6</sub> N <sub>5</sub> O <sub>3</sub>   |              |
| Cyanazin     | C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> ClN <sub>6</sub>   | 239,08173   | 708,20848<br>594,15873<br>562,04207<br>535,03765<br>510,18887<br>492,1074<br>488,99517<br>485,92184<br>480,93766 | -0,083<br>-0,013<br>0,058                  | C <sub>13</sub> H <sub>26</sub> N <sub>3</sub> O <sub>15</sub> S <sub>2</sub> Cl<br>C <sub>19</sub> H <sub>29</sub> N <sub>6</sub> O <sub>6</sub> S<br>C <sub>16</sub> H <sub>24</sub> N <sub>7</sub> O <sub>7</sub> SCl   | C <sub>3</sub> H <sub>10</sub> O <sub>9</sub> S<br>C <sub>9</sub> H <sub>13</sub> N <sub>6</sub><br>C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> N <sub>4</sub> OCl  | x            |
| Alachlor     | C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> ClNO <sub>2</sub>   | 268,11097   | 561,2004<br>539,21837<br>395,16473   | 0,232<br>0,479                             | C <sub>20</sub> H <sub>39</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> S<br>C <sub>24</sub> H <sub>36</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S  | C <sub>10</sub> H <sub>23</sub> NO <sub>4</sub> Cl<br>C <sub>14</sub> H <sub>20</sub> NO <sub>2</sub>   | x            |
| Metolachlor  | C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> ClNO <sub>2</sub>   | 282,12661   | 553,23397  | 0,377                                      | C <sub>25</sub> H <sub>38</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> S  | C <sub>15</sub> H <sub>22</sub> NO <sub>2</sub>   | x            |
| Propachlor   | C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> ClNO  | 210,0691    | 582,12804<br>579,15341<br>519,13228<br>503,15832<br>481,176445<br>381,11263<br>337,1227467                       | 0,003<br>0,156<br>0,174<br>-0,168<br>0,413 | C <sub>17</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>15</sub> S <sub>2</sub><br>C <sub>22</sub> H <sub>33</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> S<br>C <sub>20</sub> H <sub>29</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S<br>C <sub>17</sub> H <sub>33</sub> N <sub>4</sub> O <sub>9</sub> S<br>C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> N <sub>4</sub> O <sub>7</sub> S | C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub> S<br>C <sub>12</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>4</sub> Cl<br>C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> NO <sub>2</sub> Cl<br>C <sub>7</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub> Cl<br>C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> NO    | x            |
| Dicamba      | C <sub>8</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> O <sub>3</sub>                                  | 218,96211   | 660,13391<br>654,16752<br>544,09634<br>539,16736<br>534,06755<br>495,06803<br>484,12172<br>478,09355             | 0,004<br>0,157<br>-0,1                     | C <sub>20</sub> H <sub>40</sub> N <sub>3</sub> O <sub>13</sub> S <sub>3</sub> Cl<br>C <sub>16</sub> H <sub>33</sub> N <sub>3</sub> O <sub>9</sub> S <sub>2</sub> Cl <sub>2</sub><br>C <sub>20</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub>   | C <sub>10</sub> H <sub>24</sub> O <sub>7</sub> S <sub>2</sub> Cl<br>C <sub>6</sub> H <sub>17</sub> O <sub>3</sub> S<br>C <sub>10</sub> H <sub>11</sub> OS   |              |
| Fencloirim   | C <sub>10</sub> H <sub>6</sub> Cl <sub>2</sub> N <sub>2</sub>                                 | 222,98352   | 494,0909325<br>429,05292<br>419,02412  | 0,14                                       | C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> N <sub>3</sub> O <sub>10</sub> S <sub>2</sub>  | C <sub>7</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub> S  | ?            |
| Chloranil    | C <sub>6</sub> Cl <sub>4</sub> O <sub>2</sub>   | 242,85796   | 458,75343<br>410,92062   |  |  |   |              |
| Tolyfluanid  | C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> Cl <sub>2</sub> FN <sub>2</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub> | 344,97067   | 636,20518<br>596,06792<br>563,08894<br>434,06628<br>425,08067<br>422,04781<br>420,03544                          | 0,089<br>-0,18<br>-0,052<br>0,089          | C <sub>17</sub> H <sub>40</sub> N <sub>5</sub> O <sub>17</sub> SF<br>C <sub>15</sub> H <sub>34</sub> N <sub>5</sub> O <sub>6</sub> S <sub>4</sub> Cl <sub>2</sub> F<br>C <sub>23</sub> H <sub>21</sub> N <sub>4</sub> O <sub>10</sub> SF<br>C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> N <sub>4</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub>                                   | C <sub>7</sub> H <sub>24</sub> N <sub>2</sub> O <sub>11</sub> F<br>C <sub>10</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> S <sub>3</sub> Cl <sub>2</sub> F<br>C <sub>13</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>4</sub> F<br>C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> NO <sub>2</sub> S |              |
| EPP          | C <sub>9</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub>   | 149,06079   | 554,12152<br>457,14812<br>456,14463<br>394,03682<br>368,05746<br>356,08095<br>333,07621                          | 0,28                                       | C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> N <sub>3</sub> O <sub>8</sub> S  | C <sub>9</sub> H <sub>11</sub> O <sub>2</sub>   | x            |



**Abbildung 6.1 Arabidopsis WT und KO-Linien auf Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen ATZ.** Samen von WT und homozygoten KO-Linien wurden sterilisiert und auf  $\frac{1}{4}$  MS-Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen ATZ ausgebracht. Nach 24 h bei 4 °C wurden die Pflanzen für 11 d bei 22 °C unter Langtagbedingungen (16 h Licht,  $180 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) kultiviert.



**Abbildung 6.2 Expression von GSTs in *A. thaliana*.**

Keimlinge der segregierenden T2-Generation wurden auf  $\frac{1}{4}$  MS-Medium angezogen und nach 11 d im Dauerlicht auf die Expression der GST, die unter der Kontrolle des 35S-Promotors stand, mittels qPCR untersucht. Die Expression des jeweiligen Gens wurde im Vergleich zu Col-0 betrachtet. Als Referenzgen diente UBC9. Die Analyse erfolgte in drei technischen Replikaten.

## **VIELEN DANK an**

Prof. Dr. Erwin Grill für die Betreuung dieser Doktorarbeit. Danke schön für das Verständnis, die große Geduld und den wissenschaftlichen Freiraum, den Sie mir eingeräumt haben.

die Mitarbeiter der Arbeitsgruppe der analytischen Biogeochemie am Helmholtz Zentrum München. Vor allem Prof. Dr. Philippe Schmitt-Kopplin und Dr. Basem Kanawati gebührt Dank für die fachliche und technische Hilfe im Umgang mit der FT-MS.

Dr. Thilo Rühle von der LMU für die Einführung und die Bereitstellung der ImagingPAM, ohne die die Bestimmung der Chlorophyllfluoreszenz nicht möglich gewesen wäre.

Tobias Kubo vom Anorganisch-chemischen Institut für die Synthese des <sup>34</sup>S-Sulfats.

Dr. Farhah Assaad für die Bemühungen, uns zu besseren wissenschaftlichen Autoren auszubilden.

Beate Seeliger dafür, dass sie alle bürokratischen Probleme verschwinden lässt.

alle Gärtner und technischen Angestellten, die diesen Lehrstuhl am Laufen halten. Irgendwie.

den bezaubernden Sebastian Scholz fürs Korrekturlesen und ein mildes Urteil (von Versorgung mit Kaffee, Gin und Tabakrauch ganz zu schweigen).

Moritz Ruschhaupt für das physische und psychische Köpfchen-Streicheln.

Christian Wunschel für die Bereitstellung seines proteinbiochemischen Wissens, seiner Expertise am Grill, seines Schubladeninhalts und seiner Fahrkünste.

Dr. Katharina Gläser-Wellmann für die Hilfe und Unterstützung – auch außerhalb des Labors. Deine Freundschaft hat mir den Anfang um so vieles leichter gemacht und mich mit München versöhnt.

alle anderen Mitarbeiter und Doktoranden am Lehrstuhl sowie meine ehemaligen Studenten für die Hilfe, den wissenschaftlichen Austausch, sehr viele gemeinsame Biere, noch mehr Kaffee und ein phantastisches Arbeitsumfeld.

Sebastian und meine Familie.

## LEBENS LAUF

### Persönliche Daten

---

|                     |                          |
|---------------------|--------------------------|
| Name                | Natalie Agnes Kowalski   |
| Geburtsdatum        | 03.02.1985               |
| Geburtsort          | Schwientochlowitz, Polen |
| Staatsangehörigkeit | deutsch                  |

### Ausbildung und Studium

---

|                   |  |
|-------------------|--|
| seit 01/2011      | Promotion an der Technischen Universität München<br>Wissenschaftlicher Mitarbeiter am Lehrstuhl für Botanik<br>Titel der Dissertation: Charakterisierung der Glutathiontransferasen aus <i>Arabidopsis thaliana</i>  |
| 10/2007 – 08/2010 | Master-Studium Biologie, Westfälische Wilhelms-Universität Münster<br>Abschluss: M.Sc.<br>Titel der Abschlussarbeit: Identifizierung und Charakterisierung von Enzymen der Kautschukbiosynthese in <i>Taraxacum koksaghyz</i>                                  |
| 10/2004 – 08/2007 | Bachelor-Studium Biowissenschaften, Westfälische Wilhelms-Universität Münster, Abschluss: B.Sc.<br>Titel der Abschlussarbeit: Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen zwischen Transkriptionsfaktoren der Stickstoffregulation in <i>Fusarium fujikuroi</i> |
| 08/1995 – 07/2004 | Städtisches Gymnasium Selm, Abschluss: Abitur  |

### Praktika

---

|                   |  |
|-------------------|--|
| 10/2008 – 03/2009 | Praktikum bei Bayer CropScience, Monheim<br>Abteilung: Biology Fungicides; Labor: Mycology and Project Support |
|-------------------|--|

### Publikationen

---

**Krajewski, M.P., Kanawati, B., Fekete, A., Kowalski, N., Schmitt-Kopplin, P. and Grill, E.** (2013) Analysis of Arabidopsis glutathione-transferases in yeast. *Phytochemistry*, 91, 198–207.

**Post, J., van Deenen, N., Fricke, J., Kowalski, N., Wurbs, D., Schaller, H., Eisenreich, W., Huber, C., Twyman, R.M., Prüfer, D. and Gronover, C.S.** (2012) Laticifer-Specific cis-Prenyltransferase Silencing Affects the Rubber, Triterpene, and Inulin Content of *Taraxacum brevicorniculatum*. *PLANT PHYSIOLOGY*, 158, 1406–1417.

**Wahler, D., Colby, T., Kowalski, N.A., Harzen, A., Wotzka, S.Y., Hillebrand, A., Fischer, R., Helsen, J., Schmidt, J., Schulze Gronover, C. and Prüfer, D.** (2012) Proteomic analysis of latex from the rubber-producing plant *Taraxacum brevicorniculatum*. *Proteomics*, 12, 901–905.