

Biochemische und physiologische Charakterisierung des pflanzlichen Purinabbaus

Dissertation
zur Erlangung des Grades des Doktors
der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

eingereicht im Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von:

Andrea Werner
geboren in Berlin

August 2012

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Februar 2008 bis April 2012 an der Freien Universität Berlin, am Institut für Biologie, Abteilung Biochemie der Pflanzen unter Anleitung von PD Dr. Claus-Peter Witte durchgeführt.

Erstgutachter: PD Dr. Claus-Peter Witte
Zweitgutachter: Prof. Dr. Tina Romeis

Disputation am: 30.10.2012

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	III
Abbildungsverzeichnis	VI
Tabellenverzeichnis	VIII
Abkürzungsverzeichnis	IX
1 Zusammenfassung	1
2 Einleitung	3
2.1 Der Stickstoffkreislauf.....	3
2.1.1 Stickstoffaufnahme in Pflanzen.....	5
2.1.1.1. Stickstofffixierung.....	5
2.1.2 Stickstoffrecycling.....	8
2.1.3 Purinabbau.....	8
2.1.3.1 Von den Nukleotiden zu Xanthin.....	9
2.1.3.2 Vom Xanthin zu den Ureiden.....	9
2.1.3.3 Vom Allantoin zu Glyoxylat.....	9
2.1.3.3.1 Identifizierung der beteiligten Enzyme.....	11
2.1.3.3.2 Kristallstrukturen der beteiligten Enzyme.....	12
2.1.3.3.3 Kofaktoren der beteiligten Enzyme.....	13
2.1.3.3.4 Endprodukte der beteiligten Enzyme.....	15
2.1.3.3.5 Lokalisation der beteiligten Enzyme.....	15
2.1.3.3.6 Transport.....	16
2.1.3.3.7 Ureide und Stress.....	18
2.1.3.3.8 Ureide in Sojabohne.....	18
2.2 Vorgeschichte im Labor	21
2.3 Ziel der Arbeit	22
3 Material und Methoden	23
3.1 Material.....	23
3.1.1 Verwendete Nährmedien.....	23
3.1.2 Verwendete Konstrukte.....	24
3.1.3 Verwendete Bakterien und Viren.....	26
3.1.4 Verwendete Pflanzen.....	27
3.1.5 Verwendete Datenbanken und Programme.....	28
3.2 Methoden.....	29
3.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	29
3.2.1.1 Klonierung von Konstrukten.....	29
3.2.1.1.1 Zur Überexpression in Pflanzen.....	29
3.2.1.1.2 Zur Überexpression in <i>E. coli</i>	30
3.2.1.2 Transformationen.....	32
3.2.1.2.1 Von Bakterien.....	32
3.2.1.2.2 Von Pflanzen.....	33
3.2.2 Biochemische Methoden.....	34
3.2.2.1 Proteinexpression.....	34
3.2.2.1.1 In <i>E. coli</i>	34
3.2.2.1.2 In Pflanzen.....	35
3.2.2.2 Proteinaufreinigung.....	35
3.2.2.2.1 Aus <i>E. coli</i>	35

3.2.2.2.2 Aus Pflanzen.....	38
3.2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung	39
3.2.2.4 Proteindetektion.....	40
3.2.2.4.1 Gelelektrophorese.....	40
3.2.2.4.2 Proteinfärbungen im Gel	40
3.2.2.5 Proteinaktivitätsbestimmung	42
3.2.2.5.1 Kolorimetrische Nachweisreaktionen.....	43
3.2.2.5.2 Polarimetrie	45
3.2.2.5.3 NMR.....	46
3.2.3 Pflanzenphysiologische Methoden.....	46
3.2.3.1 Pflanzenanzucht.....	46
3.2.3.1.1 Von <i>Nicotiana benthamiana</i>	47
3.2.3.1.2 Von <i>Arabidopsis thaliana</i>	47
3.2.3.1.3 Von <i>Glycine max</i>	47
3.2.3.2 Phänotypenanalyse in <i>Arabidopsis</i>	48
3.2.3.3 Metabolitanalyse.....	49
3.2.3.3.1 In <i>Arabidopsis thaliana</i>	49
3.2.3.3.2 In <i>Glycine max</i>	51
3.2.3.4 Natives Proteinniveau.....	52
3.2.3.4.1 In <i>Arabidopsis thaliana</i>	53
3.2.3.4.2 In <i>Glycine max</i>	53
4 Ergebnisse	54
4.1 Der Ureidabbau allgemein.....	54
4.1.1 Identifizierung und Charakterisierung ureidabbauender Enzyme.....	54
4.1.1.1 Vom Allantoat zum Ureidoglykolat	54
4.1.1.1.1 Der AAH – Weg.....	54
4.1.1.1.2 Der ALC – Weg.....	63
4.1.1.2 Vom Ureidoglykolat zum Glyoxylat.....	65
4.1.1.2.1 Der UAH – Weg.....	65
4.1.1.2.2 Der UUH – Weg.....	67
4.1.1.3 Der vollständige Abbau des Allantoats	68
4.1.1.3.1 Der Allantoatabbau in <i>E. coli</i>	69
4.1.1.3.2 Der Allantoatabbau in <i>Arabidopsis thaliana</i>	71
4.2 Der Ureidabbau in <i>Arabidopsis thaliana</i>	72
4.2.1 Die beteiligten Enzyme	72
4.2.2 Subzelluläre Lokalisation	75
4.2.3 Komplexbildung der Enzyme.....	76
4.2.4 <i>In vivo</i> Funktion und Relevanz der Enzyme.....	78
4.2.4.1 Phänotypenanalyse	78
4.2.4.2 Metabolitanalyse.....	83
4.2.5 <i>In vivo</i> Proteingehalt der Enzyme.....	86
4.3 Der Ureidabbau in anderen Pflanzen.....	87
4.3.1 Die ureidabbauenden Enzyme aus Reis.....	88
4.3.2 Die ureidabbauenden Enzyme aus Sojabohne.....	92
4.3.2.1 Die beteiligten Enzyme I.....	92
4.3.2.2 <i>In vivo</i> Funktion I	93
4.3.2.3 Die beteiligten Enzyme II.....	95
4.3.2.4 <i>In vivo</i> Funktion II und <i>in vivo</i> Relevanz	98
4.3.2.5 <i>In vivo</i> Proteingehalt & Metabolitprofil	102
5 Diskussion	106

5.1 Die Enzyme	107
5.2 Ureidabbau in Pflanzen	110
5.3 In vivo Funktion und Relevanz	114
5.4 Die Enzyme der Sojabohne	116
5.5 Der Ureidabbau allgemein.....	117
5.6 Ausblick.....	118
6 Anhang.....	121
7 Literatur	132
Lebenslauf	140
Publikationen und Kongresse	141
Danksagung	142

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 - der Stickstoffkreislauf	3
Abbildung 2 - die Stickstoffaufnahme in Pflanzen	4
Abbildung 3 - die Stickstofffixierung in Pflanzen.....	6
Abbildung 4 - der Ureidabbau	10
Abbildung 5 - Model des Allantointransports in Knöllchen von <i>Phaseolus vulgaris</i>	17
Abbildung 6 - Reaktionsprodukte der <i>AtAAH</i>	55
Abbildung 7 - Affinitätsaufreinigung des <i>AtUGlyAH</i> -Kandidaten aus <i>N. benthamiana</i>	57
Abbildung 8 - Erster Aktivitätstest des <i>AtUGlyAH</i> -Kandidaten.....	58
Abbildung 9 - Affinitätsaufreinigung der <i>EcAAH</i> , des <i>EcUGlyAH</i> -Kandidaten und der <i>EcUUH</i>	59
Abbildung 10 - Aktivitätstest des <i>EcUGlyAH</i> -Kandidaten.	60
Abbildung 11 - Optische Drehung der <i>EcAAH</i> - und <i>EcUGlyAH</i> -Reaktionsprodukte.....	61
Abbildung 12 - Zweiter Aktivitätstest des <i>AtUGlyAH</i> -Kandidaten.....	62
Abbildung 13 - Ureidoglykolatproduktion des <i>AtUGlyAH</i> -Kandidaten.....	63
Abbildung 14 - Optische Drehung des <i>AtUGlyAH</i> -produzierten Ureidoglykolats.....	63
Abbildung 15 - Reaktionsprodukte der <i>PsALC</i>	64
Abbildung 16 - Optische Drehung des <i>PsALC</i> -produzierten Ureidoglykolats.....	64
Abbildung 17 - Ammoniakproduktion der <i>AtUAH</i> mit racemischem Ureidoglykolat.	66
Abbildung 18 - Ureidoglykolatumsatz der <i>AtUAH</i> mit racemischem Ureidoglykolat.	66
Abbildung 19 - Reaktionsprodukte der <i>AtUAH</i> mit S – (-) Ureidoglykolat.	67
Abbildung 20 - Harnstoffproduktion der <i>EcUUH</i> mit racemischem Ureidoglykolat.	68
Abbildung 21 - Allantoatabbau durch die Enzyme aus <i>E. coli</i>	70
Abbildung 22 - Allantoatabbau durch die Enzyme aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	71
Abbildung 23 - ¹³ C-NMR-Analyse des vollständigen Ureidabbaus durch die Enzyme aus <i>A. thaliana</i>	73
Abbildung 24 - Subzelluläre Lokalisation von <i>AtUGlyAH</i> in <i>Nicotiana tabacum</i>	75
Abbildung 25 - Subzelluläre Lokalisation von <i>AtUGlyAH</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i>	76
Abbildung 26 - Interaktionsstudie der Enzyme aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	77
Abbildung 27 - Phänotypenanalyse mit Allantoin als einziger Stickstoffquelle.....	80
Abbildung 28 - Trockengewicht der verschiedenen Arabidopsislinien mit Allantoin als einziger Stickstoffquelle.	81
Abbildung 29 - Gesamtproteingehalt der verschiedenen Arabidopsislinien mit Allantoin als einziger Stickstoffquelle.	82
Abbildung 30 - Metabolitanalyse der verschiedenen Arabidopsislinien.	84
Abbildung 31 - natives Proteinniveau der ureidabbauenden Enzyme in <i>Arabidopsis</i> <i>thaliana</i>	86
Abbildung 32 - Affinitätsaufreinigung der <i>OsAAH</i> , der <i>OsUGlyAH</i> und der <i>OsUAH</i> aus <i>N. benthamiana</i>	88
Abbildung 33 - Reinheit der StrepII-affinitätschromatographisch aufgereinigten Enzyme aus Reis.....	89
Abbildung 34 - Aktivitätstest ureidabbauender Enzyme aus Reis.	90
Abbildung 35 - Bestimmung der enzymkinetischen Parameter der <i>OsAAH</i>	91
Abbildung 36 - Allantoatabbau in Sojabohne.	93
Abbildung 37 - Phänotypenanalyse der Komplementation der Arabidopsismutanten mit den Genen aus Sojabohne.	94
Abbildung 38 - Metabolitanalyse der Komplementation der Arabidopsismutanten	

mit den Sojabohnenenzymen.....	95
Abbildung 39 - Allantoinaufnahme und –umsatz im Zeitkurs.....	99
Abbildung 40 - Metabolitanalyse der Sojabohnenblätter infiziert mit <i>GmUAH</i> - VIGS-Konstrukten.....	100
Abbildung 41 - Western Blot Analyse der <i>GmUAH</i> -verminderten Sojabohnenblätter.....	101
Abbildung 42 - natives Expressionsniveau der ureidabbauenden Enzyme in Sojabohne.....	102
Abbildung 43 - Metabolitgehalt in Blättern von Sojabohnen mit unterschiedlichen Stickstoffquellen.....	103
Abbildung 44 - natives Expressionsniveau in Blättern von Sojabohnen mit unterschiedlichen Stickstoffquellen.....	104
Abbildung 45 - Metabolitgehalt in Geweben von Sojabohnen unter fixierenden und nichtfixierenden Bedingungen.....	105
Abbildung 46 - der neue Ureidabbau.....	109
Abbildung 47 - graphische Darstellung der Expressionsvektoren pXCS-HAStrep und pET30-CTH.....	121
Abbildung 48 - Proteinsequenzvergleich der Allantoinasen.....	123
Abbildung 49 - Proteinsequenzvergleich der Allantoat Amidohydrolasen.....	124
Abbildung 50 - Proteinsequenzvergleich der Ureidoglycin Aminohydrolasen.....	125
Abbildung 51 - Proteinsequenzvergleich der Ureidoglykolat Amidohydrolasen.....	126
Abbildung 52 - graphische Darstellung der Metabolitanalyse der verschiedenen Arabidopsislinien, welche getrennt gezeigt wird in Abbildung 30 und Abbildung 38.....	128
Abbildung 53 - Quantifizierung der Antikörperdetektionsgrenzen.....	129
Abbildung 54 - cDNA-Sequenzen der Ureidoglykolat Amidohydrolasen aus Sojabohne.....	131

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: verwendete Nährmedien.....	23
Tabelle 2: verwendete Konstrukte zur Überexpression in Pflanzen.....	24
Tabelle 3: verwendete Konstrukte zur Überexpression in <i>E. coli</i>	25
Tabelle 4: verwendete Bakterien.....	26
Tabelle 5: verwendete Pflanzen.....	27
Tabelle 6: verwendete Konstrukte des BPMV zur Genabschaltung in Sojabohnen.....	27
Tabelle 7: verwendete Datenbanken und Programme.....	28
Tabelle 8: verwendete Primer zur Klonierung in pXCS-Vektoren.....	29
Tabelle 9: verwendete Primer zur Klonierung in pET30-Vektoren.....	31
Tabelle 10: Arbeitsschritte der Western Blot Analysen.....	41
Tabelle 11: Arbeitsschritte der Konversionsreaktionen.....	44
Tabelle 12: Arbeitsschritte der Konversionsreaktionen für Sojabohnenextrakte.....	51
Tabelle 13: Antiserendetektionslimits pro Proteinbande.....	52
Tabelle 14: die enzymkinetischen Parameter der ureidabbauenden Enzyme aus <i>Arabidopsis thaliana</i>	74
Tabelle 15: die enzymkinetischen Parameter der ureidabbauenden Enzyme in Reis.....	90
Tabelle 16: die multiplen Genekopien für ureidabbauende Enzyme in Sojabohne.....	96
Tabelle 17: Proteinsequenzanalyse der ureidabbauenden Enzyme in Sojabohne.....	96
Tabelle 18: die enzymkinetischen Parameter der ureidabbauenden Enzyme aus Sojabohne.....	97
Tabelle 19: die Enzyme des Ureidabbaus in verschiedenen Organismen.....	118
Tabelle 20: Proteinsequenzanalyse der pflanzlichen Enzyme des Ureidabbaus.....	127

Abkürzungsverzeichnis

AAH	Allantoat Amidohydrolase
AG	Arabinose-Gluconat
ALC	Allantoicase
amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Arg	Arginin
AS	Aminosäure
Asn	Asparagin
Asp	Aspartat
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ATP	Adenosintriphosphat
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat
BSA	<i>bovine serum albumin</i> Rinderserumalbumin
carb	Carbenicillin
cm	<i>centimeter</i> Zentimeter
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
<i>Ec</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EST	<i>expressed sequence tag</i>
et al.	et alii (maskulin) oder et aliae (feminin)
FG	Frischgewicht
°C	Grad Celsius
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
g	Gramm
gent	Gentamycin
GFP	<i>green fluorescent protein</i> grünfluoreszierendes Protein
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
<i>Gm</i>	<i>Glycine max</i>
GOGAT	Glutamin Oxoglutarat Aminotransferase = Glutamatsynthase
GS	Glutaminsynthetase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-Ethansulfonsäure
His	Histidin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
kan	Kanamycin
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	<i>lysogeny broth</i>
Lys	Lysin
M	Molar
MES	Morpholinoethansulfonsäure
mg	Milligramm
mG	maximale Geschwindigkeit
min	Minute
ml	Milliliter
mM	Millimolar

Mol	Molekül
MS	Murashige und Skoog
mU	Milliunits
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
µmol	Mikromol
NAD	Nicotinamidadenindinukleotid
NBT	Nitroblau-Tetrazolium
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NMR	<i>nuclear magnetic resonance</i> Kernspinresonanz
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i> offener Leserahmen
<i>Os</i>	<i>Oryza sativa</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
ppt	Phosphinotricin
<i>Ps</i>	<i>Pseudomonas syringae</i>
rif	Rifampicin
RNA	<i>ribonucleic acid</i> Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> Umdrehungen pro Minute
Rt	Raumtemperatur
RT-PCR	reverse Transkription mit anschließender PCR
s	Sekunde
<i>Sc</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	<i>standard deviation</i> Standardabweichung
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i> Natriumdodecylsulfat
SM	Sojabohnenmedium
spec	Spectinomycin
std	Stunde
TBS	<i>Tris-buffered saline</i> Tris-gepuffertes Salz
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
tet	Tetracyclin
TG	Trockengewicht
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
U	Unit
UAH	Ureidoglykolat Amidohydrolase
ÜN	Übernacht
UGlyAH	Ureidoglycin Aminohydrolase
UUH	Ureidoglykolat Urea Hydrolase
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VIGS	<i>virus-induced gene silencing</i> Virus-induzierte Genabschaltung
w/v	<i>weigh per volume</i> Gewicht pro Volumen
YEB	<i>yeast extract broth</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> gelbfluoreszierendes Protein

1 Zusammenfassung

Die Verfügbarkeit von Stickstoff im Boden begrenzt häufig das pflanzliche Wachstum. Daher ist neben der Stickstoffaufnahme auch die Wiederverwertung und Umverteilung vorhandener Stickstoffreserven während der pflanzlichen Entwicklung wichtig. In Pflanzen trägt der Purinabbau zum Stickstoffrecycling bei. Darüber hinaus sichert er in tropischen Leguminosen unter fixierenden Bedingungen die primäre Stickstoffversorgung der Pflanze. Die Ureide Allantoin und Allantoat sind Zwischenprodukte des Purinabbaus und stellen die Transportform des durch Fixierung erhaltenen Stickstoffs in tropischen Leguminosen dar.

Dies ist die erste Arbeit, in der mit aufgereinigten Enzymen aus Pflanzen und Bakterien ein vollständiger Ureidabbau *in vitro* erreicht werden konnte. Dies wurde durch die Identifizierung eines neuen Enzyms, der Ureidoglycin Aminohydrolase (UGlyAH), ermöglicht. Es konnte gezeigt werden, dass Ureidoglycin das Reaktionsprodukt der Allantoat Amidohydrolase (AAH) ist, welches dann durch die Aktivität der UGlyAH zu Ureidoglykolat umgesetzt wird. Dieser Schritt erzeugt das Substrat der pflanzlichen Ureidoglykolat

Amidohydrolase (UAH) oder bakteriellen Ureidoglykolat Urea Hydrolase (UUH). Durch die Anwesenheit dieser drei Enzyme wird Allantoat vollständig zu Glyoxylat abgebaut, wobei der Purinringstickstoff von den pflanzlichen Enzymen als Ammoniak freigesetzt wird. Die UGlyAH aus *Arabidopsis thaliana* wurde wie auch die anderen ureidabbauenden Enzyme zuvor im ER lokalisiert. Damit finden die letzten Schritte des Purinabbaus im ER statt. Die *in vivo* Funktion und Relevanz der ureidabbauenden Enzyme in Pflanzen wurde mittels Phänotypen- und Metabolitanalyse der entsprechenden T-DNA Insertionslinien für *Arabidopsis thaliana* gezeigt. Dies gelang für die GmUAH aus der tropischen Leguminose Sojabohne (*Glycine max*) mittels Virus-induzierter Genabschaltung (VIGS). Darüber hinaus wurde der native Proteingehalt der ureidabbauenden Enzyme in verschiedenen Geweben von *Arabidopsis* und Sojabohne unter Verwendung spezifischer Antikörper untersucht. Dabei wurde eine unterschiedliche Regulation während des Blattalterungsprozesses festgestellt, wohingegen die Stickstoffquelle in beiden Pflanzen keinen sichtbaren Einfluss auf den Proteingehalt der ureidabbauenden Enzyme ausübte.

Summary

Plant growth is often limited by nitrogen availability in the soil. Not only do plants depend on efficient nitrogen uptake, they also require effective means to internally redistribute nitrogen during every stage of development. The purine degradation pathway contributes to this nitrogen recycling in plants. In tropical legumes it is also of central importance to the plants' nitrogen supply under nitrogen-fixing conditions.

This is the first time that the complete ureide degradation pathway has been demonstrated *in vitro* with purified enzymes from plants and bacteria. This was enabled by the identification of the novel enzyme ureidoglycine aminohydrolase (UGlyAH). It is shown that ureidoglycine is the reaction product of allantoate amidohydrolase (AAH), and is in turn metabolised by the UGlyAH to ureidoglycolate. This reaction produces the substrate of the plant ureidoglycolate amidohydrolase (UAH) or bacterial ureidoglycolate urea hydrolase (UUH). The conversion of allantoate to glyoxylate can be achieved by these three enzymes. During these reactions the total nitrogen of the purine ring is released as ammonia in plants. The UGlyAH from *Arabidopsis thaliana* is shown to be localised in the ER

where all the other ureide degrading enzymes have previously been localised. This shows that the last steps of the purine degradation pathway take place in the ER. The *in vivo* function and relevance of the ureide degrading enzymes in plants was shown by phenotype and metabolite analyses using the corresponding T-DNA insertion lines of *Arabidopsis thaliana* and virus-induced gene silencing (VIGS) in soybean (*Glycine max*) for *GmUAH*. The native protein level of the ureide degrading enzymes was investigated in several tissues of *Arabidopsis* and soybean using specific antibodies. It was found to be differentially regulated during leaf aging. In contrast, the nitrogen source had no obvious impact on the protein levels in either plant.

2 Einleitung

2.1 Der Stickstoffkreislauf

Obwohl in der Atmosphäre etwa 80% Stickstoff in Form von N_2 enthalten sind, begrenzt seine Verfügbarkeit häufig das Wachstum von Pflanzen. Er ist das am meisten limitierende Element für Pflanzen (Schubert, 1986), wobei sie auf die für sie

nutzbaren Arten des Stickstoffs im Boden angewiesen sind.

Da elementarer Stickstoff (N_2) chemisch nicht reaktiv ist, stellt seine Umwandlung in reaktivere Formen wie Nitrat und Nitrit (oxidiert) oder Ammonium (reduziert) einen wichtigen Schritt in seiner Nutzbarmachung für Pflanzen dar. Atmosphärischer Stickstoff kann auf zwei Arten in den Boden gelangen. Durch die Energie bei Gewittern entstehen Stickstoffoxide (NO_x) aus N_2 , die mit dem Regenwasser (Bildung von HNO_3) als Nitrat

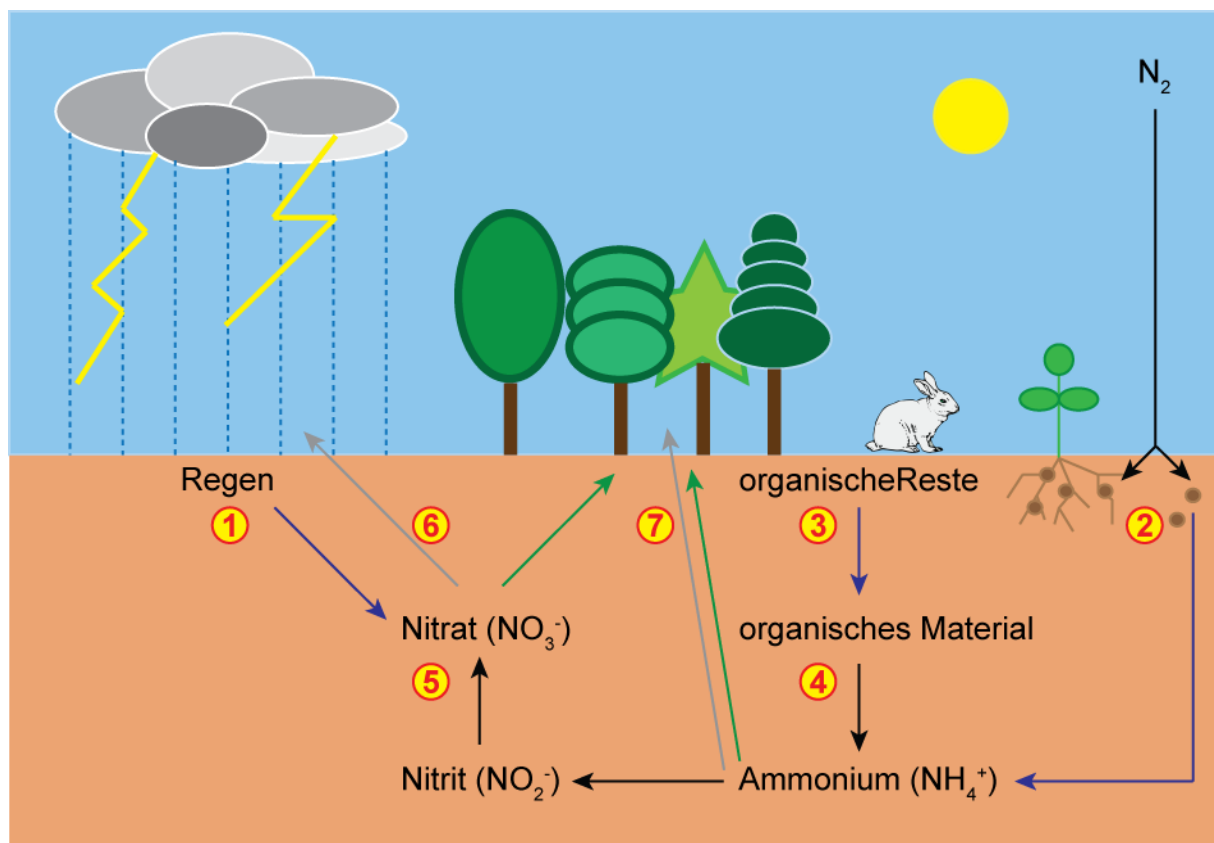


Abbildung 1 - der Stickstoffkreislauf.

Eintrag von Stickstoff in den Boden (blaue Pfeile) mittels natürlicher Fixierung entweder über Gewitter, die aus atmosphärischem Stickstoff (N_2) Stickstoffoxide generieren, die mit dem Regen als Nitrat in den Boden gelangen (1) oder über biologische Fixierung, bei der aus N_2 Ammonium gebildet wird (2). Weiterhin durch organische Reste, die abgebaut werden (3) und zu Ammonium mineralisiert werden (4). Das Ammonium kann in gut belüfteten Böden durch Nitrifikation über Nitrit zu Nitrat umgewandelt werden (5). Zu Verlusten an Stickstoff aus dem Boden (graue Pfeile) führt die Denitrifikation von Nitrat über Nitrit zu N_2 in schlecht belüfteten Böden (6) und das Entweichen von Ammonium in Form von gasförmigem Ammoniak (7).

(NO_3^-) in den Boden gelangen können (Abbildung 1-1). Diese Art der Stickstofffixierung beträgt 13% der Gesamtstickstofffixierung in der Natur ($2,3 \cdot 10^8$ Tonnen jährlich), wohingegen 87% das Ergebnis biologischer Stickstofffixierung sind (Ramos und Bisseling, 2004). Bakterien können den atmosphärischen Stickstoff in Ammonium fixieren, wobei sie hierbei entweder freilebend in der Erde (20% der biologischen Fixierung) oder symbiotisch mit Pflanzen leben können (80% der biologischen Fixierung) (Gutschick, 1980; Vance *et al.*, 1988) (Abbildung 1-2).

Zu einem weiteren Eintrag von Stickstoff in den Boden kommt es durch tierische Exkrete und das Absterben von Pflanzen und Tieren (Abbildung 1-3), wobei Mikroorganismen das organische Material zersetzen und Ammonium bilden (Abbildung 1-4).

Das Ammonium im Boden kann entweder direkt von den Wurzeln der Pflanzen aufgenommen oder in gut durchlüfteten Böden alternativ von nitrifizierenden Bakterien über Nitrit zu Nitrat oxidiert werden (Abbildung 1-5), welches die bevorzugte Form des Stickstoffs für die Aufnahme durch Pflanzen darstellt (Abbildung 2).

Neben dem Eintrag von Stickstoff in den Boden und dessen Verwertung durch Pflanzen, kommt es auch zu Verlusten. In schlecht durchlüfteten Böden reduzieren

denitrifizierende Bakterien Nitrat über Nitrit zu N_2 , welches als Gas den Boden verlässt (Abbildung 1-6). Darüber hinaus kann auch Ammoniak als Gas den Boden verlassen und so zum Stickstoffverlust beitragen (Abbildung 1-7).

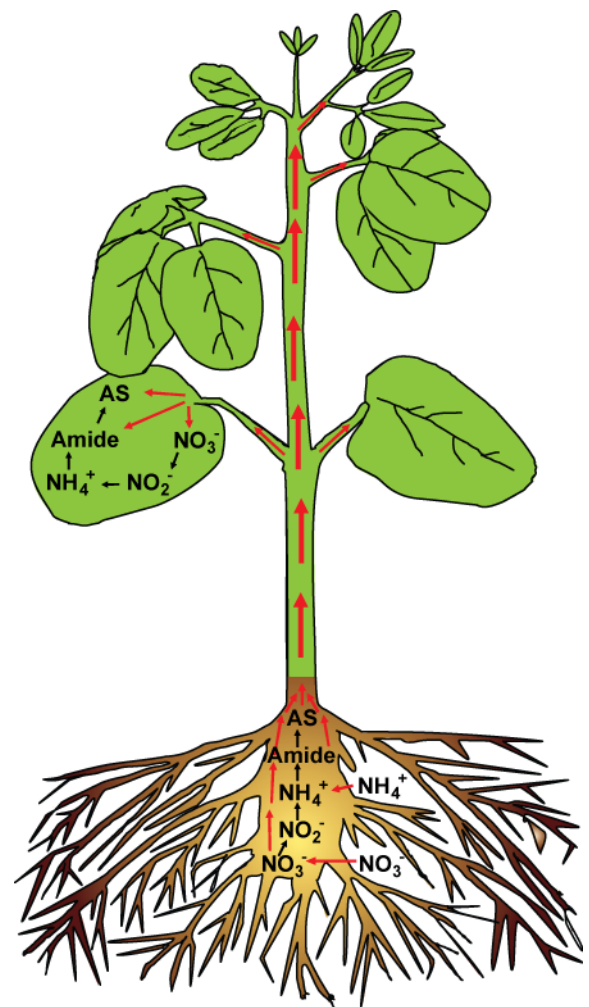


Abbildung 2 - die Stickstoffaufnahme in Pflanzen.

Nitrat und Ammonium werden aus der Erde in die Pflanze mittels Nitrat-Protonen-Sympporter (NRTs) und Ammoniumtransporter (AMTs) importiert. Die Nitratreduktase reduziert Nitrat (NO_3^-) zu Nitrit (NO_2^-) im Zytosol und die Nitritreduktase reduziert dieses weiter zu Ammonium (NH_4^+) im Plastid. Die gekoppelte Aktivität der Glutaminsynthetase und Glutamatsynthase gefolgt von Transaminasen bewirkt den Einbau von Ammonium in die Amidaminosäuren und andere Aminosäuren (AS). Von der Wurzel in den Spross exportiert werden NO_3^- , Amide und AS.

2.1.1 Stickstoffaufnahme in Pflanzen

Stickstoff ist ein wichtiger Bestandteil in Proteinen, Nukleinsäuren, einigen Phytohormonen (Auxin und Cytokinin), Sekundärmetaboliten (Alkaloide), Chlorophyllen (z.B. Chlorophyll a), Kofaktoren (z.B. Acetyl-CoA und Biotin) und anderen Verbindungen in Pflanzen.

Generell können Pflanzen Stickstoff in verschiedenen Verbindungen aufnehmen (Abbildung 1). Die am häufigsten genutzte Variante ist die Nitrataufnahme (Abbildung 2). Weitere Möglichkeiten bestehen in der direkten Assimilation von Ammonium (Abbildung 2) und dem Import von organischen Ammoniumverbindungen wie Harnstoff (Witte, 2011), Ureide (Desimone *et al.*, 2002; Pelissier *et al.*, 2004) Aminosäuren (Rentsch *et al.*, 2007), Peptide (Rentsch *et al.*, 2007) und Nukleoside (Moehlmann *et al.*, 2010).

2.1.1.1. Stickstofffixierung

Unter Stickstoffmangelbedingungen sind einige Pflanzenarten (z.B. Leguminosen) in der Lage mit stickstofffixierenden Bodenbakterien (wie *Rhizobium* sp.) eine symbiotische Beziehung einzugehen, wobei diese den atmosphärischen Stickstoff (N₂) in Ammonium umwandeln und so für die

Pflanze nutzbar machen. Durch diese Symbiose ist die Pflanze fähig, einen Teil oder sogar ihren gesamten Stickstoffbedarf vom Symbiosepartner decken zu lassen (Schubert, 1986). Im Gegenzug stellt die Pflanze Photoassimilate zur Verfügung, um das Wachstum und die Funktion der Symbioseorgane aufrecht zu erhalten. Für deren Ausbildung bedarf es einer stickstofflimitierten Umgebung für die Pflanze, welche daraufhin die symbiotischen Bakterien chemotaktisch anlockt. Der Austausch von Signalen, der anschließende Infektionsprozess und die Ausbildung der funktionstüchtigen Symbioseorgane involviert hier spezifische Gene sowohl von der Pflanze als auch von den Bakterien (für Review siehe Oldroyd und Downie, 2008). Die Symbioseorgane sind die sogenannten Knöllchen, welche von der pflanzlichen Wurzel ausgebildet werden, um die stickstofffixierenden Bakterien einzuschließen. Dies dient dem Schutz der Bakterien und der Regulation der Gaspermeabilität, da die stickstofffixierende Aktivität der bakteriellen Nitrogenase sauerstoffempfindlich ist. Daher wird der Sauerstoffgehalt in den Knöllchen so niedrig gehalten, dass die Respiration noch stattfinden kann, die Inaktivierung der Nitrogenase aber vermieden wird (Kuzma *et al.*, 1993). Die Nitrogenase der stickstofffixierenden Bakterien reduziert den atmosphärischen

Stickstoff (N_2) zu zwei Molekülen Ammonium (NH_4^+) unter Verbrauch von 16

ATP, 10 Protonen und 8 Elektronen (Ramos und Bisseling, 2004). Diese hohen

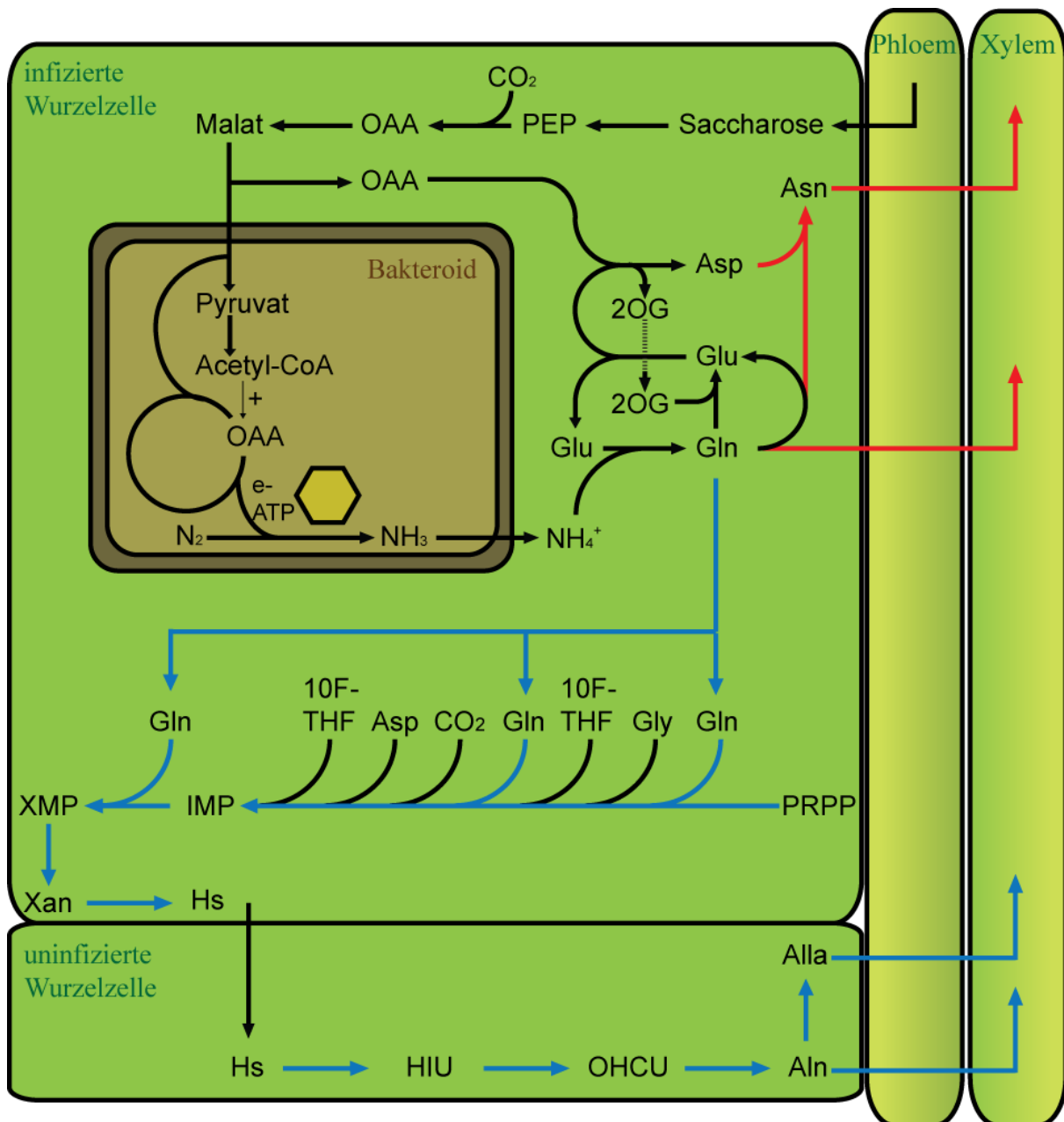


Abbildung 3 – die Stickstofffixierung in Pflanzen.

Die Pflanze transportiert Saccharose über das Phloem zu den Knöllchen. In den infizierten Wurzelzellen wird dieses über Phosphoenolpyruvat (PEP) und Oxalacetat (OAA) in Malat umgewandelt, welches in die Bakterioide importiert wird. Hier wird es für den Zitratzyklus der Bakterioide verwendet, die aus diesem Elektronen (e^-), Protonen (H^+) und Energie in Form von ATP (mittels Atmungskette) gewinnen, um den atmosphärischen Stickstoff (N_2) in Ammoniak (NH_3) zu fixieren. Dies wird als Ammonium (NH_4^+) in die infizierte Wurzelzelle exportiert, wo es zur Synthese der Aminosäuren Glutamin (Gln), Glutamat (Glu), Asparagin (Asn) und Aspartat (Asp) verwendet wird. Diese werden in Amidexportern (rote Pfeile) in das Xylem exportiert und in Ureidexportern (blaue Pfeile) für eine *de novo* Purinsynthese verwendet. Die Purine werden anschließend wieder abgebaut, wobei auf der Stufe der Harnsäure (Hs) diese in die uninfizierten Wurzelzellen transportiert wird, um dort über 5-Hydroxyisourat (HIU) und 2-Oxo-4-Hydroxy-4-Carboxy-5-Ureidoimidazolin (OHCU) die Ureide Allantoin (Aln) und Allantoat (Alla) zu produzieren. Diese werden dann im Xylem exportiert (blaue Pfeile).

Energiekosten werden von der Pflanze mit Photosyntheseprodukten „bezahlt“. Zur Bereitstellung dieser Energie wird Saccharose über das Phloem vom Blatt zu den Knöllchen transportiert. Im Knöllchen wird die Saccharose zu Malat umgesetzt, welches von der Pflanze als Kohlenstoffgerüst für die Assimilation des fixierten Stickstoffs verwendet wird (Abbildung 3). Darüber hinaus ist Malat die Hauptenergiequelle für die Bakterioide und pflanzlichen Mitochondrien. Das von der Pflanze bereitgestellte Malat wird in die Bakterioide importiert und dort für deren Zitratzyklus verwendet. Dieser generiert Reduktionsäquivalente, welche die Protonen und Elektronen bereitstellen, sowie die Produktion von ATP über die Atmungskette ermöglichen. Das durch die Fixierung gebildete Ammonium wird in das Zytoplasma der infizierten Wurzelzelle sekretiert und dort mit Hilfe der Glutaminsynthetase auf Glutamat übertragen. Der fixierte Stickstoff wird also zunächst in eine Aminosäure eingebaut. Anschließend kann er auf zwei verschiedene Arten zu den oberen Teilen der Pflanze transportiert werden (Abbildung 3). Entweder wird er in Form von Amididen (hauptsächlich Asparagin, aber auch Glutamin) oder in Form von Ureiden (Allantoin und Allantoat) exportiert (Herridge *et al.*, 1978). So werden Leguminosen in Amid- oder Ureid-

Exporter klassifiziert, entsprechend der Verbindungen, die für die Mobilisierung des fixierten Stickstoffs verwendet werden (Schubert, 1986). In Amidexportern ist Asparagin immer die Haupttransportform des assimilierten Stickstoffs im Xylem, unabhängig von der Art der Stickstoffaufnahme (Todd *et al.*, 2006). Die Ureide dominieren die Stickstoffverbindungen im Xylem von tropischen Leguminosen, wenn die Pflanze fixierten Stickstoff assimiliert, andernfalls werden Amide exportiert (McClure *et al.*, 1980). Die Ureide Allantoin und Allantoat sind hierbei Oxidationsprodukte des Purinabbaus (Atkins *et al.*, 1980). Der fixierte Stickstoff wird hier zunächst für eine *de novo* Synthese von Purinen verwendet, welche in den Plastiden der infizierten Wurzelzellen stattfindet (Schubert, 1986; Atkins, 2000). Anschließend werden die Purine katabolisiert, um die Ureide zu generieren, welche dann exportiert werden. Die exportierten Ureide und Amidaminosäuren werden im Xylem durch den Spross in die Blätter transportiert (Reinbothe und Mothes, 1962; Herridge *et al.*, 1978; McClure und Israel, 1979; Pate *et al.*, 1980; Thomas und Schrader, 1981). Dort werden die Aminogruppen von Asparagin und Glutamin durch Transaminasen auf andere Aminosäuren übertragen. Die Ureide werden in den Blättern abgebaut, wobei alle Kohlenstoff-Stickstoff-Bindungen

aufgebrochen werden bevor der Stickstoff (in Form von Ammonium) mittels Glutaminsynthetase (GS) und Glutaminsynthase (GOGAT) in Aminosäuren eingebaut wird (Atkins *et al.*, 1982; Coker und Schaefer, 1985).

2.1.2 Stickstoffrecycling

Da Stickstoff ein stark limitierendes Element für Pflanzen ist, müssen sie nicht nur in der Lage sein, ihn effizient aufzunehmen, sondern sie müssen auch dazu fähig sein, bereits assimilierten Stickstoff effizient innerhalb der Pflanze umzuverteilen. Der Hauptanteil des pflanzlichen Stickstoffs ist in Proteinen und Nucleinsäuren enthalten, so dass ihr Abbau und das anschließende Wiederverwerten des enthaltenen Stickstoffs eine wichtige Rolle in Pflanzen spielt. Generell werden die stickstoffhaltigen Verbindungen in alten Geweben (*sources*) abgebaut, um den Stickstoff für die Entwicklung neuer, junger Gewebe (*sinks*) zu verwenden. Dies ist besonders während der Keimung wichtig, bei der die Reserven der Kotyledonen den Keimling ernähren sowie während der Seneszenz, um zum Beispiel Samen zu produzieren. Proteine werden zunächst zu den einzelnen Aminosäuren hydrolysiert, wobei von diesen der Stickstoff abgespalten und in die Amidaminosäuren Asparagin

und Glutamin eingebaut wird. Diese werden dann über das Phloem exportiert (Atkins, 2000). Aus den Purinnucleotiden der Nucleinsäuren werden die Basen freigesetzt, welche dann aber wahrscheinlich nicht direkt exportiert werden, sondern zumindest zu den Ureiden oder sogar vollständig unter Ammoniakfreisetzung katabolisiert werden (Layzell und LaRue, 1982). Das dabei entstehende Ammonium wird wahrscheinlich auch hier für die Produktion von Glutamin und Asparagin verwendet, welche dann ins Phloem geladen werden (Smith und Atkins, 2002). Das Phloem transportiert die Amide und Ureide zu den Zielgeweben (*sinks*), wo sie mittels Transaminierungsreaktionen ihren Stickstoff auf andere Aminosäuren übertragen, um neue Peptide, Proteine und (mittels Glutamin direkt) Nucleinsäuren zu bilden.

2.1.3 Purinabbau

Der Purinabbau spielt eine wichtige Rolle im pflanzlichen Stickstoffmetabolismus. Im Gegensatz zu Tieren, die überschüssigen Stickstoff z.B. in Form von Harnsäure, Harnstoff oder Allantoin ausscheiden, sind Pflanzen von einer effizienten Nutzung ihrer internen Stickstoffgüter abhängig. So lagern sie Stickstoff eher ein, als dass sie ihn ausscheiden (Smith und Atkins, 2002).

Auch Ureide werden als Stickstoffreserven eingelagert, wobei sie in einigen Pflanzen sogar die Hauptform des gespeicherten Stickstoffs in Sprossachsen und unterirdischen Organen darstellen (Reinbothe und Mothes, 1962).

Neben der wichtigen Funktion des Purinabbaus in Bezug auf Stickstoffrecycling und –lagerung, besitzt er eine essentielle Funktion während der symbiotischen Stickstofffixierung in tropischen Leguminosen, wo er der primären Stickstoffversorgung der ganzen Pflanze dient.

2.1.3.1 Von den Nukleotiden zu Xanthin

Der Abbau der Purinnukleotide beinhaltet ihre Dephosphorylierung zu den Purinnukleosiden, die Abspaltung der Ribose und die Umwandlung zu Xanthin. (für Review siehe Zrenner *et al.*, 2006).

2.1.3.2 Vom Xanthin zu den Ureiden

Xanthin wird im Zytosol von der Xanthin-Dehydrogenase (XDH, EC 1.1.1.1) zu Harnsäure oxidiert, wobei das Enzym gleichzeitig NAD^+ zu $\text{NADH} + \text{H}^+$ reduziert (Hesberg *et al.*, 2004). Die Harnsäure wird anschließend in die Peroxisomen transportiert, wobei der

Mechanismus für diesen Transport in Pflanzen noch unbekannt ist. Im Peroxisom wird die Harnsäure von der Uricase (URI, EC 1.7.3.3) zu 5-Hydroxyisourat oxidiert, wobei gleichzeitig Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid reduziert wird (Modric *et al.*, 1992; Kahn *et al.*, 1997; Kahn und Tipton, 1998). Die Hydroxyisourat Hydrolase (HIU-Hydrolase, EC 3.5.2.17) hydrolysiert 5-Hydroxyisourat zu 2-Oxo-4-Hydroxy-4-Carboxy-5-Ureidoimidazolin (Sarma *et al.*, 1999; Raychaudhuri und Tipton, 2002; Ramazzina *et al.*, 2006). Dieses wird von der 2-Oxo-4-Hydroxy-4-Carboxy-5-Ureidoimidazolin Decarboxylase (OHCU-Decarboxylase, EC 4.1.1.n1) zu *S*-(+)-Allantoin umgesetzt (Ramazzina *et al.*, 2006; Cendron *et al.*, 2007). Das Allantoin wird dann aus den Peroxisomen in das ER transportiert, wobei auch dieser Transportmechanismus unbekannt ist (für Review siehe Werner und Witte, 2011).

2.1.3.3 Vom Allantoin zu Glyoxylat

Der Abbau der Ureide Allantoin und Allantoat ist mechanistisch schon lange bekannt. Bereits in den 50er Jahren wurde die (+)-Allantoin-spezifische Aktivität der Allantoinasen (ALNs, EC 3.5.2.5) in bakteriellen Extrakten beschrieben (Campbell, 1954; Campbell, 1955; Franke

und Hahn, 1955; Bachrach, 1957; Lee und Roush, 1964). Bei der Reaktion der Allantoinase entsteht aus (+)-Allantoin durch die hydrolytische Ringöffnung Allantoat (Trijbels und Vogels, 1966a) (Abbildung 4). Auch der Abbau von Allantoat ist aus Experimenten mit bakteriellen Extrakten schon lange bekannt. Prinzipiell gibt es zwei Enzymklassen (Abbildung 4), die in der Lage sind, Allantoat zu hydrolysieren (Trijbels und Vogels, 1966a). Die Allantoat Amidohydrolasen (Allantoicasen, ALCs, EC 3.5.3.4) bauen Allantoat unter Freisetzung von Harnstoff ab und generieren Ureidoglykolat (Trijbels und Vogels, 1966b). Die Allantoat Amidohydrolasen (AAHs, EC 3.5.3.9) hingegen setzen aus einem Mol Allantoat ein Mol Ammoniak und ein Mol Kohlenstoffdioxid frei und produzieren das hypothetische Intermediat Ureidoglycin (Trijbels und Vogels, 1966a). Dieses postulierte Intermediat könnte dann von Ureidoglycin Aminohydrolasen (UGlyAHs) unter Freisetzung eines weiteren Mols Ammoniak zu Ureidoglykolat umgesetzt werden (Trijbels und Vogels, 1966a; Vogels, 1966; Wu *et al.*, 1970). Später wurde beschrieben, dass die AAHs ebenfalls die Funktion der UGlyAHs besitzen (van der Drift *et al.*, 1970), eine Vorstellung, die sich damals durchsetzte und bis heute nicht angezweifelt wurde

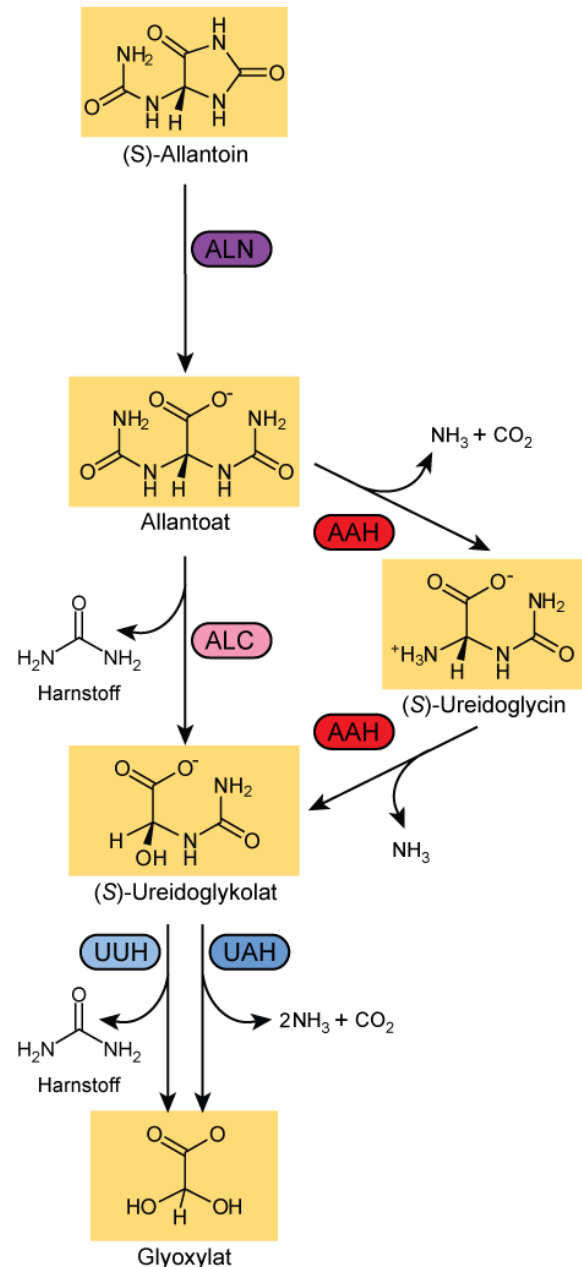


Abbildung 4 – der Ureidabbau

Das Ureid Allantoin wird durch die Allantoinase (ALN) zu Allantoat hydrolysiert. Allantoat kann entweder durch die harnstoffreisetzende Allantoicase (ALC) oder durch die ammoniakreisetzende Allantoat Amidohydrolase (AAH) zu Ureidoglykolat abgebaut werden. Hierbei beinhaltet die AAH-Reaktion das mögliche Intermediat Ureidoglycin. Ureidoglykolat kann ähnlich wie Allantoat entweder durch eine harnstoffreisetzende Ureidoglykolat Urea Hydrolase (UUH) oder eine ammoniakreisetzende Ureidoglykolat Amidohydrolase (UAH) zu Glyoxylat abgebaut werden.

(z.B. in Cusa *et al.*, 1999; Munoz *et al.*, 2001; Yang und Han, 2004; Agarwal *et al.*, 2007; Werner *et al.*, 2008), wobei auch das hypothetische Intermediat Ureidoglycin bisher nicht nachgewiesen werden konnte. Auch zwei ureidoglykolatabbauende Aktivitäten sind möglich, wobei diese ähnlich den allantoatabbauenden Enzymen entweder harnstoff- oder ammoniakfreisetzend sein können (Abbildung 4). Eines dieser abbauenden Enzyme ist die Ureidoglykolat Urea Hydrolase (UUH, EC 4.3.2.3), welche die enzymatische Umsetzung von Ureidoglykolat zu Harnstoff und Glyoxylat in vielen bakteriellen Organismen katalysiert (Valentine und Wolfe, 1961, Trijbels und Vogels, 1966b; Trijbels und Vogels, 1966a). Die erste ureidoglykolatabbauende Aktivität unter Ammoniakfreisetzung wurde von Winkler *et al.*, 1988b in Sojabohnenextrakten gemessen und von Wells und Lees, 1991 für *Phaseolus vulgaris* beschrieben, wobei die Aktivität nicht nur im Extrakt gemessen wurde, sondern das Enzym aus dem Extrakt über klassisch-biochemische Methoden gereinigt wurde.

2.1.3.3.1 Identifizierung der beteiligten Enzyme

Das Gen der Allantoinase (*DALI*) aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) wurde von

Buckholz und Cooper, 1991 identifiziert, kloniert, die Enzymaktivität des Proteins im Extrakt gemessen und es wurden die entsprechenden Mutanten komplementiert. Die ersten pflanzlichen Allantoinasen wurden genetisch in *Arabidopsis thaliana* und *Robinia pseudoacacia* (Gewöhnliche Robinie) identifiziert und kloniert (Yang und Han, 2004). Die allantoatproduzierende Aktivität des Enzyms wurde auch hier nur im Rohextrakt gemessen. Darüber hinaus wurde die *in vivo* Funktion mittels Komplementation der Hefemutante *dall* gezeigt und die *in vivo* Relevanz in *Arabidopsis* mittels T-DNA Insertion. Die Verlustmutante war unfähig auf Allantoin als einziger Stickstoffquelle zu wachsen, was eine Notwendigkeit der Allantoinase in der Verwendung von Allantoin als Stickstoffquelle darlegte und somit zeigte, dass sie in *Arabidopsis in vivo* relevant ist. Die Allantoicase (ALC) wurde genetisch zunächst in Hefe (*DAL2*) anhand von Mutations- und Komplementationsstudien identifiziert und die glyoxylatproduzierende Aktivität des Enzyms im Rohextrakt gemessen (Yoo *et al.*, 1985; Lee *et al.*, 1990). Dies gibt allerdings keine Auskunft darüber, ob es sich tatsächlich um ein harnstofffreisetzendes Enzym handelt und ob es Ureidoglykolat produziert.

In Pflanzen konnte bislang keine harnstofffreisetzende ALC identifiziert werden und es sind auch keine orthologen

Sequenzen zum Hefeenzym DAL2 in den bekannten pflanzlichen Genomen kodiert.

Die DNA-Sequenz der ammoniakfreisetzende AAH wurde zuerst in *E. coli* identifiziert (*AllC*) und kloniert (Cusa *et al.*, 1999). Hier wurde die Ureidoglykolatproduktion des Enzyms gemessen aber nicht die Ammoniakfreisetzung.

Die ersten pflanzlichen *AAHs* wurden in *Arabidopsis thaliana* und der Sojabohne *Glycine max* identifiziert und kloniert (Todd und Polacco, 2006; Werner *et al.*, 2008). Zunächst wurde nur die Funktion der *AtAAH* mittels Komplementation der Hefemutante *dal2* gezeigt und die *in vivo* Relevanz in *Arabidopsis* mittels T-DNA Insertion (Todd und Polacco, 2006). Später wurden die ammoniakfreisetzenden Aktivitäten der *AtAAH* und *GmAAH* erstmalig mit den aufgereinigten Enzymen dargestellt (Werner *et al.*, 2008).

Die Ureidoglykolat Urea Hydrolase (UUH) wurde ebenfalls zunächst in Hefe (*DAL3*) genetisch identifiziert und kloniert (Yoo *et al.*, 1985; Yoo und Cooper, 1991). Auch hier wurde nur die glyoxylatproduzierende Aktivität des Enzyms und nicht die Harnstofffreisetzung im Extrakt bestimmt.

Ein entsprechendes Enzym in Pflanzen konnte bisher nicht identifiziert werden. Auch hier gibt es keine orthologen Sequenzen zum Hefeenzym DAL3.

Die ersten ammoniakfreisetzenden *UAHs* wurden in unserem Labor in *Arabidopsis*

thaliana und *Glycine max* identifiziert und kloniert. Vordaten mit den aufgereinigten Enzymen zeigen ihre ammoniakfreisetzende Aktivität und geben erste Hinweise auf die *in vivo* Relevanz in *Arabidopsis* (Werner, 2007; Przybycin, 2008). Dies ist nicht nur die erste *UAH*, die für Pflanzen identifiziert wurde, sondern die erste genetisch identifizierte *UAH* überhaupt in einem Organismus.

2.1.3.3.2 Kristallstrukturen der beteiligten Enzyme

Die Kristallstruktur der Allantoinase (ALN) wurde für das Enzym aus *E. coli* von Kim *et al.*, 2009 veröffentlicht. Es zeigte sich, dass es sich bei der *EcALN* um ein Homotetramer handelt, bei dem jedes Monomer aus zwei Domänen besteht: ein Pseudo-TIM (Triosephosphat-Isomerase)-*barrel* und ein β -Faltblatt. Analog zu anderen Enzymen der Amidohydrolase-Familie beinhaltet die *EcALN* ein binukleares Metallzentrum im aktiven Zentrum. Die Metallionen im aktiven Zentrum ligieren wahrscheinlich ein Hydroxidion und sechs Aminosäurereste, welche in allen Allantoinasen konserviert sind (Kim *et al.*, 2009). Darüber hinaus wurde mit Aktivitätsmessungen belegt, dass Zink im Metallzentrum essentiell ist für die Aktivität und die Stereospezifität für *S*-Allantoin.

Die Kristallstruktur der Allantoicase (ALC) wurde zweimal unabhängig für das Enzym aus Hefe publiziert (Leulliot *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004). In beiden Arbeiten wird dargestellt, dass die ScALC eine hexamere Struktur (Dimer aus Trimeren) aufzeigt, wobei jedes Monomer eine bimodale Organisation aus je einem *jelly-roll*- β -Faltblatt besitzt. Eine sehr konservierte Tasche, die an der Berührungsfläche der Trimere ausgebildet wird, wird in beiden Fällen als aktives Zentrum vorgeschlagen. Eine Metallbindestelle konnte nicht gefunden werden.

Die Kristallstruktur der Allantoat Amidohydrolase (AAH) wurde für das Enzym aus *E. coli* veröffentlicht (Agarwal *et al.*, 2007). Es handelt sich bei dem nativen Enzym um ein Homodimer mit einem M20-Dimermotif, wobei jedes Monomer zwei Metallionen (wahrscheinlich Zink) bindet, und ein Sulfat- (oder Phosphat-) Ion als allosterischen Effektor zur Stabilisierung der Substratbindung. Jedes Monomer besitzt zwei strukturelle Domänen: eine große katalytische Domäne (trägt Metallionen-, Sulfat- und Substratbindstellen) und eine kleinere Dimerisierungsdomäne, welche auch zur Substratbindung des anderen Monomers beiträgt.

Auch die Kristallstruktur der Ureidoglykolat Urea Hydrolase (UUH) wurde für das Enzym aus *E. coli* gezeigt

(Raymond *et al.*, 2005). Bei diesem Enzym handelt es sich ebenfalls um ein Homodimer, wobei hier jedes Monomer aus einer globulären Domäne besteht, welche fast vollständig aus β -Faltblättern gebildet wird. β -Haarnadeln, die von jedem Monomer abgehen, bilden den Kontakt zum anderen Monomer, um das Dimer zu formen. Hoch konservierte hydrophile Aminosäuren, die unten in einer Vertiefung zusammen liegen, werden als aktives Zentrum eines jeden Monomers vorgeschlagen. Diese Aminosäuren koordinieren wahrscheinlich ein Metallion (in dieser Analyse nicht gefunden), welches in die Substratbindung involviert ist. Obwohl das aktive Zentrum von jedem Monomer selbst gebildet wird, deckt die β -Haarnadel des anderen Monomers im Dimer die jeweilige Substratbindestelle teilweise ab und formt diese so zu einem tiefen Tunnel, wodurch das jeweilige aktive Zentrum an der Berührungsfläche der Dimere ausgebildet wird.

Für die Ureidoglykolat Amidohydrolase ist noch keine Kristallstruktur veröffentlicht worden.

2.1.3.3 Kofaktoren der beteiligten Enzyme

Für die Allantoinasen aus *E. coli* und Sojabohne wurde bereits in sehr frühen Studien festgestellt, dass sie durch Mangan

aktiviert werden können, (Vogels und van der Drift, 1966). Die Manganaktivierung wurde später von Costigan *et al.*, 1987 für das Sojabohnenenzym bestätigt. Darüber hinaus wurde von Mulrooney und Hausinger, 2003 gezeigt, dass die *EcALN* durch Zink und besser noch durch Kobalt aktiviert werden kann, was mit den Daten der Kristallstruktur von Kim *et al.*, 2009 übereinstimmt. Mangan wurde in diesen beiden Studien nicht getestet.

Für die Allantoicasen aus verschiedenen *Pseudomonas*- und *Penicillium*arten konnte gezeigt werden, dass es keinen Einfluss von Nickel, Zink, Mangan, Kobalt und Magnesium auf die Aktivität der Enzyme gibt, wobei diese auch durch die Zugabe von EDTA nicht reduziert wurde (Trijbels und Vogels, 1966b). Dies weist auf eine Metallunabhängigkeit der Enzyme hin und könnte erklären, warum keine Metallbindestellen in der Kristallstruktur (Leulliot *et al.*, 2004; Xu *et al.*, 2004) gefunden werden konnten.

Für Allantoat Amidohydrolasen aus Bakterien konnte nachgewiesen werden, dass Mangan einen stark aktivierenden Effekt ausübt bzw. für die Aktivität essentiell ist (Vogels, 1966; van der Drift und Vogels, 1967; van der Drift und Vogels, 1969; Xu *et al.*, 1995). Dies konnte auch für die AAHs in Extrakten von Sojabohnen (Winkler *et al.*, 1985; Lukaszewski *et al.*, 1992) gezeigt und

anhand der aufgereinigten Enzyme aus *Arabidopsis* und Sojabohne quantifiziert werden (Werner *et al.*, 2008). In der späteren Studie wurde darüber hinaus festgestellt, dass Zink die *AtAAH* nur minimal aktivierte, wohingegen Kobalt und Nickel zumindest bis zu 20% der durch Mangan erreichten Aktivierung vermittelten.

Für die Ureidoglykolat Urea Hydrolase wurde bisher keine Metallaktivierung beschrieben, obwohl Aktivitätsmessungen in Extrakten und mit gereinigten Enzymen durchgeführt wurden (Choi *et al.*, 1966; Trijbels und Vogels, 1967; Yoo *et al.*, 1985; McIninch *et al.*, 2003).

Für die Aktivitätsmessung der Ureidoglykolat Amidohydrolase im Extrakt von Sojabohnen wurde Mangan verwendet (Winkler *et al.*, 1988b). Weiterhin wurde auch für *Phaseolus vulgaris* eine Steigerung der Aktivität durch Mangan und auch Zink mit dem gereinigten Enzym beschrieben (Wells und Lees, 1991). Laborinterne Daten belegen, dass die aufgereinigten Enzyme *AtUAH* und *GmUAH* in ihrer Aktivität manganabhängig sind, wobei entgegen den AAHs Kobalt und Nickel, sowie auch Zink keinen Einfluss haben (Przybycin, 2008).

2.1.3.3.4 Endprodukte der beteiligten Enzyme

Unabhängig davon, über welche der oben genannten Enzyme die Ureide abgebaut werden, die Endprodukte sind Ammoniak Kohlenstoffdioxid und Glyoxylat. Auch wenn zunächst Harnstoff freigesetzt wird, wird dieser über ureolytische Aktivitäten letztendlich zu Ammoniak und Kohlenstoffdioxid hydrolysiert.

Messungen in Sojabohnenextrakten ergaben, dass das gesamte freigesetzte Ammoniak aus Ureiden in Proteine eingebaut wird, ähnlich zum Amidstickstoff von Glutamin (Coker und Schaefer, 1985). Darüber hinaus wiesen Gewebe mit erhöhtem Ureidabbau auch eine höhere Aktivität der Glutaminsynthetase (GS) auf, so dass die Autoren schlussfolgerten, dass das Ammoniak der Ureide zunächst über GS in Glutamin und dann über Glutamatsynthase (GOGAT) und andere Transaminasen in weitere Aminosäuren und schließlich in Proteine eingebaut wird. Weiterhin zeigten sie, dass das C2 von Allantoin nicht in pflanzliches Material eingebaut wird und wahrscheinlich als CO₂ verloren geht. Hingegen wird die Hälfte des C5 von Allantoin als Methylenkohlenstoff in Proteinen und andere Zellkomponenten gefunden. Diese Daten wurden von Winkler *et al.*, 1988b in Sojabohne bestätigt. Sie konnten zeigen, dass C2 und C7 von

Allantoin in CO₂ umgewandelt werden, wohingegen C4 und C5 von Allantoin in Glyoxylat, CO₂, Glycin und Serin wiedergefunden werden können. Dies deutet auf eine Metabolisierung von Glyoxylat durch den photorespiratorischen Stoffwechselweg hin.

2.1.3.3.5 Lokalisation der beteiligten Enzyme

Von Hanks *et al.*, 1981 wurde beschrieben, dass die Allantoinase (ALN) aus Sojabohnenknöllchen wahrscheinlich im ER lokalisiert ist, wobei sie möglicherweise auch an die ER-Membran gebunden sein könnte. Diese Daten wurden mit Hilfe von Enzymaktivitätsmessungen nach erfolgter Organellentrennung mittels Saccharosedichtegradientenzentrifugation erhalten. Die Lokalisation der pflanzlichen Allantoinasen im ER konnte 2008 durch Ko-Lokalisationsstudien mit der C-terminal YFP-markierten ALN aus Arabidopsis und dem ER-Marker GFP-HDEL (Batoko *et al.*, 2000) bestätigt werden (Werner *et al.*, 2008). In dieser Arbeit wurde mit Hilfe derselben Methode weiterhin festgestellt, dass auch die pflanzlichen Allantoat Amidohydrolasen (AAHs) im ER lokalisiert sind, wobei die AAH aus Arabidopsis entgegen der *AtALN* nicht uniform im ER lokalisiert wurde, sondern in bestimmten Substrukturen, die auf eine

Bindung und Zurückhaltung des Enzyms im ER hinweisen (Werner *et al.*, 2008). Laborinterne Daten weisen außerdem daraufhin, dass auch die pflanzlichen Ureidoglykolat Amidohydrolasen (UAHs) im ER lokalisiert sind, da sowohl das Sojabohnenenzym als auch das Arabidopsisenzym mit dem ER-Marker GFP-HDEL ko-lokalisieren.

Die Lokalisation der pflanzlichen ALNs, AAHs und UAHs im ER weist darauf hin, dass der gesamte Ureidabbau in Pflanzen im ER stattfindet. Das bedeutet, dass es zu einem subzellulären „Ortswechsel“ des Purinabbaus auf der Stufe des Allantoins kommt, da sowohl die Uricase (van den Bosch und Newcomb, 1986) und die HIU Hydrolase (Raychaudhuri und Tipton, 2002; Lamberto *et al.*, 2010), als auch die OHCU Decarboxylase (Lamberto *et al.*, 2010) in Peroxisomen lokalisiert sind.

2.1.3.3.6 Transport

Der Transportmechanismus, über welchen das Allantoin von den Peroxisomen zum ER gelangt, ist noch nicht bekannt. Prinzipiell sind drei Transportmechanismen vorstellbar: A) eine direkte Peroxisomen-ER-Bindung, B) ein Vesikel-basierter Transport von den Peroxisomen zum ER und C) ein Transporter-/Diffusions-vermittelter Weg, der den Export aus den Peroxisomen, den Weg durch das Zytosol

und den Import in das ER beinhaltet. Hinweise für eine direkte Peroxisomen-ER-Konnektivität (A) wurden von Sinclair *et al.*, 2009 gefunden, wobei eine Peroxisomen-ER-Assoziation auch von Raychaudhuri und Tipton, 2002 beschrieben wurde. Ebenso gibt es Hinweise für einen Vesikel-basierten Transport von den Peroxisomen zum ER (B) (Mullen und Trelease, 2006), wobei dieser zunächst nur für ein virales Protein in Pflanzen gezeigt werden konnte (McCartney *et al.*, 2005). Hinweise auf Transporter in Peroxisomen und im ER, die Allantoin ex-/importieren können, sind bisher nicht bekannt (Linka und Weber, 2010). Allerdings wird auch ein diffusionsbasierter Transport des Allantoins in Betracht gezogen (Hanks *et al.*, 1981).

Allantoin kann als einzige äußere Stickstoffquelle für *Arabidopsis thaliana* und *Phaseolus vulgaris* dienen (Desimone *et al.*, 2002; Pelissier *et al.*, 2004). Dies wurde im Zusammenhang mit der Identifizierung von Allantointransportern in beiden Pflanzenspezies gezeigt. Hierbei konnte in beiden Arbeiten eine Beteiligung des jeweiligen Transporters (*AtUPS1* bzw. *PvUPS1*) an der Allantoinaufnahme aus dem Medium in die Pflanzen nicht nachgewiesen werden. Somit ist der Import von Allantoin in die Pflanzen noch immer unbekannt. Einmal in der Pflanze, können die Ureide entweder symplastisch oder

apoplastisch von Zelle zu Zelle transportiert werden. Während die symplastische Art einen ungehinderten Transport durch alle pflanzlichen Gewebe gewährleistet und auch die Verwendung des beförderten Metabolits in den Zellen ermöglicht, benötigt die apoplastische Art Transporter, die den jeweiligen Metabolit aus dem Apoplasten in die Zelle importieren. Dies wird vor allem dann notwendig, wenn

Barrieren (wie der Kasparische Streifen) den apoplastischen Transportweg verhindern oder der Metabolit in der Zelle verwendet werden soll. In *Phaseolus vulgaris* ist ein solcher Transporter für Allantoin identifiziert worden (Pelissier *et al.*, 2004). Er ist am stärksten in Knöllchen und knöllchentragenden Wurzeln exprimiert. *PvUPS1*-Expression wurde in der Knöllchenendodermis sowie in der

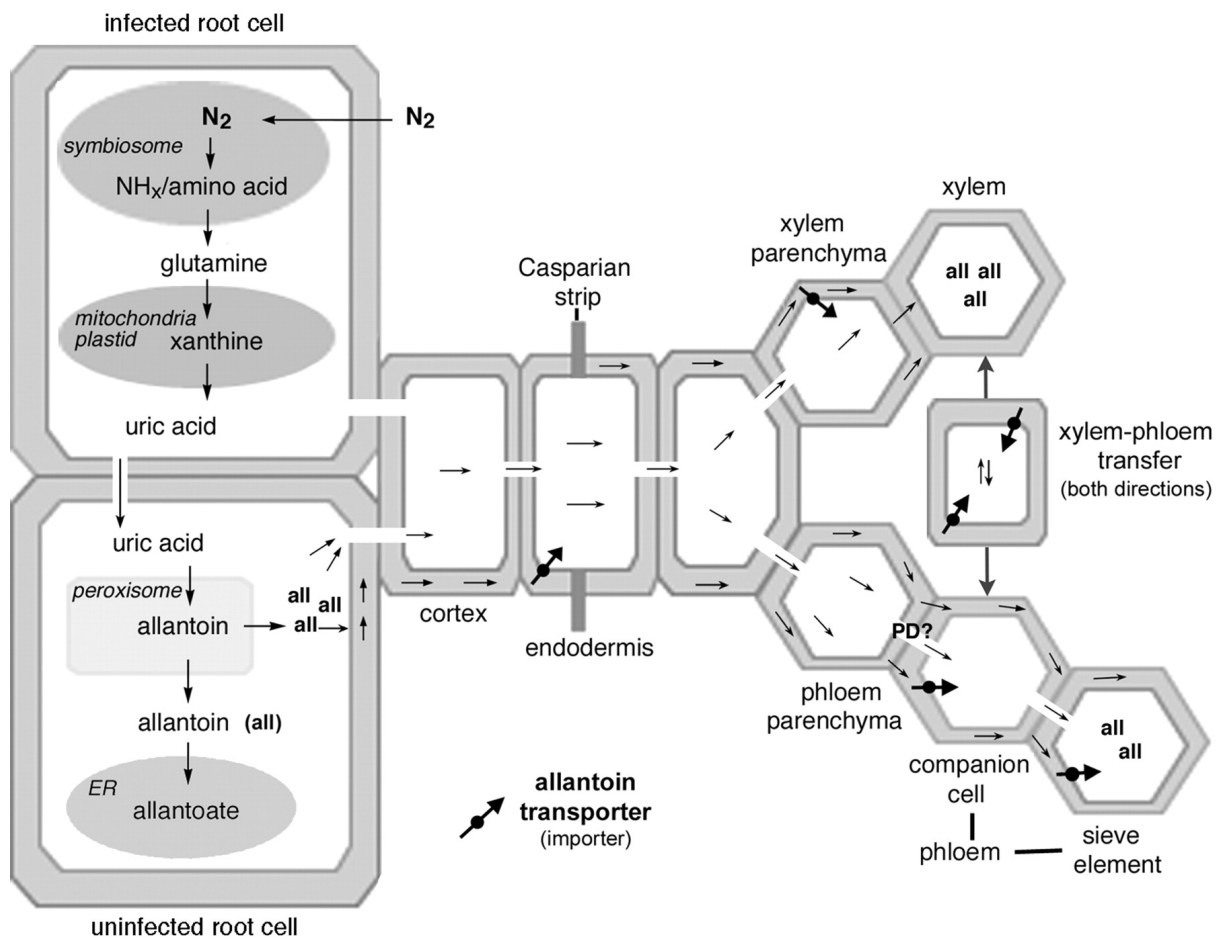


Abbildung 5 – Model des Allantointransports in Knöllchen von *Phaseolus vulgaris* (Pelissier *et al.*, 2004)

PvUPS1 ist stark in der Endodermis und dem Phloem des Knöllchenleitgewebes exprimiert und könnte daher an a) der Ladung von Allantoin in den Symplasten zum Transfer über den Kasparischen Streifen der Leitbündelendodermis, b) dem Import von Allantoin in das Xylemparenchym, c) der Phloembeladung mit Allantoin, d) der Rückgewinnung von Allantoin (ausgetreten in den Apoplasten) und e) dem Transfer von Allantoin vom Xylem zum Phloem beteiligt sein. *PvUPS1* ist auch in der Knöllchenendodermis exprimiert (in diesem Model nicht gezeigt), wo es Allantoin aus dem Apoplasten aufnehmen soll, um es dem Leitgewebe zuzuführen.

Endodermis und dem Phloem des Leitgewebes in den Knöllchen detektiert. Dies impliziert eine Beteiligung von PvUPS1 am Transport des Allantoins vom Knöllchen in das Leitgewebe der Pflanze und zwar explizit über den Import von Allantoin aus dem Apoplasten in den Symplasten, um die Endodermen zu passieren. Außerdem ist PvUPS1 an der Beladung des Phloems mit Allantoin für den Langstreckentransport beteiligt (Abbildung 5). Die Xylembeladung mit Allantoin ist unbekannt. Zwar wurde PvUPS1 auch in Xylemparenchymzellen lokalisiert, die Autoren gehen hier aber von einer Funktion des PvUPS1-vermittelten Imports zur Lagerung des Allantoins im Spross aus (Pelissier und Tegeder, 2007).

Die Entladung des Allantoins aus dem Phloem geschieht wahrscheinlich symplastisch entlang dem Konzentrationsgradienten (Pelissier und Tegeder, 2007).

PvUPS1 transportiert kein Allantoat (Pelissier *et al.*, 2004), so dass dessen Transport noch vollständig unbekannt ist. Darüber hinaus ist nicht geklärt, wie Allantoin und Allantoat das ER verlassen, um symplastisch oder apoplastisch transportiert zu werden und wie sie in das ER wieder importiert werden, um metabolisiert zu werden.

2.1.3.3.7 Ureide und Stress

Unabhängig von der Funktion der Ureide als Stickstofflieferanten besitzen sie auch eine Funktion in der Antwort auf Stress. So wurde gezeigt, dass Dunkelstress und Seneszenz eine Akkumulation der Ureide bewirken, wobei diese die Zellen vor reaktiven Sauerstoffspezies schützen sollen (Brychkova *et al.*, 2008). Der Verlust der Ureidsynthese führt zu einer vorzeitigen Seneszenz (Brychkova *et al.*, 2008) und einer Hypersensitivität in Bezug auf Trockenstress (Watanabe *et al.*, 2010). Dies wird von beiden Autoren auf eine mangelnde Fähigkeit, reaktive Sauerstoffspezies zu entgiften, zurückgeführt.

2.1.3.3.8 Ureide in Sojabohne

Matsumoto *et al.*, 1977

Die Ureide Allantoin und Allantoat sind bereits in den trockenen Samen von Sojabohnen enthalten. Unabhängig von einer Symbiose steigt der Ureidgehalt in den Kotyledonen während der Keimung an, erreicht ein Maximum nach fünf Tagen und fällt dann wieder ab. Von nun an hängt die Akkumulation der Ureide von einer Symbiose mit dem Bakterium *Rhizobium japonicum* ab. Pflanzen ohne Symbiose besitzen ein geringes Niveau an Ureiden, welches während ihrer Wachstumsperiode

nicht verändert wird. Dem entgegen akkumulieren symbiotisch lebende Pflanzen Ureide in allen Geweben in vergleichsweise hoher Konzentration, welche mit dem Wachstum der Pflanzen (besonders in der reproduktiven Phase) steigt, ihr Maximum etwa im Stadium der grünen Schoten zeigt und danach wieder fällt. Hierbei zeigt sich, dass im Spross das höchste Niveau der Ureidakkumulation erreicht wird, verglichen mit allen anderen Organen. Der Ureidgehalt beträgt hier bis zu 75% des gesamten löslichen Stickstoffs. Junge, sich entwickelnde Blätter enthalten die meisten Ureide der Blätter, wobei das Niveau zunächst ansteigt, genau vor Beendigung der Blattentwicklung wieder sinkt und in den unteren voll entwickelten Blättern kaum noch sichtbar ist. In den jungen, grünen Schoten kommt es zur höchsten Ureidkonzentration überhaupt, wobei die Ureide hier bis zu 50% des löslichen Stickstoffs enthalten. Nur 15% des Schotenureidgehalts sind in den Samen vorhanden, was auf einen Abbau der Ureide zu Gunsten der Proteinsynthese hindeutet.

McClure und Israel, 1979

Abhängig von einer Symbiose werden verschiedene Stickstoffverbindungen im Xylem von Sojabohnen transportiert. Bei nichtsymbiotischen Pflanzen, die mit 20 mM KNO_3 versorgt werden, setzt sich der Gesamtstickstoff im Xylem zu 58% aus Nitrat, zu 36% aus Aminosäuren und zu 6%

aus den Ureiden zusammen. Hierbei werden 90% der Aminosäurefraktion von nur sechs Aminosäuren gebildet (Asn, Gln, Asp, Arg, Lys und His), wobei 74% der Gesamtaminosäurefraktion aus Asparagin (Asn) besteht. Bei fixierenden Pflanzen wird der Gesamtstickstoff im Xylem zu 80% von den Ureiden und zu 20 % von Aminosäuren transportiert. Hierbei ist Allantoat mit 80% die Haupttransportform der Ureide und Asn mit 53% die Haupttransportform der Aminosäuren.

Newcomb und Tandon, 1981

Wenn die Pflanze mit den Bakterien eine Symbiose eingeht, werden die infizierten Zellen der Wurzel stark vergrößert und mit Bakteroiden gefüllt. Die Peroxisomen dieser Zellen verschwinden fast vollständig, wohingegen die Plastiden- und Mitochondrienzahl stark zunimmt. In den uninfizierten Zellen des Knöllchens vergrößern sich die Peroxisomen und ihre Anzahl nimmt zu. Auch das glatte ER wird stark vergrößert, ein Prozess der sonst für sekretorische Zellen bekannt ist. Diese strukturellen Veränderungen deuten darauf hin, dass es zu einer Spezialisierung der Funktionen der Zellen gekommen ist und die letzten Schritte der Ureidbildung in den uninfizierten Zellen stattfinden. Übereinstimmend mit vorherigen Studien erfolgt die Purinsynthese in den infizierten Zellen. Die Oxidation der Purine zu den Ureiden geschieht jedoch nicht

ausschließlich dort. Das gebildete Urat wird aus den infizierten Zellen in die Peroxisomen der uninfizierten Zellen transportiert, wo Allantoin gebildet wird. Dieses gelangt von dort in das glatte ER der uninfizierten Zellen und bildet hier Allantoat. Somit spielen die uninfizierten Zellen der Knöllchen eine essentielle Rolle im Stickstoffmetabolismus der Knöllchen.

Layzell und LaRue, 1982

An der Versorgung sich entwickelnder Schoten in Leguminosen sind drei Prozesse beteiligt: a) Einfuhr eines nährstoffreichen Phloemstrangs, der aus dem Blatt kommt, b) Aufnahme von Wasser und gelösten Substanzen in den Transpirationsstrom und c) direkter Einbau des Kohlenstoffs aus der Photosynthese. In nichtsymbiotischen Pflanzen wird im Xylem der Stickstoff zu 45% als Amide und zu 23% als Nitrat transportiert. Hingegen wird in Phloemsträngen, die aus Blättern kommen, 63% des Stickstoffs als Amide exportiert. In den Phloemsträngen der Schoten werden dagegen 47% des Stickstoffs als Amide gefunden aber auch 33% als Ureide. In fixierenden Pflanzen stellen die Ureide 90% des Xylemstickstoffs. Im Blattphloem sind 36% des exportierten Stickstoffs Ureide und 44% Amide, wohingegen im Schotenphloem 55% Ureide und 26% Amide gefunden werden. Daher ist es wahrscheinlich, dass es im Spross einen Xylem-zu-Phloem-Transfer gibt, der das

Phloem mit stickstoffreichen Verbindungen anreichert und bis zu 52% des Schotenstickstoffs bereitstellt.

Rainbird *et al.*, 1984

Die Ureide stellen generell 60% - 80% des Gesamtstickstoffs in allen Geweben von fixierenden Pflanzen dar, außer im Embryo, wo sie nur mit 14% vertreten sind. Asparagin ist hier die vorherrschende Stickstoffverbindung mit 58% des Gesamtstickstoffs. Die Samenschale selbst akkumuliert Ureide in sehr hohem Maße, liefert den Stickstoff an den Embryo aber hauptsächlich in Form von Glutamin (52%) und Asparagin (19%), wobei die Ureide hier nur eine untergeordnete Rolle spielen. Diese Selektivität wird trotz der sehr hohen Konzentrationen an Ureiden im Xylemsaft, im Phloemsaft und im maternalen Schotengewebe durchgeführt.

Winkler *et al.*, 1988a

Im Gegensatz zu amidtransportierenden Leguminosen sind ureidtransportierende Leguminosen meist tropischen oder subtropischen Ursprungs und haben eine bestimmte Knöllchenstruktur, die einen größeren Fluss an Transpirationswasser durch das Knöllchen erlaubt. In Sojabohnen ist die Allantoinaseaktivität in Knöllchen, Blättern, jungen Schoten und reifen Samen achtzig Mal höher als die der allantoat-abbauenden Aktivität. Hierbei ist die Allantoinaseaktivität in den Knöllchen wahrscheinlich entscheidend für den

Ureidmetabolismus, da Allantoat das vorherrschende Ureid im Xylemsaft ist. Die meisten veröffentlichten Diskussionen über den Ureidabbau geben an, dass Allantoat über Allantoicase und Ureidoglykolat Urea Hydrolase zu Glyoxylat und Harnstoff abgebaut wird. Dem entgegen konnte in anderen Studien gezeigt werden, dass das Wachstum von Sojabohnenzellkulturen mit Allantoin als Stickstoffquelle unabhängig von Nickel (Urease-Kofaktor) ist (Polacco *et al.*, 1982) und dass in intakten Blattgeweben die Freisetzung von markiertem Kohlenstoff als CO₂ nicht durch einen Ureaseinhibitor beeinträchtigt wird (Winkler *et al.*, 1987). Die Aufreinigung und Charakterisierung der allantoat- und ureidoglykolatabbauenden Enzyme wird hierbei nötig sein, um den Stoffwechselweg des Ureidabbaus vollständig zu verstehen.

2.2 Vorgeschichte im Labor

Da die Frage nach der Art der Stickstofffreisetzung aus Ureiden in Pflanzen nicht geklärt und noch immer Gegenstand kontroverser Diskussionen war (für Review siehe Todd *et al.*, 2006), sollte der Ureidabbau in unserer Arbeitsgruppe näher untersucht werden. Hierbei lag ein Hauptziel in der Identifizierung der beteiligten Enzyme.

Zu Beginn der Untersuchung des Ureidabbaus war das Wissen über die beteiligten Enzyme noch sehr lückenhaft. Wie zuvor dargelegt, gab es Enzyme, die zwar in Mikroorganismen genetisch identifiziert wurden, aber biochemisch uncharakterisiert blieben und man kannte bestimmte Enzymaktivitäten in Rohextrakten, denen aber kein Gen zugeordnet werden konnte.

Zusammenfassend gab es jedoch Hinweise darauf, dass es sowohl für Allantoat als auch für Ureidoglykolat zwei Klassen an katabolischen Enzymen gibt, die entweder Harnstoff oder Ammoniak freisetzen. So sollte nun untersucht werden, welche Klasse an Enzymen den Ureidabbau in Pflanzen katalysiert und somit die Frage geklärt werden, in welcher Form der Ringstickstoff der Purine freigesetzt wird – als Harnstoff oder Ammoniak.

Um die entsprechenden Enzyme in Pflanzen zu identifizieren, wurden die Enzyme beider Klassen, die in Mikroorganismen bereits genetisch identifiziert wurden, für einen Proteinsequenzvergleich mit translatierten Sequenzen aus *Arabidopsis* verwendet. Hier zeigte sich, dass *Arabidopsis* keine Orthologen zu dem harnstofffreisetzenden Enzym Allantoicase (EC 3.5.3.4) und nur schwache Sequenzorthologe zur Ureidoglykolat Urea Hydrolase (EC 4.3.2.3) aufweist. Dem hingegen besitzt *Arabidopsis* gleich zwei

Kandidaten für eine mögliche Allantoat Amidohydrolase (AAH, EC 3.5.3.9), ortholog zum *E. coli* Enzym AllC. Bei der Untersuchung der zwei Kandidatengene aus *Arabidopsis* stellte sich heraus, dass es sich bei einem der beiden Kandidaten (*AtAAH-1*) tatsächlich um eine pflanzliche AAH handelt, die Allantoat unter Ammoniakfreisetzung abbaut (Werner *et al.*, 2008). Der zweite Kandidat (*AtAAH-2*) zeigte keine Aktivität mit Allantoat, allerdings konnten bereits starke Hinweise auf seine Funktion als ureidoglykolatabbauendes Enzym gefunden werden (Werner, 2007). Diese Aktivität der *AtAAH-2* konnte später bestätigt werden (Przybycin, 2008). Es zeigte sich, dass der zweite AAH-Kandidat aus *Arabidopsis* die eigentliche Ureidoglykolat Amidohydrolase (UAH) ist, welche Ureidoglykolat unter Ammoniakfreisetzung abbaut. Diese UAH ist das erste Enzym dieser Klasse, welches genetisch identifiziert wurde.

Nach der genetischen Identifizierung dieser beiden Enzyme und deren biochemischer Charakterisierung, sowie Hinweisen auf ihre *in vivo* Funktion und Relevanz in *Arabidopsis*, verstärkte sich die Annahme, dass in *Arabidopsis* der Ureidabbau ohne die Freisetzung von Harnstoff katalysiert wird. In einem Experiment sollte gezeigt werden, dass der Ureidabbau in *Arabidopsis* von Allantoat über Ureidoglykolat zu Glyoxylat durch diese beiden Enzyme

(AAH und UAH) katalysiert wird. Das Ergebnis überraschte, da es belegte, dass diese beiden Enzyme nicht ausreichen, um den vollständigen Umsatz von einem Mol Allantoat zu Glyoxylat unter Freisetzung von vier Mol Ammoniak zu katalysieren. Es musste ein drittes Enzym geben, dessen Beteiligung und Identität bis dahin unbekannt war.

2.3 Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, die Beteiligung eines Kandidatenenzym am Ureidabbau zu untersuchen und so den Versuch zu machen, eine vollständige enzymatische Beschreibung des Ureidabbaus zu erreichen. Es sollte der Beweis geführt werden, dass im Falle des AAH-vermittelten Weges entgegen der Theorie nicht nur zwei sondern drei Enzyme für den Allantoatabbau benötigt werden. Der so komplettierte Ureidabbau sollte nicht nur für *Arabidopsis* sondern auch für den mikrobiologischen Modellorganismus *E. coli* und für die stickstofffixierende Leguminose Sojabohne gezeigt werden, bei der der Ureidabbau eine spezielle Relevanz besitzt. Darüber hinaus sollte die *in vivo* Funktion und Relevanz der UAH für *Arabidopsis* und vor allem für Sojabohne gezeigt werden, da ihre Existenz besonders im Leguminosenfeld noch immer sehr umstritten ist (Todd *et al.*, 2006).

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Verwendete Nährmedien

Folgende Medien wurden für das Wachstum von Bakterien und Pflanzen verwendet (Tabelle 1).

Tabelle 1: verwendete Nährmedien

Medium	verwendet für	Inhaltsstoffe (w/v)	pH-Wert	für Festmedium
LB ¹	<i>Escherichia coli</i>	1,0% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 1,0% NaCl	pH 7,0 (NaOH)	1,5% Agar
YEB ²	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	0,5% Fleischextrakt, 0,1% Hefeextrakt, 0,5% Pepton, 0,5% Saccharose, 2mM MgSO ₄	pH 7,2 (NaOH)	1,5% Agar
AG ³	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	0,0007% FeCl ₃ · 6H ₂ O 0,0180% MgSO ₄ · 7H ₂ O 0,0013% CaCl ₂ · 2H ₂ O 0,0250% Na ₂ SO ₄ 0,0320% NH ₄ Cl 0,0125% Na ₂ HPO ₄ · 12H ₂ O 0,1300% HEPES 0,1100% MES 0,1000% D-Arabinose 0,1000% Natriumglukonat 0,1000% Hefeextrakt	pH 6,9 (NaOH)	1,5% Agar
½ MS ⁴	<i>Arabidopsis thaliana</i>	(+N) 0,22% MS-Salz (Duchefa) (+Aln) 0,03% MS modified basal salt mixture without N, P & K (PhytoTechnologyLaborat.), 1,25 mM K ₂ HPO ₄ , 10 mM Allantoin, 0,05% MES	pH 5,7 (KOH)	0,8% Phytoagar

SM ⁵	<i>Glycine max</i>	0,029400% CaCl ₂ · 2H ₂ O 0,010980% K ₂ SO ₄ 0,012320% MgSO ₄ · 7H ₂ O 0,011410% K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O 0,000695% FeSO ₄ · 7H ₂ O 0,000933% Na ₂ EDTA 0,000014% H ₃ BO ₃ 0,000017% MnSO ₄ · H ₂ O 0,000029% ZnSO ₄ · 7H ₂ O 0,000024% Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O 0,000024% NiCl ₂ · 6H ₂ O 0,000024% CoCl ₂ · 6H ₂ O 0,000025% CuSO ₄ · 5H ₂ O 0,040244% NH ₄ NO ₃ für (+N)		
-----------------	--------------------	--	--	--

¹ nach Bertani, 1951

² nach Fisher und Guiltinan, 1995

³ nach Sadowsky *et al.*, 1987

⁴ nach Murashige und Skoog, 1962

⁵ nach Todd und Polacco, 2004

3.1.2 Verwendete Konstrukte

Die in Tabelle 2 dargestellten Konstrukte wurden für die transiente Überexpression in Pflanzen verwendet. Alle Konstrukte sind hierbei unter Kontrolle eines 35S-

Promotors und mit einer Sequenz zur C-terminalen Markierung versehen, die sich aus der Vektorbezeichnung ableiten lässt.

Tabelle 2: verwendete Konstrukte zur Überexpression in Pflanzen

Organismus	klonierte cDNA	Vektor	Resistenz in Bakterien	Resistenz in Pflanzen
<i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0	<i>AtALN</i> (At4g04955) ²	pXCSnptII-HAStrep ²	amp ^R /carb ^R	kan ^R
		pXCS-3Myc	amp ^R /carb ^R	ppt ^R
<i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0	<i>AtAAH</i> (At4g20070) ²	pXCS-HAStrep ¹ (AY457636)	amp ^R /carb ^R	ppt ^R
		pXCS-3Myc	amp ^R /carb ^R	ppt ^R
<i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0	<i>AtUGlyAH</i> (At4g17050)* ³	pXCS-HAStrep ¹ (AY457636)	amp ^R /carb ^R	ppt ^R
		pXCS-3Myc	amp ^R /carb ^R	ppt ^R
<i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0	<i>AtUAH</i> (At5g43600) ²	pXCS-HAStrep ¹ (AY457636)	amp ^R /carb ^R	ppt ^R
		pXCS-3Myc	amp ^R /carb ^R	ppt ^R
<i>Glycine max</i> Williams 82	<i>GmALN 1</i> (Glyma15g07910)	pXCS-HAStrep ¹ (AY457636)	amp ^R /carb ^R	ppt ^R
<i>Glycine max</i> Williams 82	<i>GmALN 2</i> (Glyma13g31430)	pXCS-HAStrep ¹ (AY457636)	amp ^R /carb ^R	ppt ^R
<i>Glycine max</i> Williams 82	<i>GmALN 3</i> (Glyma13g31420)	pXCS-HAStrep ¹ (AY457636)	amp ^R /carb ^R	ppt ^R
<i>Glycine max</i> Williams 82	<i>GmALN 4</i> (Glyma15g07920)	pXCS-HAStrep ¹ (AY457636)	amp ^R /carb ^R	ppt ^R

<i>Glycine max</i> Williams 82	<i>GmAAH 1</i> (Glyma09g05600) ²	pXCS-HAStrep ¹ (AY457636)	amp ^R /carb ^R	ppt ^R
<i>Glycine max</i> Williams 82	<i>GmAAH 2</i> (Glyma15g16870)	pXCS-HAStrep ¹ (AY457636)	amp ^R /carb ^R	ppt ^R
<i>Glycine max</i> Williams 82	<i>GmUGlyAH 1</i> (Glyma17g15820)*	pXCS-HAStrep ¹ (AY457636)	amp ^R /carb ^R	ppt ^R
<i>Glycine max</i> Williams 82	<i>GmUGlyAH 2</i> (Glyma05g05490)	pXCS-HAStrep ¹ (AY457636)	amp ^R /carb ^R	ppt ^R
<i>Glycine max</i> Williams 82	<i>GmUAH 1</i> (Glyma10g32850)	pXCS-HAStrep ¹ (AY457636)	amp ^R /carb ^R	ppt ^R
<i>Oryza sativa</i> Nipponbare	<i>OsAAH</i> (Os06g0665500)	pXCS-HAStrep ¹ (AY457636)	amp ^R /carb ^R	ppt ^R
<i>Oryza sativa</i> Nipponbare	<i>OsUGlyAH</i> (Os07g0495000)	pXCS-HAStrep ¹ (AY457636)	amp ^R /carb ^R	ppt ^R
<i>Oryza sativa</i> Nipponbare	<i>OsUAH</i> (Os12g0597500)	pXCS-HAStrep ¹ (AY457636)	amp ^R /carb ^R	ppt ^R

¹ Witte *et al.*, 2004² Werner *et al.*, 2008³ Werner *et al.*, 2010

* im Rahmen der Doktorarbeit kloniert (siehe 3.2.1.1.1)

Die in Tabelle 3 dargestellten Konstrukte wurden für die transiente Überexpression in *E. coli* verwendet. Alle Konstrukte sind

hierbei unter Kontrolle eines T7-Promotors und mit einer Sequenz zur C-terminalen His-Markierung versehen.

Tabelle 3: verwendete Konstrukte zur Überexpression in *E. coli*

Organismus	klonierte cDNA	Vektor	Resistenz in Bakterien	Enzymvariante
<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> DC3000	<i>PsALC</i> (NP_793442)* ²	pET30-CTH ¹	kan ^R	Wildtyp
<i>Escherichia coli</i> K-12 DH10B	<i>EcAAH</i> (YP_001729419)* ²	pET30-CTH ¹	kan ^R	Wildtyp
<i>Escherichia coli</i> K-12 DH10B	<i>EcUGlyAH</i> (YP_001729418)* ²	pET30-CTH ¹	kan ^R	Wildtyp
<i>Escherichia coli</i> K-12 DH10B	<i>EcUUH</i> (YP_001729408)* ²	pET30-CTH ¹	kan ^R	Wildtyp
<i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0	<i>AtALN</i> (At4g04955)*	pET30-ncoCTH	kan ^R	Δ 1-32 AS + Start M
<i>Glycine max</i> Williams 82	<i>GmALN 2</i> (Glyma13g31430)*	pET30-ncoCTH	kan ^R	Δ 1-29 AS + Start M
<i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0	<i>AtAAH</i> (At4g20070)*	pET30-ncoCTH	kan ^R	Δ 1-77 AS + Start M
<i>Glycine max</i> Williams 82	<i>GmAAH 1</i> (Glyma09g05600)*	pET30-CTH ¹	kan ^R	Δ 1-29 AS
<i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0	<i>AtUGlyAH</i> (At4g17050)*	pET30-ncoCTH	kan ^R	Δ 1-21 AS + Start M
<i>Glycine max</i> Williams 82	<i>GmUGlyAH 1</i> (Glyma17g15820)*	pET30-ncoCTH	kan ^R	Δ 1-19 AS + Start M
<i>Arabidopsis thaliana</i> Col-0	<i>AtUAH</i> (At5g43600)*	pET30-ncoCTH	kan ^R	Δ 1-30 AS + Start M
<i>Glycine max</i> Williams 82	<i>GmUAH 1</i> (Glyma10g32850)*	pET30-ncoCTH	kan ^R	Δ 1-29 AS

¹ Glinski *et al.*, 2003² Werner *et al.*, 2010

* im Rahmen der Doktorarbeit kloniert (siehe 3.2.1.1.2)

3.1.3 Verwendete Bakterien und Viren

Folgende Bakterien wurden während der Doktorarbeit verwendet (Tabelle 4).

Tabelle 4: verwendete Bakterien

Bakterienart	Stamm	Resistenzgene	transformiert mit
<i>Escherichia coli</i>	K-12 DH10B [#]	-	siehe Konstrukte in Tabelle 2 & Tabelle 3
<i>Escherichia coli</i>	BL21 DE3 ⁺	-	siehe Konstrukte in Tabelle 3
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV3101::pMP90RK ¹	rif ^R , gent ^R , kan ^R ,	siehe Konstrukte in Tabelle 2
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	C58C1::pCH32 ²	rif ^R , tet ^R	binärer Vektor (kan ^R) mit 35S:p19
<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	110spc4 ³	spec ^R	-

[#] Invitrogen

⁺ Novagen

¹ Koncz und Schell, 1986

² Voinnet *et al.*, 2003

³ Regensburger und Hennecke, 1983

Die in Tabelle 5 dargestellten Konstrukte wurden für die Virus-induzierte Genabschaltung (VIGS) in Sojabohne verwendet. In allen Fällen handelte es sich um den Bean Pod Mottle Virus (BPMV) IA-Di1. Dieser Virus besitzt ein zweigeteiltes (+)-Strang-RNA-Genom (RNA1 und RNA2). Zur biotechnologischen Anwendung wurden DNA-basierte BPMV-VIGS-Vektoren verwendet (pBPMV-IA-R1 und pBPMV-IA-R2), bei denen die RNA1 und RNA2 unter Kontrolle eines 35S-Promotors stehen und durch einen Nos-Terminator

begrenzt werden (Zhang *et al.*, 2009). Dies ermöglicht eine direkte Inokulation der viralen Vektor-DNA in Sojabohne, da diese dort zur RNA transkribiert wird, woraufhin sich der Virus bilden kann. Durch Modifikation von pBPMV-IA-R2 wurde ein Vektor geschaffen (pBPMV-IA-V1), der die Insertion eines Zielgenfragmentes erlaubt (Zhang *et al.*, 2010). Dieses Zielgen wird bei erfolgter Virusinfektion in Sojabohne dann stummgeschaltet. Die in Tabelle 5 dargestellten Genfragmente wurden projektbezogen in pBPMV-IA-V1 kloniert (von Dr. Nieves Medina Escobar).

Tabelle 5: verwendete Konstrukte des BPMV zur Genabschaltung in Sojabohnen

verwendete Vektoren	klonierte cDNA-Fragmente	Bezeichnung	Zielgene
pBPMV-IA-R1 ¹ pBPMV-IA-V1 ²	-	Empty	- (Negativkontrolle)
pBPMV-IA-R1 ¹ pBPMV-IA-V1 ²	<i>PDS-3R</i> ² antisense	siPDS	<i>GmPDS</i> (Positivkontrolle)
pBPMV-IA-R1 ¹ pBPMV-IA-V1 ²	<i>GmALN 1</i> 3'ORF (262bp) antisense	siALN-1R	<i>GmALN 1</i> <i>GmALN 2</i> <i>GmALN 3</i> <i>GmALN 4</i>
pBPMV-IA-R1 ¹ pBPMV-IA-V1 ²	<i>GmAAH 2</i> 3'ORF (282bp) antisense	siAAH-1R	<i>GmAAH 1</i> <i>GmAAH 2</i>
pBPMV-IA-R1 ¹ pBPMV-IA-V1 ²	<i>GmUAH 1</i> 3'ORF (265bp)* antisense	siUAH-1R	<i>GmUAH 1</i> <i>GmUAH 2</i>
pBPMV-IA-R1 ¹ pBPMV-IA-V1 ²	<i>GmUAH 1</i> 5'ORF (263bp)* antisense	siUAH-2R	<i>GmUAH 1</i> <i>GmUAH 2</i>
pBPMV-IA-R1 ¹ pBPMV-IA-V1 ²	<i>GmUAH 1</i> Mitte-ORF (265bp)* antisense	siUAH-3R	<i>GmUAH 1</i> <i>GmUAH 2</i>

¹ Zhang *et al.*, 2009² Zhang *et al.*, 2010

* siehe Anhang

3.1.4 Verwendete Pflanzen

Folgende Pflanzen wurden im Rahmen der Doktorarbeit verwendet (Tabelle 6).

Tabelle 6: verwendete Pflanzen

Typ	Gattung & Art	Ökotyp / Kultivar	Beschreibung
Wildtypen	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia-0	-
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	-	-
	<i>Glycine max</i>	Williams 82	-
T-DNA- Insertionslinien (homozygot)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia-0	¹ SAIL_810_E12 <i>Ataln/Ataln</i> ³
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia-0	² SALK_112631 <i>Ataah/Ataah</i> ^{3,4}
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia-0	² SALK_024998 <i>Atuah/Atuah</i>
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia-0	² SALK_038002 <i>Ature/Ature</i> ⁵
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia-0	SALK_112631 x SALK_024998 <i>Ataah/Ataah</i> x <i>Atuah/Atuah</i>
Kreuzungen (homozygot)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia-0	SALK_112631 x SALK_038002 <i>Ataah/Ataah</i> x <i>Ature/Ature</i>
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia-0	SALK_024998 x SALK_038002 <i>Atuah/Atuah</i> x <i>Ature/Ature</i>
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia-0	35S- <i>AtALN</i> -HASTrep in SAIL_810_E12 ³
Komplementationslinien (homozygot)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia-0	35S- <i>AtAAH</i> -HASTrep in SALK_112631 ³

	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia-0	35S- Δ N-AtAAH-HAStrep in SALK 112631
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia-0	35S-AtUAH-HAStrep in SALK 024998
Komplementationslinien (segregierend)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia-0	35S-GmAAH 1-HAStrep in SALK 112631 ³
	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia-0	35S-GmUAH 1-HAStrep in SALK 024998*
Überexpressionslinien (segregierend)	<i>Arabidopsis thaliana</i>	Columbia-0	35S-AtUGlyAH-YFP in Wildtyp*

¹ Alonso *et al.*, 2003

² Sessions *et al.*, 2002

³ Werner *et al.*, 2008

⁴ Todd und Polacco, 2006

⁵ Witte *et al.*, 2005

* im Rahmen der Doktorarbeit hergestellt (siehe Kapitel 3.2.1.2.2.2)

3.1.5 Verwendete Datenbanken und Programme

Folgende Datenbanken und Programme wurden während der Doktorarbeit verwendet (Tabelle 7).

Tabelle 7: verwendete Datenbanken und Programme

Anwendung	Programm / Datenbank	Quelle
Texte & Tabellen	Microsoft Office Word 2003	
Tabellen & Berechnungen	Microsoft Office Excel 2003	
Statistik	IBM SPSS Statistics 19	
graphische Darstellungen	GraphPad Prism 4	
Heatmaps	MEV 4.3 TMEV	www.tm4.org
Bildbearbeitungen	Adobe Illustrator CS4	
	Adobe Photoshop CS4	
Sequenzsuchen	Phytozome	www.phytozome.org
	NCBI	www.ncbi.nlm.nih.gov
Sequenzbearbeitungen	Vector NTI Advance 10.0	
Primerdesign	Gemal	
Sequenzvergleiche	AlignX (Vector NTI)	
	Boxshade 3.21	www.ch.embnet.org
Sequenzübereinstimmungen	EMBOSS Needle	www.ebi.ac.uk
N-terminale Schnittstellen	SignalP 3.0 HMM	www.cbs.dtu.dk
Lokalisationsvorhersagen	Multiloc	www.abi.inf.uni-tuebingen.de
Proteininformationssuche	BRENDA	www.brenda-enzymes.org
Literatursuche	ISI Web of Knowledge	www.webofknowledge.com
	PubMed	www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 Klonierung von Konstrukten

Die Klonierungen wurden generell mittels Standardmethoden wie Polymerase-Kettenreaktion (PCR), Gelelektrophorese, Restriktionsverdau und Ligation durchgeführt. Hierbei wurde für die PCR folgendes Standardprogramm verwendet:

94°C	90 Sekunden	
94°C	30 Sekunden	c
X° C	30 Sekunden	c
72°C	60 Sekunden / kb	c
72°C	10 Minuten	
4°C	10 Minuten	

Die Anzahl der Zyklen (Schritte markiert mit c) wurde entsprechend der gewünschten Produktmenge angepasst. Als DNA-Polymerase wurde die Pfu- Plus (Roboklon)

verwendet. Die Auftrennung der DNA geschah mit einem 1%igen Agarosegel. Die DNA wurde aus diesem Agarosegel mittels High Pure PCR Cleanup Micro Kit (Roche) entsprechend dem Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die Restriktionsverdau wurden mit Enzymen von New England Biolabs durchgeführt. Für die Dephosphorylierung von Vektoren wurde die rAPid Alkaline Phosphatase (Roche) und für Ligationen die T4 DNA Ligase (Invitrogen) verwendet. Die jeweiligen Protokolle wurden den Anleitungen der Hersteller angepasst. Plasmidpräparationen wurden unter Verwendung des High Pure Isolation Kits (Roche) entsprechend der Betriebsanweisung durchgeführt.

3.2.1.1.1 Zur Überexpression in Pflanzen

Die Gene der *AtUGlyAH* (At4g17050) und *GmUGlyAH 1* (Glyma17g15820) wurden mittels PCR von cDNA aus *Arabidopsis*

Tabelle 8: verwendete Primer zur Klonierung in pXCS-Vektoren

Gen	Primernamen	Sequenz (5'-3')	angefügte Schnittstelle	verwendete Temperatur
<i>AtUGlyAH</i>	1686 At4g17050-E1F	AGAATTCAAAATGCGATCACTTTACTTAATC	EcoRI	53°C
	1687 At4g17050-E13R	CCCGGGCAATGGATTTCGATTCACA	XmaI	53°C
<i>GmUGlyAH 1</i>	1750 SoyYlbAfwdEcoRI	CTGAATTCAAAATGAGGAGCATCTTTGTCC	EcoRI	59°C
	1751 SoyYlbArevXmaI	ATCCCGGGCAGTGGGCTTCTGTTCG	XmaI	59°C

thaliana Col-0 bzw. *Glycine max* Williams 82 amplifiziert. Hierbei wurden die in Tabelle 8 aufgelisteten Primer verwendet. Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels der angefügten EcoRI- und XmaI-Schnittstellen in die entsprechenden binären Vektoren (siehe Tabelle 2) kloniert. Die erhaltenen Klone wurden sequenziert.

3.2.1.1.2 Zur Überexpression in *E. coli*

Die bakteriellen Gene wurden ausschließlich von genomischer DNA amplifiziert. Hierbei wurde für die Klonierung von *PsALC* (NP_793442) die DNA aus *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 durch 15 minütiges Aufkochen der Bakterien gewonnen. Für die Klonierungen von *EcAAH* (YP_001729419), *EcUGlyAH* (YP_001729418) und *EcUUH* (YP_001729408) aus *E. coli* DH10B musste die genomische DNA hingegen aufgereinigt werden. Dafür wurden 30 ml Übernachtskultur für 10 Minuten bei maximaler Geschwindigkeit (mG) zentrifugiert und das Bakterienpellet in 2 ml DNA-Extraktionspuffer (200 mM Tris_{pH8}, 200 mM NaCl und 25 mM EDTA) resuspendiert. Nach Zugabe einer Spatelspitze Lysozym wurde die bakterielle Lösung für 15 Minuten bei Raumtemperatur (Rt) inkubiert. Dann wurden 100 µl SDS-Lösung (10%) hinzugefügt, durch Invertieren hineingemischt und für 5

Minuten bei 80°C inkubiert. Nach dreiminütiger Zentrifugation bei mG und Rt wurden 500 µl Überstand entnommen und mit 375 µl Isopropanol für 2 Minuten gefällt. Nach zehnminütiger Zentrifugation (mG und Rt) wurde das DNA-Pellet mit 1 ml Ethanol (70%) gewaschen und anschließend in 1 ml 10 mM Tris_{pH8} resuspendiert.

Die pflanzlichen Gene *AtALN* (At4g04955), *GmALN 2* (Glyma13g31430), *AtAAH* (At4g20070), *GmAAH 1* (Glyma09g05600), *AtUGlyAH* (At4g17050), *GmUGlyAH 1* (Glyma17g15820), *AtUAH* (At5g43600) und *GmUAH 1* (Glyma10g32850) wurden alle von der Plasmid-DNA ihrer entsprechenden pXCS-Konstrukte (Tabelle 2) amplifiziert. Nur die *GmALN 1* wurde von der cDNA aus *Glycine max* Williams82 amplifiziert. Hierbei wurden die Primer (Tabelle 9) so gewählt, dass der N-Terminus der Gene, der die Sequenz für die ER-Lokalisation enthält, nicht amplifiziert wird. Die PCR-Produkte wurden anschließend mittels der angefügten Schnittstellen in die entsprechenden pET30-Vektoren (siehe Tabelle 3) kloniert. Die erhaltenen Klone wurden sequenziert. Die *GmUAH 1* wurde aufgrund einer internen NcoI-Schnittstelle direkt mittels NcoI und XmaI aus ihrem pXCS-Klon ausgeschnitten und umklont.

Tabelle 9: verwendete Primer zur Klonierung in pET30-Vektoren

Gen	Primernamen	Sequenz (5'-3')	angefügte Schnittstelle	verwendete Temp.
<i>PsALC</i>	1690 alc-Ps-F	TCATATGAAAGTTTACGCCGCAC	NdeI	55°C
	1691 alc-Ps-R	TGATATCCCTGGACACCTTGCCCAAC	EcoRV	55°C
<i>EcAAH</i>	1781 allC-F	TTCATATGATTACACATTTCCGTCA	NdeI	57°C
	1782 allC-R	TTCCCGGGTTTCTGCCAGGCAAGTTG	XmaI	57°C
<i>EcUGlyAH</i>	1786 ylbA-F	TTCATATGGGATATTTAAATAACGTCAC	NdeI	57°C
	1788 ylbA-R no stop	TTGATATCAATCTCTACGTCGCGGTTACA	EcoRV	57°C
<i>EcUUH</i>	1783 allA-F	TTCATATGAAACTTCAGGTATTACCG	NdeI	57°C
	1785 allA-R no stop	TTGATATCCGCAAACAGAGTTCCTG	EcoRV	57°C
<i>GmALN 1</i>	2278 GmALN-nsF2	TCCATGGCACAGTTTTATGCTCTCATAAAG	NcoI	57°C
	1743 soyALNrevXmaI	GCCCGGGTTTGGCTAGTATTTGAACACCAC	XmaI	57°C
<i>AtALN</i>	2239 At4g04955-E2Fnc0	TCCATGGGGAATAATAAGTG TAGTCTTCTTC	NcoI	55°C
	1192 At4g04955 E15R	CCCGGGAGTAGTTGCAAGTTCAGAG	XmaI	55°C
<i>GmAAH 1</i>	2276 GmAAHnsF	TCATATGTTCTCTGGTATTGAGACAG	NdeI	57°C
	1321 soyAAHcloneR	CCCGGGTGATAGTTTTCCAGAAATGAC	XmaI	57°C
<i>AtAAH</i>	2228 At4g20070-E2Fnc0	TCCATGGGTGAAACAGAAGGGACGAAG	NcoI	60°C
	1173 At4g20070-Sam-R	CCCGGGCATTGAGACTCTAGAAACTCCA	XmaI	60°C
<i>GmUGlyAH 1</i>	2277 GmUGlyAHnsF	TCCATGGAAGAAGGGTTTGCTCTGC	NcoI	60°C
	1751 soyYlbArevXmaI	ATCCCGGGCAGTGGGCTTCTGTTCG	XmaI	60°C
<i>AtUGlyAH</i>	2229 At4g17050E2Fnc0	TCCATGGATGGGTTTTGTTTCAGC	NcoI	55°C
	1687 At4g17050-E13R	CCCGGGCAATGGATTTTCGATTCACA	XmaI	55°C
<i>AtUAH</i>	2230 At5g43600E1Fnc0	TCCATGGAATCAATCAGAACAATGGAAG	NcoI	55°C
	1168 At5g43600-Sma-R	CCCGGGGTCTAAAGAGAGCTTAGCCAG	XmaI	55°C

3.2.1.2 Transformationen

3.2.1.2.1 Von Bakterien

3.2.1.2.1.1 *Escherichia coli*

Für die Transformation von *E. coli* DH10B (Klonierungsstamm) oder *E. coli* BL21 (Expressionsstamm) wurden je 50 µl chemokompetente Zellen verwendet (Tabelle 4). Die Zellen wurden von -80°C auf Eis aufgetaut und zu 4 µl Ligationsansatz oder 25 ng Plasmid-DNA hinzugegeben (Konstrukte siehe Tabelle 2 und Tabelle 3). Nach einer zehnmütigen Inkubation auf Eis wurden die Zellen für 45 Sekunden auf 42°C erhitzt und sofort für weitere 2 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl LB-Medium (Tabelle 1) versetzt und für eine Stunde bei 37°C und 200 rpm geschüttelt. Zur Selektion der Transformanten wurden die Bakterien über Nacht auf LB-Selektionsplatten mit entweder 100 µg/ml Ampicillin (bei Transformationen mit pXCS-Vektoren) oder 50 µg/ml Kanamycin (bei Transformationen mit pET30-Vektoren) bei 37°C inkubiert. Zur Vermehrung der transformierten Zellen wurden diese in flüssigem LB-Medium (3 bis 5 ml) mit derselben Konzentration Ampicillin oder Kanamycin bei 37°C und 200 rpm über

Nacht inkubiert. Glycerolstocks zur Lagerung der Bakterien wurden mit 500 µl flüssiger Übernachtskultur und 500 µl Glycerol (50%) hergestellt. Die Mischung wurde zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei -80°C gelagert.

3.2.1.2.1.2 *Agrobacterium tumefaciens*

(Witte *et al.*, 2004)

Für die Transformation von *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 pMP90RK wurden 50 µl elektrokompetente Zellen verwendet (Tabelle 4). Die Zellen wurden von -80°C auf Eis aufgetaut und zusammen mit 2 µl Plasmid-DNA (Konstrukte siehe Tabelle 2) in eine gekühlte Elektroporationsküvette gegeben. Nach zweiminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen elektroporiert (MikroPulser, Biorad). Anschließend wurden sofort 500 µl YEB-Medium (Tabelle 1) hinzugefügt und die Zellen bei 28°C für eine Stunde bei 180 rpm inkubiert. Zur Selektion der Transformanten wurden 50 µl der Bakterien für zwei Tage auf YEB-Selektionsplatten mit 100 µg/ml Rifampicin, 50 µg/ml Kanamycin, 75 µg/ml Carbenicillin und 15 µg/ml Gentamycin bei 28°C inkubiert. Zur Vermehrung der transformierten Zellen wurden Einzelkolonien zunächst erneut für zwei Tage auf YEB-Selektionsplatten bei 28°C inkubiert und anschließend in flüssigem YEB-Medium (12 ml) mit 100 µg/ml Rifampicin,

50 µg/ml Kanamycin, 50 µg/ml Carbenicillin und 15 µg/ml Gentamycin bei 28°C und 180 rpm über Nacht inkubiert. Zur Herstellung von Glycerolstocks wurden hier zunächst 1 ml flüssige Übernachtskultur für 3 Minuten bei 3000 g zentrifugiert und das Bakterienpellet in weiteren 500 µl Übernachtskultur resuspendiert. Hierzu wurden 500 µl Glycerol (50%) hinzugegeben und die Mischung in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

3.2.1.2.2 Von Pflanzen

3.2.1.2.2.1 *Nicotiana benthamiana*

(Witte *et al.*, 2004; Werner *et al.*, 2008)

Zur transienten Proteinüberexpression in *Nicotiana benthamiana* wurden die Glycerolstocks der entsprechend transformierten Agrobakterien (Konstrukte siehe Tabelle 2) zunächst auf YEB-Selektionsplatten und anschließend in flüssigem YEB-Medium (12 ml) angezogen (siehe Kapitel 3.2.1.2.1.2). Der Helferstamm C58C1::pCH32 (Stummschaltungssuppressor) wurde auf YEB-Selektionsplatten und flüssigem YEB-Medium (12 ml) mit 100 µg/ml Rifampicin und 50 µg/ml Kanamycin angezogen. Die Zellen wurden aus der Flüssigkultur mittels fünfzehnminütiger Zentrifugation bei 3000

g (Rt) geerntet und in Infiltrationspuffer (10 mM MES-KOH_{pH5.6}, 10 mM MgCl₂ und 150 µM Acetosyringon) resuspendiert. Die optische Dichte (bei 600 nm) der transformierten Agrobakterien wurde auf 0,5 eingestellt und die Zellen des Helferstammes zu einer Enddichte von 0,25 hinzugegeben. Bei der Koimmunopräzipitationsanalyse wurden die entsprechenden Agrobakterienstämme mit einer jeweiligen Dichte von 0,5 in der Mischung verwendet und der Helferstamm zu einer optische Dichte (OD) von 0,25 hinzu gegeben. Nach zweistündiger Inkubation der Bakterien im Infiltrationspuffer wurden diese mit Hilfe einer 1 ml-Spritze in den Interzellularraum des Schwammparenchyms von etwa 4 - 6 Wochen alten *Nicotiana benthamiana* Pflanzen gespritzt, wobei hier die beiden jüngsten, ausgebreiteten Blätter verwendet wurden.

3.2.1.2.2.2 *Arabidopsis thaliana*

(Clough und Bent, 1998; Logemann *et al.*, 2006)

Zur stabilen Proteinüberexpression in *Arabidopsis thaliana* wurden die Glycerolstocks der entsprechend transformierten Agrobakterien (Konstrukte siehe Tabelle 2) zunächst auf YEB-Selektionsplatten und anschließend in flüssigem YEB-Medium (100 ml) angezogen (siehe Kapitel 3.2.1.2.1.2). Die

Zellen wurden aus der Flüssigkultur mittels fünfzehnminütiger Zentrifugation bei 3000 g (Rt) geerntet und in Inokulationspuffer (5% Saccharose und 0,05% Silvet L-77 (Lehle Seeds)) resuspendiert. Die optische Dichte (bei 600 nm) der transformierten Agrobakterien wurde auf 0,8 in ca. 200 ml eingestellt. Das Inokulum wurde in ein Becherglas gefüllt und die zu transformierenden Arabidopsispflanzen mehrfach kopfüber in die Inokulationslösung eingetaucht, so dass alle Blütenknospen bedeckt waren. Überschüssiges Inokulum wurde anschließend durch leichtes Abklopfen der Pflanzen entfernt und der Inokulationsprozess für weitere 2 - 4 Mal wiederholt. Danach wurden die Arabidopsispflanzen in eine Plastiktüte eingehüllt und bis zum nächsten Tag in Dunkelheit bei Raumtemperatur gelagert. Zum weiteren Wachstum und zur Samenproduktion wurden die Pflanzen in Klimakammern unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkel) mit 20°C im Licht und 18°C im Dunkeln bei 60% Luftfeuchtigkeit wachsen gelassen. Nach der Ernte der Samen wurden diese auf Erde ausgestreut und für 2,5 Tage bei 4°C im Dunkeln stratifiziert. Die Pflanzen wuchsen anschließend unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkel) im Gewächshaus (20°C) mit einer Luftfeuchtigkeit von ca. 50%. Die

Transformanten wurden im späten Zweiblattstadium mittels 0,1% BASTA (ppt^R in den pXCS-Vektoren kodiert) selektiert. Die Überexpression des transgenen Proteins in den Transformanten wurde mittels Western Blot Analyse überprüft.

3.2.2 Biochemische Methoden

3.2.2.1 Proteinexpression

3.2.2.1.1 *In E. coli*

(Werner *et al.*, 2010)

Zur transienten Proteinüberexpression in *Escherichia coli* BL21 (DE3) wurden die Glycerolstocks der entsprechend transformierten Bakterien (Konstrukte siehe Tabelle 3) zunächst auf LB-Selektionsplatten mit 50 µg/ml Kanamycin angezogen (siehe Kapitel 3.2.1.2.1.1). Anschließend wurden 25 ml Overnight Express Instant TB Medium (Novagen) mit 50 µg/ml Kanamycin und einer Einzelkultur inokuliert und für 22 - 25 Stunden bei 28°C und 180 rpm inkubiert. Dieses Medium bewirkt eine langsame Induktion der Proteinexpression mit IPTG und war nötig, um die Löslichkeit der überexprimierten Proteine zu erhöhen oder teilweise sogar, um diese überhaupt erst zu ermöglichen.

3.2.2.1.2 In Pflanzen

(Werner *et al.*, 2008)

Zur transienten Proteinüberexpression in *Nicotiana benthamiana* (Konstrukte siehe Tabelle 2) wurden die entsprechend transformierten Pflanzen (siehe Kapitel 3.2.1.2.2.1) für zweieinhalb bis dreieinhalb Tage unter Kurztagbedingungen (8 Stunden Licht / 16 Stunden Dunkel) mit 20°C im Licht und 18°C im Dunkeln bei 60% Luftfeuchtigkeit wachsen gelassen.

Für die stabile Proteinüberexpression in *Arabidopsis thaliana* (Pflanzen siehe Tabelle 6) wurden die entsprechend transformierten Pflanzen (siehe Kapitel 3.2.1.2.2.2), wenn nicht anders erwähnt, entweder unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkel) oder unter Kurztagbedingungen (8 Stunden Licht / 16 Stunden Dunkel) mit 20°C im Licht und 18°C im Dunkeln bei 60% Luftfeuchtigkeit wachsen gelassen. Diese konnten zu jedem gewünschten Zeitpunkt analysiert werden, da die Proteinexpression stabil war.

3.2.2.2 Proteinaufreinigung

3.2.2.2.1 Aus *E. coli*

3.2.2.2.1.1 Nativ

(Werner *et al.*, 2010)

Die transient überexprimierten C-terminal His-markierten Proteine aus *Pseudomonas syringae* (*PsALC*) und *E. coli* (*EcAAH*, *EcUGlyAH* und *EcUUH*) (Konstrukte siehe Tabelle 3) wurden nativ aus den 25 ml Übernachtskulturen (siehe Kapitel 3.2.2.1.1) der entsprechend transformierten *E. coli* Bakterien (siehe Kapitel 3.2.1.2.1.1) affinitätschromatographisch aufgereinigt. Die Zellen wurden aus der Flüssigkultur mittels fünfzehnminütiger Zentrifugation bei 4500 g (Rt) geerntet und in 1 ml Bindepuffer (20 mM HEPES_{pH7,5}, 500 mM NaCl, 20 mM Imidazol und 0,005% Triton X-100) mit einer Spatelspitze Lysozym und 0,5 µl DNaseI (10 µg/µl) resuspendiert. Nach fünfzehnminütiger Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde das Lysat auf Eis überführt und zusätzlich sonifiziert. Nach zwanzigminütiger Zentrifugation bei 4°C und 20.000 g wurde der Überstand auf eine Säule (Micro Bio-Spin Chromatography Column, Biorad), gepackt mit 250 µl Ni-Sepharose 6 Fast Flow (500 µl der 50% Suspension, GE Healthcare) überführt. Der Durchfluss des Überstandes wurde für 2 weitere Male auf die Säule geladen, um die vollständige Bindung des überexprimierten Proteins mittels seiner His-Markierung an die Nickel-Sepharose zu gewährleisten. Anschließend wurden die an der Säule gebundenen Proteine 3 Mal mit je 1 ml Bindepuffer gewaschen und dann 2 Mal mit je 300 µl Elutionspuffer 1 (20 mM

HEPES_{pH7,5}, 500 mM NaCl, 200 mM Imidazol und 0,005% Triton X-100) und zweimal mit je 300 µl Elutionspuffer 2 (wie Elutionspuffer 1 aber mit 500 mM Imidazol) von der Säule gelöst. Da Imidazol generell eine hohe Affinität zu zweiwertigen Kationen besitzt, mussten die Proteinelutionen in einen Puffer ohne Imidazol umgepuffert werden, um eine Aktivitätsmessung der Proteine mit Mangan als Kofaktor zu ermöglichen. Hierfür wurde die 5 ml HiTrap Desalting column (Amersham Biosciences) verwendet (entsprechend der Betriebsanweisung), welche die aufgereinigten Proteine in den Gelfiltrationspuffer (100 mM HEPES_{pH8}, 100 mM NaCl, 0,5 mM EDTA und 0,005% Triton) überführte. Die umgepufferten Proteinelutionen wurden anschließend 1:1 mit Glycerol (100%) gemischt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert.

3.2.2.2.1.2 Denaturierend

Um Antikörper gegen die pflanzlichen Enzyme aus Arabidopsis und Sojabohne herzustellen, wurden die entsprechenden Proteine (Konstrukte siehe Tabelle 3) ohne N-terminales Signalpeptid und mit einer C-terminalen His-Markierung transient in *E. coli* überexprimiert (siehe Kapitel 3.2.2.1.1). Dieses Vorgehen wurde gewählt,

um die benötigte Konzentration von 1 mg reinem Protein in 1 ml Puffer zu erreichen, welche bei einer Überexpression in und Aufreinigung aus Pflanzen nur schwer möglich ist. Bei der Überprüfung der Expression der pflanzlichen Enzyme in *E. coli* zeigte sich zum Einen, dass einige Enzyme nicht überexprimiert werden konnten, weswegen jeweils nur ein Enzym weiter bearbeitet wurde (*GmALN*, *AtAAH*, *GmUGlyAH* und *AtUAH*), unabhängig davon, ob es aus Arabidopsis oder Sojabohne stammte. Zum Anderen zeigte sich auch, dass die pflanzlichen Enzyme, die exprimiert wurden, häufig unlöslich waren, weswegen sie zumeist unter denaturierenden Bedingungen zunächst in den *inclusion bodies* und darauffolgend affinitätschromatographisch aufgereinigt wurden. Es wurden zwei 25 ml *E. coli* Übernachtskulturen für die *GmALN* und *AtAAH* und sechs 25 ml *E. coli* Übernachtskulturen für die *GmUGlyAH* und *AtUAH* verwendet (siehe Kapitel 3.2.2.1.1) und wie in Kapitel 3.2.2.2.1.1 beschrieben geerntet und aufgeschlossen. Als Bindepuffer diente hier 50 mM Tris_{pH7,5}, 500 mM NaCl, 0,01% Triton X-100 und 25 mM Imidazol. Nach der zwanzigminütigen Zentrifugation bei 4°C und 20.000 g wurde allerdings nicht mit den Überständen weitergearbeitet, welche nur die löslichen Proteine enthielten, sondern mit den bakteriellen Pellets, welches Zellreste und

unlösliche Proteine enthielten. Aus diesen wurden die *inclusion bodies*, welche das jeweils überexprimierte pflanzliche Protein enthielten, aufgereinigt. Hierfür wurden die Pellets in je 750 µl Bindepuffer resuspendiert und für fünf Minuten im Eiswasserbad sonifiziert. Anschließend wurde Triton X-100 zu 1% hinzugefügt und die Lösung für mehrere Minuten gut gemischt. Nach zwanzigminütiger Zentrifugation bei 4°C und 20.000 g wurde der Überstand entfernt und die Waschprozedur mit erneuter Resuspension des Pellets in 750 µl Bindepuffer für weitere 2 Mal wiederholt. Anschließend wurden die so aufgereinigten *inclusion bodies* in 750 µl halbkonzentriertem Bindepuffer mit 8 M Harnstoff resuspendiert und für fünfzehn Minuten im Eiswasserbad sonifiziert. Um die denaturierten Proteine mit Hilfe des Harnstoffs in Lösung zu bringen, folgte eine einstündige Inkubation der Lösungen bei 65°C und eine siebzehnstündige Inkubation bei 4°C auf dem Rotationsrad mit 25 rpm. Hiernach wurden die Lösungen für zehn Minuten bei 4°C und 20.000 g zentrifugiert und die Überstände mit den gelösten denaturierten Proteinen jeweils auf eine Säule, gepackt mit 500 µl Ni-Sepharose 6 Fast Flow (1 ml der 50% Suspension, GE Healthcare) überführt. Hierbei wurden die Lösungen hervorgehend aus zwei 25 ml ÜN-Kulturen pro Protein zusammen auf 1 Säule geladen (2 x 750 µl).

Der Durchfluss der Lösungen durch die Säule wurde auch hier noch für weitere 2 Mal auf die Säule geladen. Anschließend wurden die Proteine schrittweise an der Säule gewaschen bzw. von dieser eluiert. Hier wurden folgende Puffer (alle mit 8 M Harnstoff) 3 Mal mit je 500 µl verwendet (ergibt Fraktionen von 1,5 ml): halbkonzentriertem Bindepuffer (enthält 12,5 mM Imidazol), Bindepuffer (enthält 25 mM Imidazol) und verschiedene Elutionspuffer (Inhaltsstoffe wie Bindepuffer aber mit veränderten Imidazolkonzentrationen) mit 50, 100, 200, 400 und 600 mM Imidazol. Die verschiedenen Fraktionen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung auf Proteinmenge und –reinheit überprüft, wonach die besten 3 – 4 Fraktionen ausgewählt wurden für eine anschließende Acetonpräzipitation. Im Fall der *AtUAH* wurden aufgrund von Fremdproteinkontaminationen die drei proteinreichsten Fraktionen (Elutionen 50, 100 und 200) gemischt und mit Hilfe der 5 ml HiTrap Desalting column (Amersham Biosciences) zurück in den halbkonzentrierten Bindepuffer mit 8 M Harnstoff umgepuffert. Das Protein wurde anschließend ein zweites Mal affinitätschromatographisch aufgereinigt (wie oben). Die *GmUGlyAH* wurde zunächst unter nativen Bedingungen aufgereinigt (siehe Kapitel 3.2.2.2.1.1) und wie die *AtUAH* entsalzt, um eine zweite Affinitäts-

chromatographie zu durchlaufen, welche dann, wie auch bei den anderen Enzymen, unter denaturierenden Bedingungen stattfand. Für die Fällung der Proteine mit Aceton wurden die ausgewählten 1,5 ml Fraktionen wieder in 2 x 750 µl separiert und jeweils 750 µl kaltes (-20°C) Aceton (100%) hinzugegeben. Die Proben wurden gemischt und für 20 Minuten bei -20°C inkubiert. Nach einer zwanzigminütigen Zentrifugation bei 4°C und 20.000 g wurden die Überstände entfernt und die gefällten Proteine mit 1 ml Aceton (50%) gewaschen. Anschließend wurden die Proteine in 250 µl – 500 µl Resuspensionspuffer (10 mM Na-PO₄-Puffer_{pH7} und 0,1% SDS) bei 90°C und 900 rpm resuspendiert und die beiden Lösungen einer Fraktion wieder vereinigt. Nach erfolgter Proteinquantifizierung in den Fraktionen mittels SDS-Gelelektrophorese und Coomassie-Färbung unter Verwendung eines BSA-Standards, wurden die resuspendierten Proteine so gemischt, dass 1 ml Proteinlösung mit möglichst reinem 1 mg Protein für eine Antikörperproduktion zur Firma Biogenes (Berlin) geschickt werden konnte.

3.2.2.2.2 Aus Pflanzen

(Witte *et al.*, 2004; Werner *et al.*, 2008)

3.2.2.2.2.1 Einzelaufreinigung

Die transient überexprimierten C-terminal StrepII-markierten Proteine aus *Arabidopsis thaliana* (*AtALN*, *AtAAH*, *AtUGlyAH* und *AtUAH*) und Sojabohne *Glycine max* (*GmALN* 1-4, *GmAAH* 1-2, *GmUGlyAH* 1-2 und *GmUAH* 1) (Konstrukte siehe Tabelle 2) wurden nativ aus den entsprechend transformierten *Nicotiana benthamiana* Pflanzen (siehe Kapitel 3.2.1.2.2.1) affinitätschromatographisch aufgereinigt. Hierfür wurden 0,75 g Blattmaterial der transient exprimierenden Pflanzen (siehe Kapitel 3.2.2.1.2) verwendet und mit 1,5 ml Extraktionspuffer (100 mM HEPES_{pH8}, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA_{pH8}, 15 mM DTT, 100 µg/ml Avidin und 0,5% Triton X-100) in einem Mörser bei Raumtemperatur aufgeschlossen. Der Extrakt wurde anschließend für fünfzehn Minuten bei 4°C und 20.000 g zentrifugiert und die Überstände mit den nativen Proteinen mit 40 µl StrepTactin Macroprep (50% Suspension, IBA) für 10 Minuten bei 4°C auf dem Rotationsrad mit 20 rpm inkubiert. Daraufhin wurden die mittels StrepII-Markierung an die Matrix gebundenen Proteine gewaschen, wobei der Extrakt entfernt wurde und die Matrix fünf Mal mit je 500 µl Waschpuffer (100 mM HEPES_{pH8}, 100 mM NaCl, 0,5 mM EDTA_{pH8}, 2 mM DTT und 0,005% Triton X-100) resuspendiert und bei 700 g für 30 Sekunden wieder pelletiert wurde. Die Elution der StrepII-markierten Proteine von

der Matrix erfolgte durch zweimaliges Eluieren mit je 75 µl Elutionspuffer (Waschpuffer mit 10 mM Biotin) für 5 Minuten bei 4°C auf dem Rotationsrad mit 20 rpm. Die beiden Elutionen wurden gemischt, in Verbrauchsmengen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20°C gelagert. Für die Enzyme aus *Arabidopsis* enthielten alle Puffer der Aufreinigung 5% PEG₄₀₀₀, da dieses für die Aktivität der *AtUGlyAH* von Nöten ist.

3.2.2.2.2 Koimmunopräzipitation

Um zu untersuchen, ob die ureidabbauenden Enzyme aus *Arabidopsis* miteinander interagieren, wurde eine Koimmunopräzipitationsanalyse durchgeführt. Hierbei wurden jeweils zwei Enzyme transient in *Nicotiana benthamiana* koexprimiert (wie in Kapitel 3.2.1.2.2.1 beschrieben), wobei das eine Enzym C-terminal StrepII-markiert und das andere Enzym C-terminal Myc-markiert war (Konstrukte siehe Tabelle 2). Die Aufreinigung des möglichen Enzymkomplexes erfolgte zunächst wie unter Kapitel 3.2.2.2.2.1 für die Einzelaufreinigung beschrieben, allerdings mit nur drei Waschschritten. In weiteren Experimenten wurde der Extraktionspuffer variiert zu weniger Salz (25 mM NaCl) mit keinem, 0,01% oder 0,1% Triton X-100.

Auch der Waschpuffer wurde hier dem Salzgehalt entsprechend angepasst. Die Zusammensetzung des Elutionspuffes blieb hingegen gleich, jedoch wurde das Elutionsvolumen auf zweimal 50 µl verringert, um die Proteinkonzentration zu erhöhen. Darüber hinaus wurde in einem weiteren Experiment zusätzlich zum Salzgehalt die DTT-Konzentration im Extraktionspuffer von 15 mM auf 1 mM verringert und ohne Triton X-100 aber mit und ohne 5% PEG extrahiert. Der Waschpuffer wurde auch hier nur mit 25 mM NaCl, 1 mM DTT und zusätzlich 5% PEG verwendet. Die Durchführung der Aufreinigung erfolgte jeweils wie in Kapitel 3.2.2.2.2.1 beschrieben mit drei Waschschritten und zwei 50 µl Elutionen. Proben der Rohextrakte und der Elutionen wurden mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot analysiert.

3.2.2.3 Proteinkonzentrationsbestimmung

Wenn nicht anders beschrieben, wurden alle Proteinkonzentrationsbestimmungen mittels NanoOrange Protein Quantitation Kit (Molecular Probes - Invitrogen) durchgeführt. Das Probenvolumen betrug generell 10 µl oder 20 µl und wurde mit 300 µl Arbeitslösung versetzt und

entsprechend der Betriebsanweisung vermessen.

3.2.2.4 Proteindetektion

3.2.2.4.1 Gelelektrophorese

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese nach dem Protokoll von Laemmli, 1970 mit dem Verfahren von Sambrook *et al.*, 1989 verwendet. Generell wurden hierbei 4%ige Sammelgele und 10%ige Trenngele im Gelelektrophoresesystem SE 250 von Höfer benutzt.

3.2.2.4.2 Proteinfärbungen im Gel

3.2.2.4.2.1 Coomassie

Zur Darstellung des Gesamtproteingehaltes einer Probe wurden die entsprechend verwendeten SDS-Polyacrylamidgele mit Coomassie Brilliant Blue R-250 Lösung (3 mM Coomassie Brillant Blue R-250, 45% Methanol und 9% Essigsäure) für 1 Stunde gefärbt. Im Anschluss wurde der überschüssige Farbstoff durch Inkubation in einer Entfärbelösung (33% Methanol und 7% Essigsäure) wieder entfernt.

Um auch geringe Proteinmengen im SDS-Polyacrylamidgel zu detektieren, wurde eine Gelfärbung mit Colloidal-Coomassie Lösung (0,08% Coomassie Brilliant Blue G-250, 0,8% Phosphorsäure, 8% Ammoniumsulfat und 20% Methanol) durchgeführt. Hierfür wurden die SDS-Polyacrylamidgele zunächst für eine Stunde in 40% Ethanol mit 10% Essigsäure fixiert, zweimal mit destilliertem Wasser gewaschen und dann über Nacht mit der Colloidal-Coomassie Lösung gefärbt.

3.2.2.4.2.2 Silbernitrat

Zur Darstellung der Reinheit eines Proteins in einer Probe wurde das entsprechende SDS-Polyacrylamidgel mit Silbernitrat gefärbt. Hierfür wurde das Gel zunächst für 30 Minuten in 30% Ethanol mit 15% Essigsäure fixiert und anschließend für 30 Minuten in 4,1% Natriumacetat, 0,2% Natriumthiosulfat-Pentahydrat, 25% Ethanol und 0,5% frischem Glutaraldehyd (50%) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen des Gels für je 10 Minuten mit destilliertem Wasser, wurde das Gel für 30 Minuten in 0,1% Silbernitrat mit 0,03% frischem Formaldehyd (37%) gefärbt. Hiernach wurde das Gel 2 Mal kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und anschließend die Färbung mit 20% Natriumcarbonat (12,5%ige Lösung) und

0,03% frischem Formaldehyd (37%) entwickelt. Als die gewünschte Stärke der Färbung erreicht war, wurde die Reaktion mit 1,86% EDTA gestoppt.

3.2.2.4.2.3 Sypro Ruby

Für die Quantifizierung sehr geringer Proteinmengen, die unter dem Detektionslimit von NanoOrange lagen, wurde eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit anschließender Sypro Ruby Färbung (Molecular Probes - Invitrogen) durchgeführt, wobei BSA als Standard mitgeführt wurde. Die Färbung erfolgte entsprechend der Betriebsanweisung dem Basisprotokoll folgend.

3.2.2.4.3 Western Blot

Zum spezifischen Nachweis bestimmter Proteine in einer Probe wurde die Western Blot Analyse verwendet. Hierfür wurden die Proteine elektrophoretisch aus dem SDS-Polyacrylamidgel bei 100 V für 1 Stunde auf eine Nitrozellulosemembran (HybondTM-ECL, Amersham Biosciences) übertragen. Dazu wurde das mit Blotpuffer (48 mM Tris_{pH8,3}, 40 mM Glycin, 0,5 mM SDS, pH 9,2 und 20% Methanol) befüllte Blot-Modul des Mini-PROTEAN 3 Systems von Biorad verwendet.

Die Detektion der Proteine auf der Membran erfolgte mittels spezifischer Antikörper gegen die jeweilige Proteinmarkierung oder das Protein selbst gefolgt

Tabelle 10: Arbeitsschritte der Western Blot Analysen

Schritt	Zeit	StrepII-Detektion	Myc-Detektion	YFP-Detektion	ALN/AAH/UGlyAH/UAH Detektion
Blockieren	1 std	20 ml TBS-T 1g Milchpulver	20 ml TBS-T 1g Milchpulver	20 ml TBS-T 1g Milchpulver	20 ml TBS-T 1g Milchpulver
Waschen	3 x 5 min	50 ml TBS-T	50 ml TBS-T	50 ml TBS-T	50 ml TBS-T
Blockieren	10 min	10 ml TBS-T 2 µg/ml Avidin	/	/	/
Antikörper 1	1 std	/	1:2000 Anti-c-myc IgG ₁ K (Roche) 10 ml TBS-T	1:2500 Anti-GFP IgG (Roche) 10 ml TBS-T	1:200 Antiserum (Biogenes) 10 ml TBS-T
Waschen	3 x 5 min	/	50 ml TBS-T	50 ml TBS-T	50 ml TBS-T
Antikörper 2	1 std	1:4000 Strep-Tactin AP-Konjugat (IBA) hinzufügen	1:5000 Anti-Mouse IgG AP-Konjugat (A-3562, Sigma) 10 ml TBS-T	1:30.000 Anti-Mouse IgG AP-Konjugat (A-3562, Sigma) 10 ml TBS-T	1:5000 Anti-Rabbit IgG AP-Konjugat (A-2306, Sigma) 10 ml TBS-T
Waschen	2 x 5 min	50 ml TBS-T	50 ml TBS-T	50 ml TBS-T	50 ml TBS-T
Waschen	5 min	50 ml TBS	50 ml TBS	50 ml TBS	50 ml TBS
Detektion		10 ml AP-Puffer 33 µl BCIP 66 µl NBT	10 ml AP-Puffer 33 µl BCIP 66 µl NBT	10 ml AP-Puffer 33 µl BCIP 66 µl NBT	10 ml AP-Puffer 33 µl BCIP 66 µl NBT

von einem Alkalische Phosphatase(AP)-konjugiertem Antikörper oder mittels Streptactin AP-Konjugat im Fall der StreptII-markierten Proteine. In Tabelle 10 ist das jeweilige Vorgehen dargestellt. Hierbei verwendet wurden TBS-T (20 mM Tris/HCl_{pH7,6}, 150 mM NaCl und 0,1% Tween 20), TBS (TBS-T ohne Tween 20), AP-Puffer (100 mM Tris_{pH9,5}, 100 mM NaCl und 5 mM MgCl₂), BCIP (50 mg/ml) und NBT (50 mg/ml).

3.2.2.5 Proteinaktivitätsbestimmung

(Werner *et al.*, 2008; Werner *et al.*, 2010)

Zur Bestimmung der jeweiligen enzymatischen Aktivität eines Proteins wurden die aufgereinigten Proteine in ihren (gelfiltrierten) Elutionen (siehe Kapitel 3.2.2.2.1.1 und 3.2.2.2.2.1) verwendet. Die verschiedenen Proteinelutionen wurden entsprechend des experimentellen Ziels miteinander gemischt, wobei der Elutionspuffer / halbkonzentriertem Gelfiltrationspuffer mit 50% Glycerol als Ausgleich für ein fehlendes Enzym in einer Reaktion verwendet wurde. Die Enzymelutionen bildeten grundsätzlich die Hälfte des Reaktionsansatzvolumens, wobei auch Waschpuffer zur Erreichung dieses Volumens verwendet wurde, wenn kleinere Enzymmengen eingesetzt werden sollten. Alle verwendeten Puffer enthielten

zusätzlich 5% PEG₄₀₀₀, wenn die Aktivität der Enzyme aus Arabidopsis gemessen wurde. Die Enzymmischung wurde dann mit 2 mM MnCl₂ versetzt und für 3 Minuten auf 30°C und 600 rpm vorinkubiert. Gestartet wurden die enzymatischen Reaktionen durch die Zugabe des jeweiligen Substrates (in 10 mM HEPES_{pH8}) in der entsprechend angegebenen Konzentration, welches separat auf 30°C erhitzt wurde und die zweite Hälfte des Reaktionsansatzvolumens bildete. Nach dem Starten der enzymatischen Reaktionen wurden diese bei 30°C und 600 rpm inkubiert. Zu den entsprechend angegebenen Zeitpunkten wurden Proben von 10 µl oder 20 µl aus den enzymatischen Reaktionen entnommen und in die jeweiligen Nachweisreaktionen eingesetzt. So wurde ermöglicht, dass zu jedem beliebigen Zeitpunkt das Substrat- und / oder Produktprofil einer enzymatischen Reaktion bestimmt werden konnte. Wenn in einer enzymatischen Reaktion sowohl Ammoniak und Harnstoff als auch Ureidoglykolat und Glyoxylat bestimmt werden sollten, wurden 20 µl Proben entnommen und zunächst in 90 µl EDTA (5 mM) gestoppt. Aus dieser Mischung wurden 20 µl in 180 µl H₂O verdünnt und für die Ammoniakdetektion verwendet. Weitere 20 µl der Mischung wurden für die Harnstoffdetektion mit 175 µl H₂O und 5 µl Urease (4U/µl) versetzt, für 3 Minuten bei

30 °C und 600 rpm inkubiert und dann für die Ammoniakdetektion verwendet. Je 20 µl dieser Mischung wurden für die Bestimmung von Glyoxylat und Ureidoglykolat verwendet.

Für die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter wurde generell die Aktivität eines Enzyms innerhalb von 3 Minuten für jeweils sechs verschiedene Substratkonzentrationen gemessen. Hierbei wurde die Produktbildungsgeschwindigkeit in $\mu\text{M} \cdot \text{min}^{-1}$ bestimmt.

Im Fall der AAHs wurden alle verwendeten Puffer 1:10 verdünnt (außer Triton X-100), da die Detektion des Ammoniaks in den Reaktionsansätzen (200 µl) direkt stattfand. Als Substratkonzentrationen wurde hier Allantoat mit 37,5, 75, 150, 300, 600 und 1200 µM verwendet. Die UAHS wurden mit dem gleichen Reaktionsansatz wie die AAHs (siehe oben) vermessen. Auch hier wurden die gleichen Substratkonzentrationen (37,5 µM - 1200 µM) verwendet, allerdings von S - Ureidoglykolat (doppelte Konzentration des Racemats wurde als Substrat eingesetzt). Bestimmt wurde hier die Bildung von Glyoxylat, wobei die Reaktionsansätze (100 µl) nach 3 Minuten durch das Hinzufügen von 20 µl EDTA (100 mM) auf Eis gestoppt wurden und dann die Detektion des Glyoxylats direkt im Reaktionsansatz erfolgte. Die Aktivitäten der Allantoinasen wurde ohne vorheriges Einfrieren der

Proteinelutionen direkt nach der Aufreinigung bestimmt. Die Enzyme wurden zu je 5 µl eingesetzt und mit 15 µl Allantoin (2,5, 5, 10, 20, 40 und 80 mM des Racemates) versetzt. Nach 3 Minuten wurden die Enzymreaktionen durch das Hinzufügen von 60 µl H₂O und 20 µl HCl (0,15 M) auf Eis gestoppt und anschließend die Allantoatkonzentration bestimmt.

Für die Bestimmung des K_m -Wertes und der maximalen Geschwindigkeit (V_{max} , hier als spezifische Aktivität bezogen auf die Proteinmenge) wurden die spezifischen Aktivitäten (V) bei der jeweiligen Substratkonzentration über den Substratkonzentrationen (S) aufgetragen. Vom GraphPad Prism 4 Programm wurde diese Auftragung unter Annahme einer Michaelis Menten Kinetik mathematisch approximiert und so V_{max} und K_m bestimmt. Die Darstellung nach Hanes (S/V über S) gibt einen Hinweis darauf, ob sich das Enzym entsprechend der Michaelis-Menten-Kinetik verhält. Darüberhinaus wurden auch die Wechselzahl k_{cat} (die sich auf die Aktivität pro Molekül Enzym bezieht) und die katalytische Effizienz (Verhältnis von k_{cat} zu K_m) eines jeden Enzyms berechnet.

3.2.2.5.1 Kolorimetrische Nachweisreaktionen

3.2.2.5.1.1 Berthelot-Reaktion zum Ammoniaknachweis

(Witte und Medina Escobar, 2001)

Um die enzymatische Produktion von Ammoniak in den jeweiligen Reaktionsansätzen nachzuweisen, wurden die Enzymreaktionen zu bestimmten Zeitpunkten gestoppt (siehe jeweiliger Versuch). Es wurde eine Probe von 10 μl oder 20 μl aus dem Reaktionsansatz entnommen und zunächst 1:10 bis 1:40 in destilliertem H_2O verdünnt (außer bei der Bestimmung der enzymkinetischen Parameter) und anschließend sofort mit 50 μl Phenolnitroprussid (7 g Phenol und 34 mg Disodium Pentacyanonitrosylferrat in 100 ml H_2O) und 100 μl Natriumhypochloridlösung (2,96 g NaOH, 29,74 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 16,6 ml 12%iges NaOCl, pH 12 in 200 ml H_2O) versetzt. Das Phenolnitroprussid und das Natriumhypochlorid reagieren mit Ammoniak unter Bildung des blauen Farbstoffs Indophenol (Berthelot-Reaktion). Um die Farbent-

wicklung zu beschleunigen, wurden die Proben für mindestens 20 Minuten bei 50°C inkubiert. Die Messung der Absorption erfolgte mit je 300 μl Probe im μQuant -Platten-Photometer bei einer Wellenlänge von 639 nm. Als Standard zur Bestimmung der entstandenen Ammoniakkonzentrationen wurde NH_4Cl entsprechender Konzentrationen in Elutionspuffer / halbkonzentriertem Gel-filtrationspuffer mit 50% Glycerol anstelle der Enzyme (siehe Kapitel 3.2.2.2) im Reaktionsansatz gemessen. Das Ammonium reagiert aufgrund des stark alkalischen NaOCl vollständig zu Ammoniak und wird als solches detektiert.

3.2.2.5.1.2 Differenzielle Glyoxylat-analyse

(Vogels und van der Drift, 1970)

Um die Substrate bzw. Reaktionsprodukte Allantoin, Allantoat, Ureidoglykolat und Glyoxylat in den jeweiligen Reaktions-

Tabelle 11: Arbeitsschritte der Konversionsreaktionen

Glyoxylat	Ureidoglykolat	Allantoat	Allantoin
20 μl Probe	20 μl Probe	20 μl Probe	20 μl Probe
80 μl H_2O 20 μl PO_4 -Puffer ₄₀₀	20 μl NaOH ₂₅₀	60 μl H_2O 20 μl HCl ₁₅₀	40 μl H_2O 20 μl NaOH ₅₀₀
flüssiger Stickstoff	1 min bei RT	4 min bei 100°C 2 min bei 0°C	8 min bei 100°C 2 min bei 0°C
	80 μl PO_4 -Puffer ₄₀₀	20 μl PO_4 -Puffer ₄₀₀	20 μl HCl ₆₅₀
	flüssiger Stickstoff	flüssiger Stickstoff	4 min bei 100°C 5 min bei 0°C
			20 μl PO_4 -Puffer ₄₀₀
			flüssiger Stickstoff

ansätzen nachzuweisen, wurden die Enzymreaktionen zu bestimmten Zeitpunkten gestoppt. Hier wurde jeweils eine Probe von 20 μl aus den Reaktionsansätzen entnommen und für die entsprechende Konversionsreaktion verwendet.

Diese Konversionsreaktionen sind nötig, um alle Ureide (Allantoin, Allantoat und Ureidoglykolat) chemisch zu Glyoxylat umzusetzen, da dieses in der darauf folgenden Detektion kolorimetrisch umgesetzt wird. Für die Konversionsreaktionen der Ureide zu Glyoxylat wurden 400 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4\text{-Puffer}_{\text{pH}7}$, 250 mM und 500 mM NaOH, 150 mM und 650 mM HCl verwendet, um die in Tabelle 11 dargestellten Schritte anwenden zu können. Nach der Konversion aller Ureide in den Proben zu Glyoxylat wurden diese für die anschließende Detektion von Glyoxylat verwendet. Hier wurden die Proben aufgetaut und mit 20 μl Phenylhydrazin (6,6 mg in 2 ml H_2O) versetzt. Nach einer Inkubation für 5 Minuten bei Raumtemperatur, gefolgt von einer fünfminütigen Inkubation auf Eis wurden 100 μl HCl (37%) und 20 μl Kaliumhexacyanoferrat (III) (33,3 mg in 2 ml H_2O) zu den Proben auf Eis hinzugefügt, wodurch die Farbreaktion gestartet wurde. Das Glyoxylat in den Proben reagiert mit dem hinzugefügten Phenylhydrazin zu Glyoxylsäurephenylhydrazon, welches durch das Kaliumhexacyanoferrat (III) in

der Anwesenheit von Phenylhydrazin und der konzentrierten HCl zum roten Farbstoff 1,5 – Diphenyl-Formazan oxidiert wird. Die Absorption dieses Farbstoffs wurde mit 200 μl pro Probe im μQuant -Platten-Photometer bei einer Wellenlänge von 537 nm gemessen. Als Standard zur Bestimmung der entstandenen Glyoxylatkonzentrationen wurde Glyoxylat entsprechender Konzentrationen im Elutionspuffer anstelle der Enzyme im Reaktionsansatz gemessen.

3.2.2.5.2 Polarimetrie

(Werner *et al.*, 2010)

Für die polarimetrische Bestimmung der optischen Drehung der enzymatischen Reaktionsprodukte wurde ein Jasco P-1020 Polarimeter verwendet. Hierbei wurden jeweils 28 mM Allantoat als Substrat eingesetzt und unter Verwendung verschiedener Enzyme die optische Drehung der Reaktionsmischung in einminütigen Intervallen bei 589 nm aufgezeichnet. Alle enzymatischen Reaktionen verliefen bei Raumtemperatur direkt in der 10 cm langen Küvette, die für die Bestimmung der optischen Drehung verwendet wurde.

Für die Arabidopsisenzyme wurde folgender Reaktionsansatz gewählt: 250 μl *AtAAH*-Elution, 250 μl *AtUGlyAH*-Elution, 286 μl Elutionspuffer (siehe

Kapitel 3.2.2.2.1), 0,57 μl DTT (1M), 14 μl MnCl_2 (100 mM) und 700 μl Allantoat (60 mM in 500 mM $\text{HEPES}_{\text{pH}8}$). Für das Enzym aus *Pseudomonas PsALC* wurden 86 μl gefilterte Elution (siehe Kapitel 3.2.2.2.1.1) , 700 μl halbkonzentriertem Gelfiltrationspuffer mit 50% Glycerol, 14 μl MnCl_2 (100 mM) und 700 μl Allantoat (60 mM in 500 mM $\text{HEPES}_{\text{pH}8}$) vermessen. Die *E. coli* Enzyme *EcAAH* und *EcUGlyAH* wurden zusammen mit je 80 μl bzw. 10 μl gefilterter Elution, 696 μl halbkonzentriertem Gelfiltrationspuffer mit 50% Glycerol, 14 μl MnCl_2 (100 mM) und 700 μl Allantoat (60 mM in 500 mM $\text{HEPES}_{\text{pH}8}$) gemessen. *EcAAH* allein wurde mit 200 μl gefilterter Elution, 586 μl halbkonzentriertem Gelfiltrationspuffer mit 50% Glycerol, 14 μl MnCl_2 (100 mM) und 700 μl Allantoat (60 mM in 500 mM $\text{HEPES}_{\text{pH}8}$) gemessen.

3.2.2.5.3 NMR

(Werner *et al.*, 2010)

Um die Reaktionsprodukte, welche mittels kolorimetrischer Methoden nachgewiesen wurden, mit spektroskopischen Methoden zu belegen, wurde eine NMR-Analyse durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden von den vier Arabidopsisenzymen (ALN, AAH, UGlyAH und UAH) je 60 μl Enzymelution bzw. Elutionspuffer

verwendet, so dass sich Enzymmischungen von 240 μl ergaben. Diese wurden mit 4 mM MnCl_2 und 1,6 mM DTT auf 30°C erhitzt und anschließend mit 240 μl 8 mM *R/S*-Allantoin-5- ^{13}C ; 1- ^{15}N (M-2307, CDN Isotopes) versetzt. Nach zweistündiger Reaktionszeit bei 30°C und 600 rpm wurden die Reaktionsansätze durch Hinzufügen von 20 μl EDTA (500 mM) gestoppt und in flüssigem Stickstoff eingefroren. In diesem wurden sie bis kurz vor der NMR-Analyse gelagert, welche in der Organischen Chemie der Freien Universität durchgeführt wurde. Hier wurden die Reaktionsansätze aufgetaut und auf 30°C erhitzt. Dann wurden 57 μl Deuteriumoxid (99%, Sigma) zu den Proben hinzugefügt, um eine Endkonzentration von 10% in den Proben zu erreichen. Anschließend wurden die Proben von Dr. Schäfer unter Verwendung eines Bruker Avance III 700 Spektrometers vermessen und ausgewertet. Als Standards dienten je 20 mM Allantoat, Ureidoglykolat und Glyoxylat im Reaktionshintergrund, um die chemische Verschiebung dieser Verbindungen zu bestimmen.

3.2.3 Pflanzenphysiologische Methoden

3.2.3.1 Pflanzenanzucht

3.2.3.1.1 Von *Nicotiana benthamiana*

Zur transienten Proteinüberexpression in *Nicotiana benthamiana* mittels Agrobakterien (siehe Kapitel 3.2.1.2.2.1) wurden 4 – 6 Wochen alte *Nicotiana benthamiana* Pflanzen verwendet. Diese wurden im Gewächshaus auf Floraton 1 - Erde (Floragard) angezogen. Das Wachstum der Pflanzen erfolgte bei 22°C am Tag und 18°C in der Nacht, wobei die Tageslänge 14 Stunden betrug (10 Stunden Nacht) und die Luftfeuchtigkeit ca. 50%.

3.2.3.1.2 Von *Arabidopsis thaliana*

Generell erfolgte das Pflanzenwachstum der verschiedenen *Arabidopsis thaliana* Linien (Tabelle 6) nach einer dreitägigen Stratifikationsphase bei 4°C im Dunkeln in einer Phytokammer unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkel) oder unter Kurztagbedingungen (8 Stunden Licht / 16 Stunden Dunkel) mit 20°C im Licht und 18°C im Dunkeln. Die Luftfeuchtigkeit lag hier bei jeweils 60%. Das Wachstum der Pflanzen erfolgte auf Mischerde mit 42.5% (w/w) Einheitserde P (Einheitserde- und Humuswerke, Gebrüder Patzer GmbH & Co. KG), 42.5% (w/w) Einheitserde T (Einheitserde- und Humuswerke, Gebrüder Patzer GmbH & Co. KG)

und 15% (w/w) PerligranG (Knauf Perlite GmbH).

3.2.3.1.3 Von *Glycine max*

Sojabohnensamen (*Glycine max*) des Kultivars „Williams 82“ wurden zum Quellen für 5 Stunden in Leitungswasser inkubiert und keimten anschließend für 4-5 Tage bei 26°C im Licht und 20°C im Dunkeln auf feuchtem Filterpapier unter Langtagbedingungen (16 Stunden Licht). Die Rhizobien (*Bradyrhizobium japonicum*, Tabelle 4) zur Inokulierung der Sojabohnen wurden steril auf AG-Agar-Platten (Tabelle 1) mit 100 µg/ml Spectinomycin ausgestrichen und für 4 Tage bei 28°C inkubiert. Anschließend wurden die Rhizobien direkt von der Platte in Leitungswasser resuspendiert und die optische Dichte bei 600 nm auf 0,5 eingestellt. Zum weiteren Wachstum wurden die Sojabohnenkeimlinge in Töpfe umgesetzt, die entweder ein 1:1 (v/v) Gemisch aus Vermikulit (Deutsche Vermiculite Dämmstoffe GmbH) und Perlit (PerligranG, Knauf Perlite GmbH) oder Erde (Floraton 1, Floragard) enthielten. Die Sojabohnen wurden auf die Oberfläche des jeweiligen Substrates gepflanzt und im Fall einer Inokulierung mit 1 ml Rhizobien-suspension pro Pflanze benetzt. Sowohl die nichtinokulierten Sojapflanzen, als auch die

inokulierten Sojabpflanzen (N_2 -fixierend) auf Vermikulit/Perlit wurden alle drei Wochen mit Sojabohnen Flüssigdünger (Tabelle 1) gegossen, wobei das Medium für die N_2 -fixierenden Pflanzen kein Ammoniumnitrat und somit keine Stickstoffquelle enthielt. Ansonsten wurden alle Pflanzen je nach Bedarf mit Leitungswasser gegossen. Das Wachstum aller verwendeten Sojabohnen erfolgte bis zum ersten voll ausgebreiteten unifoliaten Blatt im Klimaschrank der Binder GmbH (APT.line KBWF 5.1) mit einer Tageslänge von 16 Stunden und 26°C im Licht bzw. 20°C im Dunkeln. Danach wurden die Pflanzen umgestellt in einen anderen Klimaschrank der Binder GmbH (APT.line KBWF 5.2) mit einer Tageslänge von 16 Stunden bei einer durchgehenden Temperatur von 20°C und einer Luftfeuchtigkeit von 80%.

Für die Versorgungsexperimente mit Allantoin (Vadez und Sinclair, 2000) wurden die entsprechend ausgewählten Blätter zunächst von der Pflanze abgeschnitten und sofort in 2 ml Gefäße mit Leitungswasser transferiert. Hier wurde die Probe für den Zeitpunkt 0 Stunden entnommen. Anschließend wurden die Blätter in 2 ml Gefäße mit 10 mM R/S - Allantoin in 10 mM HEPES_{pH8} und 5 μM MnCl_2 oder nur 10 mM HEPES_{pH8} und 5 μM MnCl_2 im Fall der Kontrolle überführt, erneut angeschnitten und für die jeweilige

Experimentdauer bei 26°C und Licht inkubiert. Die Probennahme erfolgte, wie in den jeweiligen Experimenten angegeben, zu bestimmten Stunden nach Beginn der Inkubation mit Allantoin.

3.2.3.2 Phänotypenanalyse in Arabidopsis

Um den Einfluss des Verlustes von verschiedenen Enzymen auf die Fähigkeit von Arabidopsis, Ureide als einzige Stickstoffquelle zu nutzen, zu untersuchen, wurden verschiedene Verlustmutanten und Komplementationslinien verwendet (siehe Tabelle 6). Die für die Phänotypenanalyse verwendeten Samen von *Arabidopsis thaliana* wurden zur Oberflächensterilisierung für 2 bis 3 Stunden in Chlorgas (100 ml Natriumhypochlorid-Lösung (13%) mit 5 ml Salzsäure (37%)) in einem Exsikkator inkubiert und anschließend steril auf $\frac{1}{2}$ MS-Agar-Platten mit 10 mM Allantoin (Tabelle 1) ausgelegt. Nach einer dreitägigen Stratifikationsphase bei 4°C im Dunkeln wurden die Platten bei 22°C im Licht (14 Stunden) und 19°C im Dunkeln (10 Stunden) im Binderklimaschrank (APT.line KBW 5.1) inkubiert.

Hierbei wurde in den ersten 7 Tagen der Inkubation nur die Hälfte (3 von 5) der Lampen verwendet und die Platten täglich

randomisiert. Mit Beginn der zweiten Woche wurden alle Lampen ($\sim 70 \mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$) verwendet und die Platten alle zwei Tage randomisiert.

Nach sechswöchigem Wachstum der Arabidopsislinien unter diesen Bedingungen wurden die Platten fotografiert und 4×10 Keimlinge pro Platte entnommen. Von den jeweiligen 10 Keimlingen wurde das Gesamtfrischgewicht (FG) bestimmt, anschließend wurden sie zusammen in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach erfolgter Gefriertrocknung (Alpha 1-2 LDplus, Christ) über Nacht wurde das Trockengewicht (TG) dieser 10 Keimlinge in einer Probe bestimmt. Die Proteine in den Proben wurden 1:100 (100 μl Puffer / mg TG) in 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4\text{-Puffer}_{\text{pH}7}$ extrahiert unter Verwendung von 2 mm großen Stahlkugeln und der Retschmühle (MM 400, Retsch) für 5 Minuten bei 30 s^{-1} . Nach einer fünfzehnminütigen Zentrifugation bei 4°C und 20.000 g wurden je 10 μl der Überstände für eine Proteinquantifizierung mittels NanoOrange (siehe Kapitel 3.2.2.3) verwendet.

3.2.3.3 Metabolitanalyse

3.2.3.3.1 In *Arabidopsis thaliana*

Um den Einfluss des Verlustes von verschiedenen Enzymen auf das

Metabolitprofil von *Arabidopsis thaliana* zu untersuchen, wurden dieselben Enzymverlustmutanten und Komplementationslinien verwendet (siehe Tabelle 6) wie für die Phänotypenanalyse.

Je acht Samen dieser Linien wurden einzeln auf Jiffy-Erde (Jiffy-7, 41 mm, Jiffy Products International AS, Norway) ausgelegt und für 3 Tage bei 4°C im Dunkeln stratifiziert. Anschließend wurden die Pflanzen bei 22°C am Tag (14 Stunden) und 19°C in der Nacht (10 Stunden), 60% Luftfeuchtigkeit und $\frac{1}{2}$ Licht (4 von 8 Lampen) im Klimaschrank (AR-36L3, Persival Scientific Inc., USA) inkubiert.

Nach dreieinhalbwöchigem Wachstum der Pflanzen, wurde zunächst die Expression der *GmAAH1-HAStrep* und *GmUAH-HAStrep* in den segregierenden Linien überprüft, indem ein Blatt für eine Western Blot Analyse verwendet wurde (siehe Kapitel 3.2.2.4.3). Die Pflanzen mit einem positiven Ergebnis wurden dann für die nachfolgende Metabolitanalyse ausgewählt. Nach vierwöchigem Wachstum der Pflanzen im Persivalklimaschrank wurden je 5 der 8 Pflanzen pro Linie geerntet und einzeln mit je 150 mg der Rosette in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Extraktion der Metabolite in den Proben erfolgte einzeln durch die Zugabe von 750 μl 20 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4\text{-Puffer}_{\text{pH}7}$ zu je einer gefrorenen Probe und unter Verwendung eines rotierenden Pistills.

Anschließend wurde der Extrakt sofort wieder in flüssigem Stickstoff eingefroren und die nächste Probe extrahiert. Nachdem alle Proben extrahiert waren, wurden sie aufgetaut und für 15 Minuten bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände der Proben (700 µl) wurden entnommen und mit weiteren 700 µl Na₂HPO₄-KH₂PO₄-Puffer_{pH7} versetzt. Hiernach wurden die Überstände aliquotiert in 100 µl (für die Ureidbestimmung) und 800 µl (für die Ammoniak- und Harnstoffbestimmung) und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Für die Ureidbestimmung wurden die 100 µl Proben aufgetaut und für die differenzielle Glyoxylatanalyse verwendet. Hierbei wurden je 20 µl des Extraktüberstandes in die jeweilige Konversionsreaktion eingesetzt und wie in Kapitel 3.2.2.5.1.2 zu Glyoxylat umgesetzt. Allerdings wurde hier bei der Konversion von Ureidoglykolat zu Glyoxylat 500 mM NaOH anstelle von 250 mM NaOH eingesetzt, da die geringere Konzentration für den Umsatz im Extrakt nicht ausreichend war. Die Detektion von Glyoxylat erfolgte wie in Kapitel 3.2.2.5.1.2 beschrieben, nur wurden die Proben vor der Absorptionmessung zusätzlich für 5 Minuten bei 16.000 g und Raumtemperatur zentrifugiert, um eventuell vorhandene feste Extraktbestandteile zu sedimentieren. Als Standard wurde 0 – 400 µM Glyoxylat in 20 mM Na₂HPO₄-KH₂PO₄-Puffer_{pH7} vermessen. Für die

Detektion von Ammoniak und Harnstoff in den Extrakten wurde der Harnstoff zunächst mittels Urease zu Ammoniak umgesetzt, welches im Puffer (pH7) zu 99% protoniert wird. Das entstandene Ammonium wurde mit Hilfe einer Kationen-Austauschsäule (Bond Elut SCX HF, 50 mg, 1ml, 100 / PK, Varian) vom Extrakt getrennt und mittels Berthelot-Reaktion detektiert. Für diesen Vorgang wurden die 800 µl Proben aufgetaut und in zweimal 400 µl getrennt. Für die Harnstoffbestimmung wurden 40 µl Urease (4U/µl) zu einmal 400 µl Extraktüberstand gegeben und für 30 Minuten bei 30°C inkubiert. Für die Ammoniakdetektion wurden die anderen 400 µl Extraktüberstand direkt auf die Kationen-Austauschsäule gegeben. Für die Ammoniakdetektion in den Urease-behandelten Proben wurden die 440 µl Gesamtprobe auf je eine Säule geladen. Nach einem Waschschrift mit 1 ml destilliertem Wasser wurde das Ammonium mit Hilfe von 400 µl KCl (4M) von der Säule eluiert. Je 100 µl der Ammoniumelutionen wurden dann für die Berthelot-Reaktion verwendet, welche wie unter Kapitel 3.2.2.5.1.1 beschrieben, durchgeführt wurde. Als Standard diente hier 0 – 400 µM NH₄Cl in 20 mM Na₂HPO₄-KH₂PO₄-Puffer_{pH7}, welches wie die Proben behandelt wurde.

3.2.3.3.2 In Glycine max

Um die Ureidmetabolite in Sojabohne zu bestimmen, wurden 10 mg des entsprechenden Materials (siehe jeweiliges Experiment) geerntet und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Der Aufschluss der Proben erfolgte im gefrorenen Zustand mit Keramikkügelchen in der Retschmühle (MM 400, Retsch) für 2 Minuten bei 30 s^{-1} . Anschließend wurden die Metabolite mit $100\text{ }\mu\text{l}$ $20\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4\text{-Puffer}_{\text{pH}7}$ mit 5 mM EDTA aus dem zerkleinerten Material durch zweiminütiges Mischen extrahiert. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 4°C und 20.000 g wurden die Überstände der Proben entnommen und erneut für eine Minute zentrifugiert. Je $20\text{ }\mu\text{l}$ der Überstände wurden anschließend für die verschiedenen Konversionsreaktionen der Ureide eingesetzt (siehe Kapitel 3.2.2.5.1.2). Da es

zu einer Gelbfärbung während der Reaktion der NaOH mit dem Sojabohnenextrakt kommt, wurde hier für die Konversion von Ureidoglykolat zu Glyoxylat das aufgereinigte Enzym *EcUUH* (siehe Kapitel 3.2.2.2.1.1) in Gelfiltrationspuffer verwendet und die Reaktionsbedingungen für die anderen Konversionen entsprechend angepasst (Tabelle 12). So wurde das Enzym durch den Gelfiltrationspuffer ersetzt und auch Mangan durch Wasser, da es zu einer unerwünschten Reaktion mit der NaOH in der Allantoinkonversion führt. Für die Allantoinkonversion wurde aus dem Gelbfärbungsgrund der NaOH mit dem Extrakt, dieser 1:10 in $20\text{ mM Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4\text{-Puffer}_{\text{pH}7}$ mit 5 mM EDTA verdünnt, wobei dies auch für den Extrakt in der Allantoatkonversion getan wurde, da dies auch zu einer Erhöhung des Detektionslimits dieser beiden Metabolite führt. Die Detektion des Glyoxylats nach

Tabelle 12: Arbeitsschritte der Konversionsreaktionen für Sojabohnenextrakte

Glyoxylat	Ureidoglykolat	Allantoat	Allantoin
20 μl Probe	20 μl Probe	20 μl Probe	20 μl Probe
2 μl Gelfiltrationspuffer 2 μl H ₂ O	2 μl <i>EcUUH</i> 2 μl MnCl ₂ (100 mM)	2 μl Gelfiltrationspuffer 2 μl H ₂ O	2 μl Gelfiltrationspuffer 2 μl H ₂ O
4 min bei 30°C	4 min bei 30°C	60 μl H ₂ O 20 μl HCl ₁₅₀	40 μl H ₂ O 20 μl NaOH ₅₀₀
flüssiger Stickstoff	flüssiger Stickstoff	4 min bei 100°C 2 min bei 0°C	8 min bei 100°C 2 min bei 0°C
		20 μl PO ₄ -Puffer ₄₀₀	20 μl HCl ₆₅₀
		flüssiger Stickstoff	4 min bei 100°C 5 min bei 0°C
			20 μl PO ₄ -Puffer ₄₀₀
80 μl H ₂ O 20 μl PO ₄ -Puffer ₄₀₀	80 μl H ₂ O 20 μl PO ₄ -Puffer ₄₀₀		flüssiger Stickstoff

den erfolgten Konversionsreaktionen geschah wie in Kapitel 3.2.3.3.1 für die Metabolitanalyse in Arabidopsis beschrieben, nur dass nach dem Auftauen der Proben 80 µl H₂O und 20 µl PO₄-Puffer zu den Glyoxylat und Ureidoglykolatproben gegeben wurde, bevor diese mit Phenylhydrazin versetzt wurden.

3.2.3.4 Natives Proteinniveau

Um das native Proteinniveau der ALN, AAH, UGlyAH und UAH sowohl in Arabidopsis als auch in Sojabohne zu bestimmen, wurden spezifische Antikörper

Tabelle 13: Antiserendetektionslimits pro Proteinbande

Anti-serum	Enzym	aufge-reinigt	nativ im Extrakt
1) α-Gm-ALN	<i>At</i> ALN	= 0,4 ng	~ 6 ng
	<i>Gm</i> ALN 1	< 0,3 ng	~ 3 ng
	<i>Gm</i> ALN 2	< 0,3 ng	~ 5 ng
	<i>Gm</i> ALN 3	= 0,1 ng	~ 4 ng
	<i>Gm</i> ALN 4	< 0,4 ng	~ 6 ng
2) α-Gm-ALN	<i>At</i> ALN	< 0,75 ng	~ 6 ng
	<i>Gm</i> ALN 3	= 0,1 ng	~ 2 ng
	<i>Gm</i> ALN 4	< 0,4 ng	~ 3 ng
1) α- <i>At</i> -AAH	<i>At</i> AAH	< 0,25 ng	~ 5 ng
	<i>Gm</i> AAH 1	< 0,25 ng	~ 20 ng
2) α- <i>At</i> -AAH	<i>At</i> AAH	< 0,25 ng	~ 10 ng
	<i>Gm</i> AAH 1	= 0,25 ng	~ 40 ng
1) α-Gm-UGlyAH	<i>At</i> UGlyAH	< 0,25 ng	~ 10 ng
	<i>Gm</i> UGlyAH 1	< 0,25 ng	~ 5 ng
2) α-Gm-UGlyAH	<i>At</i> UGlyAH	< 0,25 ng	~ 10 ng
	<i>Gm</i> UGlyAH 1	< 0,25 ng	~ 5 ng
1) α- <i>At</i> -UAH	<i>At</i> UAH	< 0,25 ng	~ 5 ng
	<i>Gm</i> UAH	< 0,25 ng	~ 5 ng
2) α- <i>At</i> -UAH	<i>At</i> UAH	< 0,25 ng	~ 5 ng
	<i>Gm</i> UAH	< 0,25 ng	~ 5 ng

gegen diese Enzyme hergestellt (siehe Kapitel 3.2.2.2.1.2). Die zwei Antiseren, die gegen jedes der Enzyme erhalten wurden, wurden zunächst für eine Quantifizierung verwendet, um das Detektionslimit der Antiseren (1:200 eingesetzt) für ihr entsprechendes Enzym zu bestimmen (siehe Anhang). Anhand einer Verdünnungsreihe des jeweilig aufgereinigten Enzyms konnten folgende Werte für die Proteindetektionslimits (pro Bande) der Antiseren ermittelt bzw. für Extrakte abgeschätzt werden (Tabelle 13). Aufgrund dieser Daten wurde generell das Antiserum 1 mit einer Verdünnung von 1:200 für alle Detektionen verwendet (siehe Kapitel 3.2.2.4.3). Zu beachten ist, dass nur die Detektion der *At*UAH und *Gm*UAH im Rohextrakt durch den Vergleich vom Wildtyp mit den entsprechenden Verlustmutanten validiert wurde. Die Detektion der ALNs und UGlyAHs in den Extrakten ist nicht verifiziert worden, da sie im Arabidopsis-Wildtyp kaum zu detektieren sind und es in Sojabohne keine entsprechenden Verlustmutanten gibt. Allerdings wurde deren Detektion (vor allem in Sojabohne) aufgrund der jeweiligen Bandenstärke und –größe, sowie der Regulation des Proteingehalts in verschiedenen Proben als gültig angenommen.

3.2.3.4.1 *In Arabidopsis thaliana*

Zur Untersuchung des nativen Proteingehalts der ureidabbauenden Enzyme in *Arabidopsis* wurden verschiedene Gewebe von zehn Wochen alten *Arabidopsis* Wildtypen und gesamte Pflanzen von sieben Wochen alten Keimlingen gewachsen auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit Nitrat oder Allantoin als Stickstoffquelle verwendet. Die Gewebe wurden 1:4 mit Extraktionspuffer (siehe Kapitel 3.2.2.2.1) unter Verwendung eines rotierenden Pistills extrahiert und anschließend für 15 Minuten bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde mit fünffach konzentriertem SDS-Ladepuffer versetzt, sodass die Proben (10 μ l) letztlich 1:5 verdünnt auf das SDS-Gel (siehe Kapitel 3.2.2.4.1) geladen wurden, um anschließend mittels Western Blot Analyse (siehe Kapitel 3.2.2.4.3) untersucht zu werden.

3.2.3.4.2 *In Glycine max*

Zur Untersuchung des nativen Proteingehalts der ureidabbauenden

Enzyme in Sojabohne, wurden verschiedene Gewebe (siehe jeweiliges Experiment) geerntet und eingefroren. Der Aufschluss der Proben geschah mittels Retschmühle (MM 400, Retsch) und Keramikkügelchen für 2 Minuten bei 30 s⁻¹ im gefrorenen Zustand. Aus dem zerkleinerten Material wurden die Proteine 1:10 mit Extraktionspuffer (siehe Kapitel 3.2.2.2.1) durch zweiminütiges Mischen extrahiert und die Proben anschließend für 5 Minuten bei 20.000 g und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden entweder direkt mit fünffach konzentriertem SDS-Ladepuffer versetzt und mit 10 μ l auf ein SDS-Gel geladen, oder sie wurden zunächst für eine Proteinbestimmung mittels Bradford-Lösung (entsprechend der Betriebsanweisung) verwendet und dann auf eine Protein-konzentration von 1 mg / ml eingestellt. Diese verdünnten Extrakte wurden dann mit fünffach konzentriertem SDS-Ladepuffer versehen und mit 10 μ l auf ein SDS-Gel (siehe Kapitel 3.2.2.4.1) geladen, um anschließend mittels Western Blot Analyse (siehe Kapitel 3.2.2.4.3) untersucht zu werden.

4 Ergebnisse

4.1 Der Ureidabbau allgemein

4.1.1 Identifizierung und Charakterisierung ureidabbauender Enzyme

4.1.1.1 Vom Allantoat zum Ureidoglykolat

Das Ureid Allantoat kann prinzipiell durch zwei Klassen an Enzymen abgebaut werden. Entweder durch die Klasse der Allantoat Amidohydrolasen (AAHs), welche ammoniakfreisetzend ist, oder durch die Klasse der Allantoicasen (ALCs), welche harnstofffreisetzend ist. In beiden Fällen soll Ureidoglykolat das Endprodukt sein, wobei der AAH-vermittelte Allantoatabbau möglicherweise die Bildung des Intermediats Ureidoglycin beinhaltet (Abbildung 4) (van der Drift *et al.*, 1970).

4.1.1.1.1 Der AAH – Weg

Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass in *Arabidopsis thaliana* der Allantoatabbau durch eine ammoniakfreisetzende AAH vermittelt wird (Todd und Polacco, 2006; Werner *et al.*, 2008). Das entsprechende Enzym wurde genetisch

identifiziert und im aufgereinigten Zustand biochemisch charakterisiert (Werner, 2007). Dies war das erste Mal, dass die Aktivität einer genetisch identifizierten AAH im aufgereinigten Zustand gezeigt und untersucht werden konnte (Werner *et al.*, 2008).

4.1.1.1.1.1 Das unbekannte 3. Enzym

Da laborinterne Vordaten darauf hindeuteten, dass die allantoatabbauende AAH und die ureidoglykolatabbauende UAH aus *Arabidopsis* nicht die einzigen beiden Enzyme sein können, die den kompletten Umsatz von Allantoat und damit die vollständige Freisetzung des Purinringstickstoffes katalysieren, wurde nach einem Enzym gesucht, dessen Existenz, Funktion und Beteiligung an diesem Stoffwechselweg bis dahin vollkommen unbekannt war. Um die Funktion des unbekanntes Enzymes einzugrenzen, wurde zunächst das Reaktionsprodukt der *AtAAH* bestimmt.

4.1.1.1.1.1.1 Das Reaktionsprodukt der *AtAAH*

Da bisher die Messung der Ammoniakfreisetzung im Vordergrund stand, bei der sich unter Verwendung des aufgereinigten Enzymes zeigte, dass durch die AAH-Reaktion mit einem Mol Allantoat zwei

Mol Ammoniak freigesetzt werden, wurde vermutet, dass Ureidoglykolat das Reaktionsprodukt der AAH ist (Werner *et al.*, 2008). Dies entsprach dem Stand der Kenntnis zur AAH-Reaktion (van der Drift *et al.*, 1970). Das Reaktionsprodukt der AAH konnte aber nicht von der UAH umgesetzt werden, war also für diese kein Substrat. Die Aktivität der UAH wurde allerdings mit racemischen Ureidoglykolat gezeigt (Przybycin, 2008). Aufgrund dieser Befunde kamen wir zu der Vermutung, dass entweder das „falsche“ Ureidoglykolat-Enantiomer von der AAH gebildet wird oder, dass entgegen dem Stand der Kenntnis Ureidoglykolat nicht das Reaktionsprodukt der AAH ist. Beide Fälle würden die fehlende Aktivität der UAH mit dem AAH-Reaktionsprodukt erklären und ein drittes Enzym erfordern. Im ersten Fall würde es sich um eine fehlende Racemase handeln, die die Konformation des AAH-produzierten Ureidoglykolats umkehrt und damit das „richtige“ Enantiomer für die UAH bereitstellt. Im zweiten Fall müsste die AAH ein anderes Reaktionsprodukt aufweisen. Hier käme vor allem Ureidoglycin in Frage, da es bereits als mögliches Reaktionsprodukt der AAH postuliert wurde (Vogels, 1966). Darüber hinaus ist es ein wahrscheinliches Zwischenprodukt der Hydrolyse einer Amidgruppe des Allantoats. Das unbekannte Enzym müsste dieses

Ureidoglycin zu Ureidoglykolat hydrolysieren – also eine Ureidoglycin Aminohydrolase (UGlyAH) sein. Zusätzlich wäre auch eine Kombination beider Fälle möglich.

Um das Reaktionsprodukt der AAH zu bestimmen wurde eine Aktivitätsmessung mit 1 mM Allantoat als Substrat durchgeführt und die Reaktionsprodukte der aufgereinigten *AtAAH* über die Zeit bestimmt (siehe Kapitel 3.2.2.5). Gemessen wurden hierbei Ammoniak, Harnstoff, Ureidoglykolat und Glyoxylat (siehe Kapitel 3.2.2.5.1.1 und 3.2.2.5.1.2).

Es zeigte sich, dass bei der Reaktion der *AtAAH* mit 1 mM Allantoat zwar 2 mM

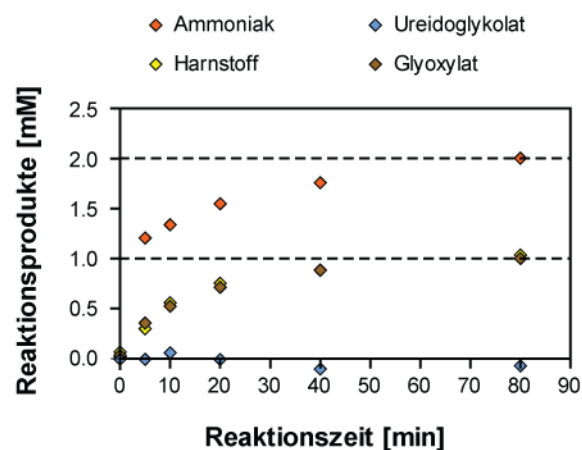


Abbildung 6 – Reaktionsprodukte der *AtAAH*.

Bestimmung der Reaktionsprodukte während der enzymatischen Reaktion von *AtAAH* mit 1 mM Allantoat als Substrat. Gemessen wurden: Ammoniak, Harnstoff, Ureidoglykolat und Glyoxylat. Die Detektion von Ammoniak und Harnstoff (nach Umsatz mit Urease zu Ammoniak) erfolgte mittels der Berthelot-Reaktion. Ureidoglykolat und Glyoxylat wurden mit Hilfe der differentiellen Glyoxylatanalyse detektiert. Die Quantifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte durch einen entsprechenden Standard.

Ammoniak freigesetzt werden (wie auch vorher beobachtet und immer postuliert), es aber trotzdem zu keiner Produktion von Ureidoglykolat kommt (Abbildung 6). Stattdessen entstehen 1 mM Harnstoff und 1 mM Glyoxylat pro 1 mM Allantoat. Somit ist Ureidoglykolat nicht das Reaktionsprodukt der AAH. Es ist wahrscheinlich Ureidoglycin, wobei in diesem Fall aus Allantoat nur ein Mol Ammoniak von der AAH enzymatisch freigesetzt wird. Das gebildete Ureidoglycin ist sehr instabil und zerfällt dann wahrscheinlich nichtenzymatisch zu einem zweiten Mol Ammoniak, einem Mol Harnstoff und einem Mol Glyoxylat. Dieses Experiment widersprach dem langjährigen Stand der Kenntnis zur AAH-Reaktion und führte zur Suche nach einem neuen Enzym, das Ureidoglycin zu Ureidoglykolat umsetzt.

4.1.1.1.1.2 Die UGlyAH- Kandidaten

Um dieses unbekanntes Enzym zu identifizieren, wurde eine vergleichende Genomanalyse (String, von Mering *et al.*, 2007) durchgeführt, die eine Vielzahl von sequenzierten prokaryotischen und eukaryotischen Genomen einschloss. Bei prokaryotischen Genomen liefert die Kopplung von Genen in vielen Genomen aufgrund der strukturellen Gliederung in

Operons oft einen starken Hinweis für die funktionelle Beziehung von Genprodukten. Da nach einem Enzym gesucht wurde, welches das Reaktionsprodukt der AAH in das Substrat der UAH umwandelt, wurde nach Genen gesucht, die in Mikroorganismen direkt neben der *AAH* in einem Operon liegen. Hier zeigte sich, dass entweder eine Transaminase (PucG) oder ein Protein unbekannter Funktion (YlbA) in direkter Nachbarschaft zur AAH im Genom vieler Mikroorganismen kodiert ist (Werner *et al.*, 2010). Da eine Transaminierung nicht zur Produktion von Ureidoglykolat führen würde und darüber hinaus keine pflanzlichen Transaminasen mit Voraussage für eine mögliche ER-Lokalisation gefunden werden konnten, wurde sich für YlbA, als Kandidat für die mögliche UGlyAH-Aktivität entschieden. Zu YlbA konnten Orthologe in Pflanzen mit möglicher ER-Zielsequenz identifiziert werden (Werner *et al.*, 2010). Dies war ein wichtiges Kriterium, da sowohl die AAH als auch die UAH im ER lokalisiert sind (Werner *et al.*, 2008 und laborinterne Daten) und es unwahrscheinlich ist, dass ein so instabiles Zwischenprodukt wie Ureidoglycin aus dem ER exportiert wird, um nach dem Umsatz zu Ureidoglykolat wieder ins ER importiert zu werden.

Die UGlyAH in *Arabidopsis I*

Die Proteinsequenz von YlbA aus *E. coli* wurde für die Suche nach einem orthologen Protein in *Arabidopsis thaliana* verwendet. Hier konnte ein YlbA-orthologes Protein (UGlyAH-Kandidat) identifiziert werden (At4g17050). Das Gen des Kandidaten wurde mittels RT-PCR von cDNA aus *Arabidopsis thaliana* Col 0 amplifiziert und in einen pflanzlichen Expressionsvektor unter die Kontrolle eines 35S-Promotors und mit einer Sequenz zur C-terminalen StrepII-Markierung kloniert (siehe Kapitel 3.2.1.1.1). Mittels Agrobakterien wurde dieses Konstrukt transient in Blättern von *Nicotiana benthamiana* überexprimiert (siehe Kapitel 3.2.2.1.2) und das Protein anhand seiner StrepII-Markierung affinitätschromatographisch aufgereinigt (siehe Kapitel 3.2.2.2.2).

Der UGlyAH-Kandidat aus *Arabidopsis* konnte in Blättern von *N. benthamiana* erfolgreich überexprimiert werden (Abbildung 7B, Spur 2). Die Affinitätschromatographie des Proteins mittels seiner StrepII-Markierung führte zu einer Aufreinigung (Abbildung 7A, Spur 5) und Anreicherung (Abbildung 7B, Spur 5) des *AtUGlyAH*-Kandidaten in der Elutionsfraktion. Wie auch die Elutionen der *AtAAH* und der *AtUAH* wurde diese Elution der möglichen *AtUGlyAH* aliquotiert, in flüssigem Stickstoff

eingefroren und bei -20°C gelagert. Um seine Aktivität als Ureidoglycin

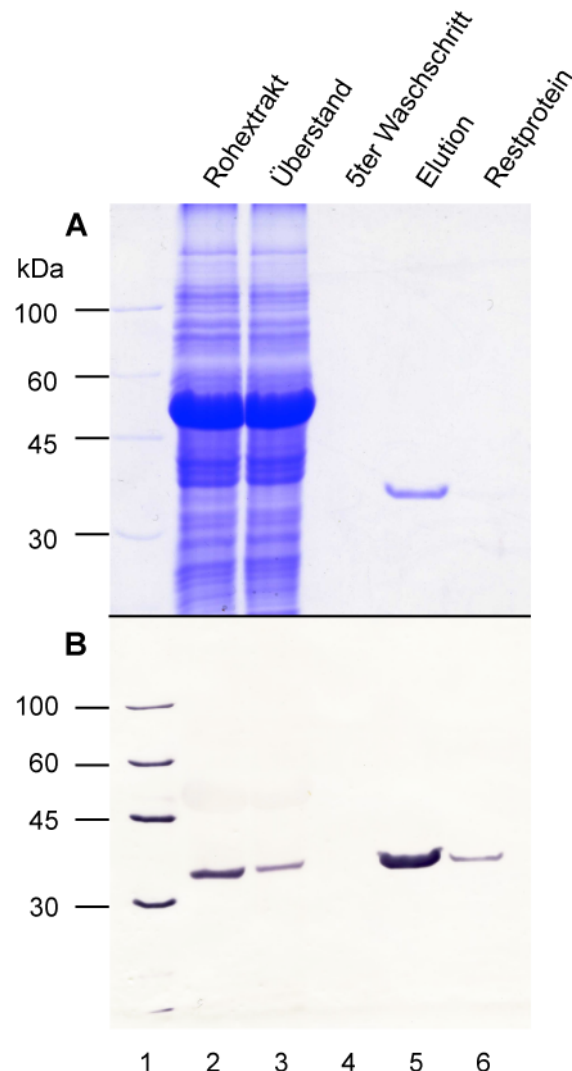


Abbildung 7 – Affinitätsaufreinigung des *AtUGlyAH*-Kandidaten aus *N. benthamiana*.

Verschiedene Fraktionen der Aufreinigung wurden mit SDS-Gelelektrophorese getrennt und anschließend mit (A) Coomassie Färbung zur Gesamtproteindetektion und (B) Western Blot zur Detektion des StrepII-markierten Proteins dargestellt. Spur 1, 5 μl Strep-Tag protein ladder (IBA) als Marker; Spuren 2 - 6, 8 μl Proteinlösung pro Spur. Spur 2, Rohextrakt mit den löslichen Proteinen; Spur 3, Überstand nach Inkubation mit der Strep-Tactin MacroPrep Matrix (IBA); Spur 4, Überstand nach dem fünften Waschschrift der Matrix; Spur 5, Proteinelution mit Biotin und Spur 6, Restproteine an der Matrix nach der Elution.

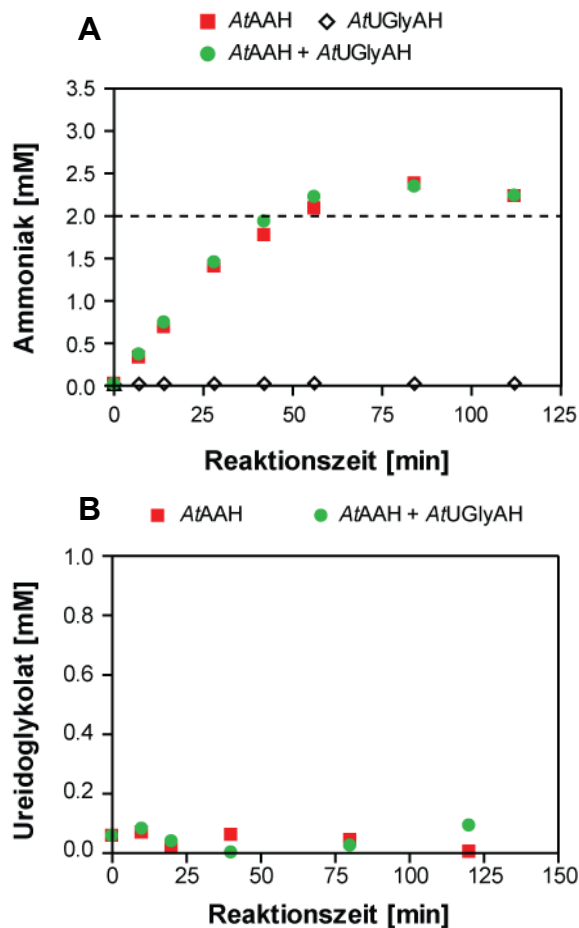


Abbildung 8 – Erster Aktivitätstest des *AtUGlyAH*-Kandidaten.

Bestimmung der Reaktionsprodukte des *AtUGlyAH*-Kandidaten in Gegenwart der *AtAAH*. Als Substrat diente 1 mM Allantoat. Gemessen wurde (A) die Freisetzung von Ammoniak (Berthelot-Reaktion) und (B) die Produktion von Ureidoglykolat (differenzielle Glyoxylatanalyse). Die Quantifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte durch einen entsprechenden Standard.

Aminohydrolase zu testen, wurde ein Aktivitätstest zusammen mit der aufgereinigten *AtAAH* und 1 mM Allantoat als Substrat durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.2.5). Gemessen wurde hier zum einen Ammoniak (siehe Kapitel 3.2.2.5.1.1), da eine Beschleunigung der Ammoniakfreisetzung der AAH mit Allantoat durch die zusätzliche enzymatische Aktivität der

UGlyAH mit Ureidoglycin zu erwarten ist. Zum anderen wurde die Bildung von Ureidoglykolat gemessen (siehe Kapitel 3.2.2.5.1.2), da dies das Produkt der *UGlyAH* sein soll. Es konnte durch den Zusatz des *AtUGlyAH*-Kandidaten weder eine Beschleunigung der Ammoniakfreisetzung der *AtAAH* aus Allantoat beobachtet werden (Abbildung 8A) noch die Produktion von Ureidoglykolat (Abbildung 8B). Somit schien das *YlbA*-orthologe Protein aus Arabidopsis keine *UGlyAH*-Funktion zu besitzen.

Da aufgrund der physischen Verbindung von *YlbA* mit der *AAH* eine Beteiligung des *YlbA*-Proteins am Ureidabbau vermutet worden war, wurden verschiedene andere Substrate getestet, um herausfinden, ob das *YlbA*-Protein bzw. sein Ortholog aus Arabidopsis eine alternative Funktion besitzen könnte. Hier wurden Ureidoglykolat, Glyoxylat und Harnstoff getestet sowie verschiedene Substratkombinationen (z.B. Ureidoglykolat & Ammonium oder Glyoxylat und Harnstoff), um etwaige Umkehrreaktionen zu überprüfen. Es zeigte sich, dass das *YlbA*-Ortholog aus Arabidopsis mit keinem dieser Substrate bzw. Substratkombinationen irgendeine Aktivität aufweist (Daten nicht gezeigt). So war zu diesem Zeitpunkt unklar, ob und wenn ja, mit welcher Aktivität *YlbA* bzw. das Arabidopsis-Ortholog am Ureidabbau beteiligt ist.

Die UGlyAH in *E. coli*

Da das YlbA-Protein aus *E. coli* als Ausgangspunkt für die Untersuchung der möglichen UGlyAHs in Pflanzen verwendet wurde, wobei dessen Funktion auch in *E. coli* unbekannt war, sollte auch diese Aktivität untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden sowohl die Gene der AAH (*AllC*) und der potenziellen UGlyAH (*YlbA*) als auch das Gen der UUH (*AllA*) mittels PCR von genomischer DNA aus *E. coli* DH10B amplifiziert. Anschließend wurden die Gene in einen bakteriellen Expressionsvektor unter die Kontrolle eines T7-Promotors und mit einer Sequenz zur C-terminalen His-Markierung kloniert (siehe Kapitel 3.2.1.1.2). Die Proteine wurden in *E. coli* BL21 überexprimiert (siehe Kapitel 3.2.2.1.1) und anhand ihrer His-Markierung affinitätschromatographisch aufgereinigt (siehe Kapitel 3.2.2.2.1.1).

Alle drei Proteine konnten stark überexprimiert werden (Abbildung 9, Spuren 1, 2, 7, 8, 13 & 14). Trotz teilweise großer Verluste an überexprimierten Proteinen in den Pellets (Abbildung 9, Spuren 2, 8 & 14), konnten ausreichend lösliche Proteine in den Elutionen angereichert und aufgereinigt werden (Abbildung 9, Spuren 5, 6, 11, 12, 17 & 18).

Um die Aktivität von *EcYlbA* als Ureidoglycin Aminohydrolase zu testen, wurde auch hier ein Aktivitätsversuch in

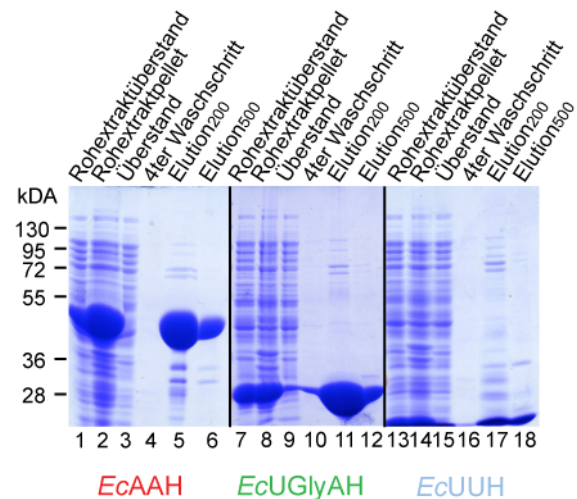


Abbildung 9 – Affinitätsaufreinigung der EcAAH, des EcUGlyAH-Kandidaten und der EcUUH.

Die Aufreinigungsfraktionen der *EcAAH* (1 - 6), des *EcUGlyAH*-Kandidaten (7 - 12) und der *EcUUH* (13 - 18) wurden mittels SDS-Gelelektrophorese getrennt und mit Coomassie gefärbt. Spuren 1 - 18, 8 µl Proteinlösung pro Spur. Spuren 1, 7 & 13, Rohextrakte der löslichen Proteine; Spuren 2, 8 & 14, Pellets mit den unlöslichen Proteinen; Spuren 3, 9 & 15, Überstände nach dreimaliger Inkubation mit der Nickel-Sepharose Matrix (GE Healthcare); Spuren 4, 10 & 16, Überstand der vierten Waschschrte der Matrix; Spuren 5, 11 & 17, erste Proteinelutionen mit 200 mM Imidazol und Spuren 6, 12 & 18, zweite Proteinelutionen mit 500 mM Imidazol.

Gegenwart der aufgereinigten *EcAAH* und Allantoat als Substrat durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.2.5).

Bei der Messung der Ammoniakfreisetzung der *EcAAH* aus Allantoat konnte hier die erhoffte Beschleunigung durch den Zusatz der potenziellen *EcUGlyAH* (*YlbA*) beobachtet werden (Abbildung 10A). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Zusatz der potenziellen UGlyAH zur AAH-Reaktion mit Allantoat zur Produktion von Ureidoglykolat führt (Abbildung 10B).

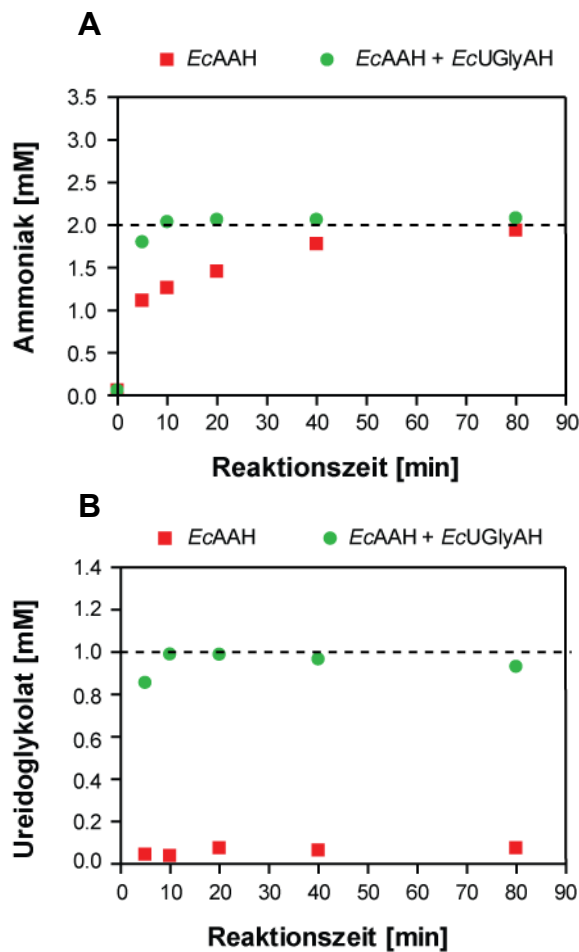


Abbildung 10 – Aktivitätstest des *EcUGlyAH*-Kandidaten.

Bestimmung der Reaktionsprodukte des *EcUGlyAH*-Kandidaten in Gegenwart der *EcAAH* und 1 mM Allantoat als Substrat. Gemessen wurde (A) die Freisetzung von Ammoniak (Berthelot-Reaktion) und (B) die Produktion von Ureidoglykolat (differenzielle Glyoxylatanalyse). Die Quantifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte durch einen entsprechenden Standard.

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die AAH ein Mol Ammoniak aus einem Mol Allantoat freisetzt und dabei wahrscheinlich Ureidoglycin produziert. Dieses Ureidoglycin ist sehr instabil und zerfällt nichtenzymatisch zu einem weiteren Mol Ammoniak, Glyoxylat und Harnstoff. Der Zerfall des Ureidoglycins kann durch

die Zugabe von YlbA (*UGlyAH*-Kandidat) verhindert werden. Dieses Enzym verwendet wahrscheinlich Ureidoglycin als Substrat und setzt dieses unter Freisetzung eines Moleküls Ammoniak zu Ureidoglykolat um. Somit handelt es sich bei dem *UGlyAH*-Kandidaten YlbA aus *E. coli* wahrscheinlich um eine Ureidoglycin Aminohydrolase (*UGlyAH*), die das AAH-Reaktionsprodukt Ureidoglycin zu Ureidoglykolat hydrolysiert. Um die Reaktionsprodukte der AAH und *UGlyAH* näher zu charakterisieren, wurde eine polarimetrische Messung vorgenommen (siehe Kapitel 3.2.2.5.2), bei der die optische Drehung der Reaktionsprodukte bestimmt wurde.

Die Bestimmung der optischen Drehung wurde durchgeführt, um Rückschlüsse auf das entsprechend entstehende Enantiomer zu ziehen, da sowohl Ureidoglycin als auch Ureidoglykolat chirale Verbindungen sind. Zu diesem Zweck wurde das achirale Allantoat enzymatisch umgesetzt – entweder von der aufgereinigten *EcAAH* allein oder zusammen mit der aufgereinigten *EcUGlyAH* und die optische Drehung der Reaktionsprodukte in einem Jasco P – 1020 Polarimeter gemessen.

In beiden Fällen konnte eine negative Drehung des jeweiligen Reaktionsproduktes festgestellt werden (Abbildung 11). In der *EcAAH*-Reaktion erfolgte nach etwa zehn Minuten ein Rückgang der negativen

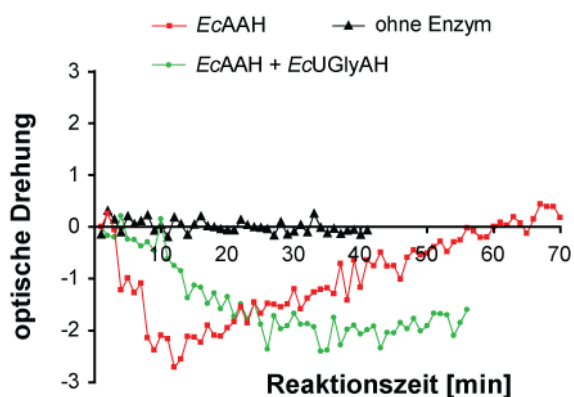


Abbildung 11 – Optische Drehung der EcAAH- und EcUGlyAH-Reaktionsprodukte.

Die Messung der optischen Drehung erfolgte in einem Jasco P – 1020 Polarimeter bei 589 nm während des enzymatischen Umsatzes von 28 mM Allantoat durch EcAAH und EcAAH + EcUGlyAH. Die Kontrolle erfolgte ohne Enzym.

Drehung zurück zu keiner optischen Drehung des Reaktionsproduktes. Anhand dieses Versuches konnte nachgewiesen werden, dass sowohl das wahrscheinlich produzierte Ureidoglycin als auch Ureidoglykolat in der negativ (-) – drehenden Form gebildet werden (Abbildung 11). Darüber hinaus unterstützt dieser Versuch die Annahme, dass die AAH das instabile Ureidoglycin produziert welches nichtenzymatisch zum achiralen Glyoxylat zerfällt. Das durch die UGlyAH gebildete (-) - Ureidoglykolat ist hingegen stabiler, so dass die Reaktionsmischung ihre negative optische Drehung über die Zeit beibehält.

Bereits 1970 wurde festgestellt, dass es sich bei (-) – Ureidoglykolat um das *S* – Enantiomer handelt, wobei auch angenommen wurde, dass das postulierte Intermediat Ureidoglycin als *S* –

Enantiomer entsteht (Gravenmade *et al.*, 1970). Zusammenfassend deuten diese Versuche darauf hin, dass die AAH aus Allantoat *S* – (-) Ureidoglycin produziert, welches von der UGlyAH zu *S* – (-) Ureidoglykolat umgesetzt wird.

Die UGlyAH in Arabidopsis II

Nachdem gezeigt werden konnte, dass es sich bei dem UGlyAH-Kandidaten Ylba aus *E. coli* wahrscheinlich um die Ureidoglycin Aminohydrolase handelt, welche Ureidoglykolat produziert, entstand die Frage, warum das Arabidopsis-Ortholog diese Aktivität nicht aufzeigte. Hier wurde nun vermutet, dass dies möglicherweise an einem methodischen Problem liegt. Da das Protein aufgereinigt werden konnte (Abbildung 7), gab es zwei Möglichkeiten, warum es enzymatisch nicht aktiv war. Erstens: Die StrepII-Markierung verhindert die Aktivität durch eine Änderung der Tertiär- oder Quartärstruktur des Proteins oder zweitens: Das Protein verliert seine Aktivität während des Aufreinigungs- und / oder Einfrierprozesses. Um diese Möglichkeiten zu untersuchen, wurde der *AtUGlyAH*-Kandidat erneut aufgereinigt (siehe Kapitel 3.2.2.2.1) und direkt nach der Elution (frisch) bzw. nach Einfrieren der Elution in flüssigem Stickstoff (gefroren) auf seine Aktivität hin getestet. Hierbei wurden der Elution einzeln

folgende Substanzen beigemischt, um eventuelle Aktivitätsverluste während des Einfrierens zu verhindern: H₂O (als Kontrolle), Glycerol (verhindert Gefrieren bei -20°C), MnCl₂ (als möglichen Kofaktor), BSA (zur Erhöhung der Dichte an hochmolekularen gelösten Substanzen (*macromolecular crowding*)), aufgereinigte AtAAH (zur Möglichkeit der Komplexbildung), PEG₄₀₀₀ (*macromolecular crowding*) und KCl (zur möglichen Erhöhung der Proteinlöslichkeit). Die Aktivität der so behandelten AtUGlyAH-Elution wurde wie zuvor in Gegenwart der aufgereinigten AtAAH und Allantoat als Substrat getestet (siehe Kapitel 3.2.2.5). Hierbei wurde nur die Ammoniakfreisetzung gemessen (siehe Kapitel 3.2.2.5.1.1) und das Hauptaugenmerk zunächst auf die Beschleunigung der AtAAH-Reaktion durch den AtUGlyAH-Kandidaten gelegt, so wie es auch im Fall des aktiven *E. coli*-Proteins möglich war (Abbildung 10A). Der Zusatz der frischen Elution des AtUGlyAH-Kandidaten beschleunigte in jeder Reaktion die Ammoniakfreisetzung der AtAAH im Vergleich zur Kontrollreaktion (letztes Säulenpaar) mit nur der AtAAH in der Reaktion (Abbildung 12). Das weist daraufhin, dass zum einen die StrepII-Markierung die Aktivität des Enzyms nicht blockiert und zum anderen das frisch aufgereinigte Enzym unabhängig

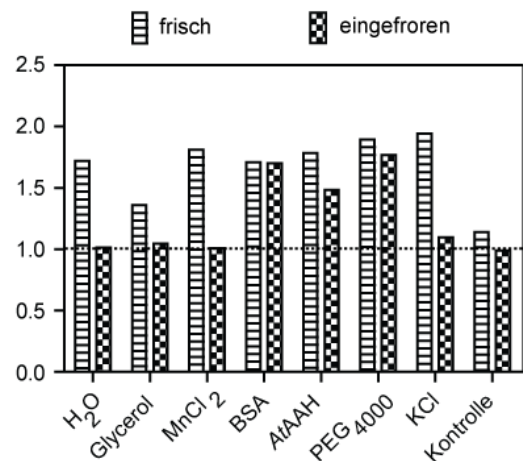


Abbildung 12 – Zweiter Aktivitätstest des AtUGlyAH-Kandidaten.

Bestimmung der Ammoniakproduktion nach vierzigminütiger Reaktion des AtUGlyAH-Kandidaten in Gegenwart der AtAAH. Als Substrat diente Allantoat (1 mM). Die Elution des AtUGlyAH-Kandidaten wurde mit verschiedenen Substanzen versetzt und uneingefroren (frisch) und nach Einfrieren in flüssigem Stickstoff (eingefroren) getestet. Die verwendeten Substanzen waren: H₂O, Glycerol, MnCl₂, BSA, AtAAH, PEG₄₀₀₀ und KCl. Bei der Kontrollreaktion wurde die AtUGlyAH-Elution nicht zugesetzt (nur AtAAH). Die Quantifizierung der Ammoniakfreisetzung erfolgte durch einen Ammoniumstandard im Reaktionshintergrund.

vom Zusatz irgendeiner Substanz durchaus die Aktivität einer Ureidoglycin Aminohydrolase aufzeigen kann. Wenn das Enzym eingefroren wird, verliert es vollständig seine Aktivität, es sei denn, es wird zusammen mit BSA, der AtAAH oder PEG₄₀₀₀ eingefroren (Abbildung 12). Der Zusatz dieser drei Substanzen dient der Erhöhung der Dichte an hochmolekularen gelösten Substanzen (*macromolecular crowding*) in der ansonsten sehr reinen Elution. Dieser positive Effekt auf Proteinaktivitäten wurde bereits umfassend beschrieben (Ellis, 2001). Da BSA die

Proteinquantifizierung und –darstellung stören und die *AtAAH* zusätzlich eine unabhängige Aktivitätsdarstellung des *AtUGlyAH*-Kandidaten verhindern würde, wurde sich für PEG₄₀₀₀ als Zusatz (zu 5% (v/v) Endkonzentration) für die Puffer der Aufreinigung entschieden.

Um die Aktivität des *AtUGlyAH*-Kandidaten als Ureidoglycin Aminohydrolase zu untersuchen, wurde seine ureidoglykolatproduzierende Aktivität in Gegenwart der aufgereinigten *AtAAH* und 1 mM Allantoat als Substrat überprüft.

Ähnlich dem Ergebnis der *EcUGlyAH* (Abbildung 10B) konnte auch hier eine Produktion von Ureidoglykolat beobachtet werden, wenn der *AtUGlyAH*-Kandidat der Reaktion der *AtAAH* mit Allantoat hinzugefügt wurde (Abbildung 13). Dies deutet darauf hin, dass es sich bei dem orthologen Protein aus Arabidopsis ebenso wie bei Y1bA aus *E. coli* um eine Ureidoglycin Aminohydrolase handelt.

Für die *AtUGlyAH* konnte hier durch eine polarimetrische Messung gleichermaßen gezeigt werden, dass sie *S* - (-) Ureidoglykolat produziert (Abbildung 14).

4.1.1.1.2 Der ALC – Weg

Um zu überprüfen, ob bei enzymatischen Reaktionen generell das *S* – Enantiomer des Ureidoglykolats gebildet wird, wurde auch

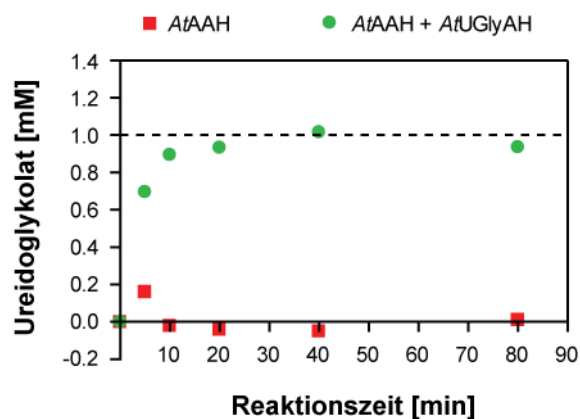


Abbildung 13 – Ureidoglykolatproduktion des *AtUGlyAH*-Kandidaten.

Bestimmung der Ureidoglykolatproduktion des *AtUGlyAH*-Kandidaten in Gegenwart der *AtAAH* und 1 mM Allantoat als Substrat. Gemessen wurde die Produktion von Ureidoglykolat mittels der differentiellen Glyoxylatanalyse. Die Quantifizierung des gebildeten Ureidoglykolats erfolgte durch einen Glyoxylatstandard im Reaktionshintergrund.

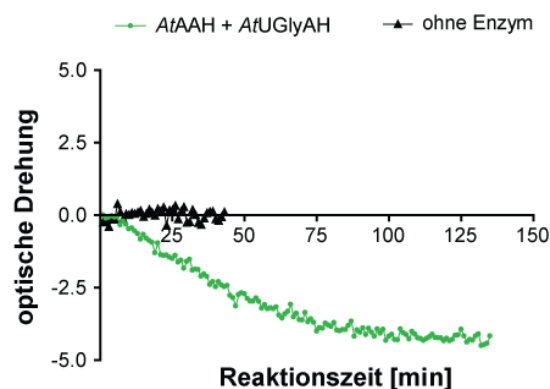


Abbildung 14 – Optische Drehung des *AtUGlyAH*-produzierten Ureidoglykolats.

Die Messung der optischen Drehung erfolgte in einem Jasco P – 1020 Polarimeter bei 589 nm während des enzymatischen Umsatzes von 28 mM Allantoat durch *AtAAH + AtUGlyAH*. Die Kontrolle erfolgte ohne Enzym.

ein allantoatabbauendes Enzym der anderen Klasse (harnstofffreisetzend) getestet. Diese Klasse an Enzymen – genannt Allantoicasen (ALC) oder Allantoat Amidinohydrolasen – verwendet Allantoat als Substrat und

hydrolysiert dieses zu Ureidoglykolat. Hierbei entsteht kein Intermediat, da die Ureidogruppe direkt als Harnstoff abgespalten wird.

Um zu zeigen, welches Enantiomer des Ureidoglykolats von einer Allantoicase produziert wird, wurde das entsprechende Gen aus *Pseudomonas syringae* DC3000 mittels PCR von der genomischen DNA amplifiziert und in einen bakteriellen Expressionsvektor unter die Kontrolle eines T7-Promotors und mit einer Sequenz zur C-terminalen His-Markierung kloniert (siehe Kapitel 3.2.1.1.2). Das Konstrukt wurde in *E. coli* BL21 überexprimiert (siehe Kapitel 3.2.2.1.1) und das Protein anhand seiner His-Markierung aufgereinigt (siehe Kapitel 3.2.2.2.1.1).

Die Allantoicase aus *Pseudomonas* konnte - wie auch die Enzyme aus *E. coli* (Abbildung 9) - erfolgreich überexprimiert, aufgereinigt und angereichert werden (Daten nicht gezeigt).

Zunächst wurde die Aktivität der aufgereinigten Allantoicase mit Allantoat als Substrat getestet (siehe Kapitel 3.2.2.5) und die Reaktionsprodukte bestimmt. Gemessen wurden hierbei Ammoniak, Harnstoff, Ureidoglykolat und Glyoxylat (siehe Kapitel 3.2.2.5.1.1 und 3.2.2.5.1.2).

Wie erwartet, setzt die Allantoicase im Gegensatz zur *AtAAH* (Abbildung 6) kein Ammoniak sondern Harnstoff aus Allantoat frei und produziert Ureidoglykolat

(Abbildung 15).

Um zu bestimmen, welches Enantiomer des Ureidoglykolats gebildet wird, wurde auch hier die optische Drehung der Reaktionsmischung während des Umsatzes

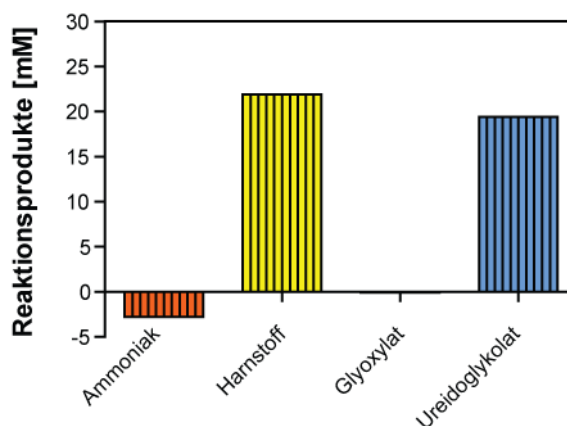


Abbildung 15 – Reaktionsprodukte der PsALC.

Bestimmung der Reaktionsprodukte nach zehnminütiger enzymatischer Reaktion von PsALC mit 30 mM Allantoat als Substrat. Gemessen wurden: Ammoniak, Harnstoff, Ureidoglykolat und Glyoxylat. Die Detektion von Ammoniak und Harnstoff (nach Umsatz mit Urease zu Ammoniak) erfolgte mittels der Berthelot-Reaktion. Ureidoglykolat und Glyoxylat wurden mit Hilfe der differentiellen Glyoxylatanalyse detektiert. Die Quantifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte durch einen entsprechenden Standard.

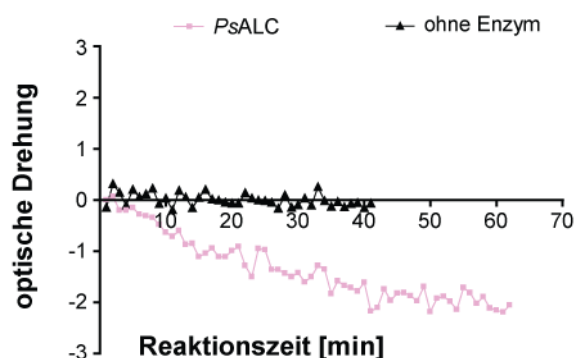


Abbildung 16 – Optische Drehung des PsALC-produzierten Ureidoglykolats.

Die Messung der optischen Drehung erfolgte in einem Jasco P – 1020 Polarimeter bei 589 nm während des enzymatischen Umsatzes von 28 mM Allantoat durch PsALC. Die Kontrolle erfolgte ohne Enzym.

von achiralem Allantoat durch *PsALC* gemessen (siehe Kapitel 3.2.2.5.2).

Es zeigte sich, dass auch dieser enzymatische Umsatz des Allantoats zur Produktion von *S* – (-) Ureidoglykolat führt (Abbildung 16).

Diese Experimente verknüpfen zum ersten Mal die genetische Identifizierung, Aufreinigung und Aktivität einer Allantoicase mit der Produktion von Harnstoff und *S* – (-) Ureidoglykolat. Darüber hinaus weist dieses Experiment nach, dass enzymatisch das *S* – Enantiomer des Ureidoglykolats generiert wird, unabhängig von der beteiligten Enzymklasse.

4.1.1.2 Vom Ureidoglykolat zum Glyoxylat

Auch für Ureidoglykolat sind zwei Klassen an katabolischen Enzymen bekannt, die (wie bei Allantoat) entweder ammoniak- oder harnstofffreisetzend sind.

Die ammoniakfreisetzenden Enzyme bezeichnet man als Ureidoglykolat Amidohydrolasen (UAHs) und die harnstofffreisetzenden Enzyme als Ureidoglykolat Urea Hydrolasen (UUHs). Bei beiden Klassen soll Glyoxylat das Endprodukt sein.

4.1.1.2.1 Der UAH – Weg

Im Rahmen zweier Diplomarbeiten wurden bereits erste Hinweise darauf gefunden, dass in Arabidopsis der Ureidoglykolat-abbau durch eine ammoniakfreisetzende UAH vermittelt wird (Werner, 2007; Przybycin, 2008). Das entsprechende Enzym wurde zusammen mit der AAH genetisch identifiziert (in Werner, 2007 noch als *AtAAH-2* bezeichnet mit bereits starken Hinweisen auf eine UAH-Funktion) und im aufgereinigten Zustand biochemisch charakterisiert (Przybycin, 2008).

Zum ersten Mal konnte eine UAH genetisch identifiziert werden und im aufgereinigten Zustand deren Aktivität gezeigt und untersucht werden (Werner *et al.*, 2010).

Es konnte bereits dargestellt werden, dass durch die UAH-Reaktion mit Ureidoglykolat Ammoniak freigesetzt wird und Glyoxylat entsteht (Przybycin, 2008). Hierbei gab es bereits erste Hinweise darauf, dass die UAH stereospezifisch nur ein Enantiomer des Ureidoglykolats umsetzt, wobei sie aus diesem wahrscheinlich zwei Mol Ammoniak freisetzt und ein Mol Glyoxylat generiert.

Um diese Daten zu validieren, wurde die Aktivität der aufgereinigten *AtUAH* (siehe Kapitel 3.2.2.2.2) zunächst mit 1 mM racemischem Ureidoglykolat untersucht (siehe Kapitel 3.2.2.5) und die dabei

entstehende Ammoniakmenge über die Zeit quantifiziert (siehe Kapitel 3.2.2.5.1.1).

Die *At*UAH setzt aus 1 mM racemischem

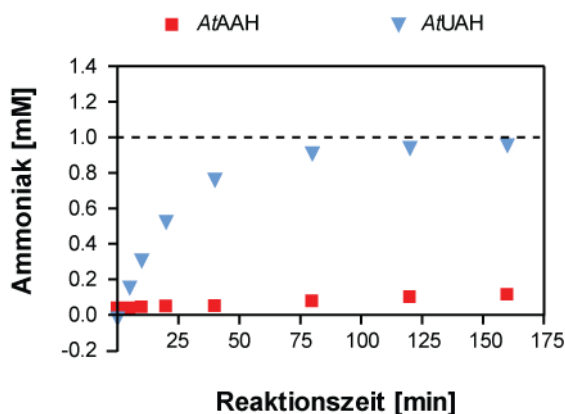


Abbildung 17 – Ammoniakproduktion der *At*UAH mit racemischem Ureidoglykolat.

Bestimmung der Ammoniakproduktion der *At*UAH mit 1 mM racemischem Ureidoglykolat als Substrat. Gemessen wurde die Produktion von Ammoniak mittels der Berthelot-Reaktion. Die Quantifizierung des gebildeten Ammoniaks erfolgte durch einen Ammoniumstandard im Reaktionshintergrund. Die Kontrolle erfolgte mit der *At*AAH.

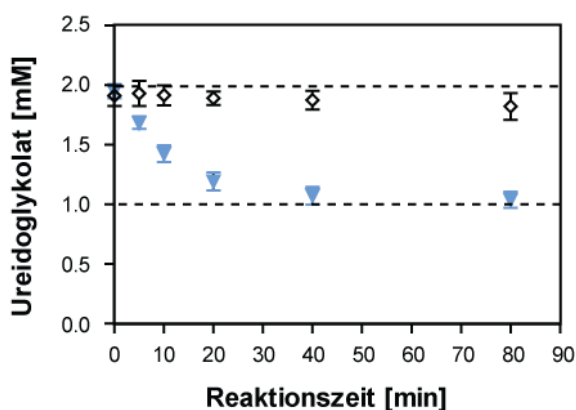


Abbildung 18 – Ureidoglykolatumsatz der *At*UAH mit racemischem Ureidoglykolat.

Bestimmung des Ureidoglykolatumsatzes der *At*UAH mit 2 mM racemischem Ureidoglykolat als Substrat. Gemessen wurde die Abnahme von Ureidoglykolat mittels der differentiellen Glyoxylatanalyse. Die Quantifizierung des Ureidoglykolats erfolgte durch einen Glyoxylatstandard im Reaktionshintergrund. Die Kontrolle erfolgte ohne Enzym. Fehlerbalken sind Standardabweichung ($n = 3$).

Ureidoglykolat 1 mM Ammoniak frei (Abbildung 17). Dies deutet entweder darauf hin, dass die UAH beide Enantiomere des Ureidoglykolats (ein Mol) umsetzt, wobei sie aus jedem nur ein Mol Ammoniak freisetzt oder alternativ, dass die UAH nur ein Enantiomer (ein halbes Mol) umsetzt und aus diesem dann zwei Mol Ammoniak freisetzt. Um zu überprüfen, ob die *At*UAH nur ein Enantiomer des Ureidoglykolats umsetzt, wurde eine Aktivitätsmessung mit 2 mM racemischen Ureidoglykolat durchgeführt (siehe Kapitel 3.2.2.5) und die Abnahme der Substratmenge über die Zeit quantifiziert (siehe Kapitel 3.2.2.5.1.2).

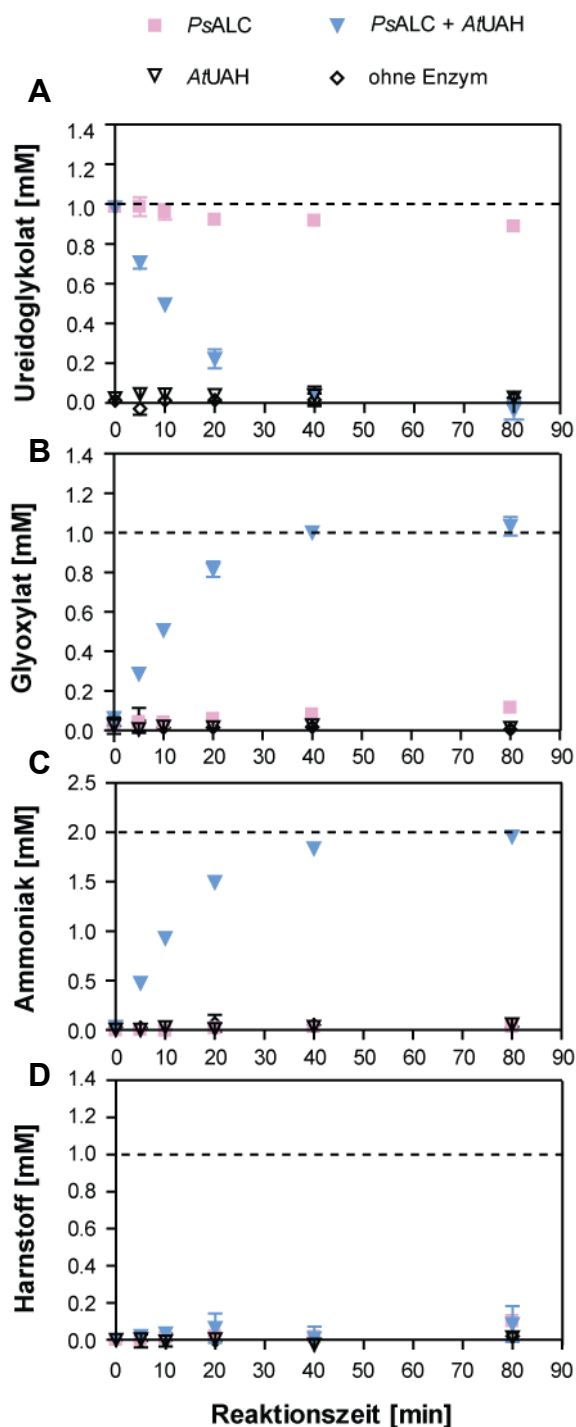
Es zeigte sich, dass die *At*UAH nur 1 mM Ureidoglykolat aus 2 mM racemischem Ureidoglykolat hydrolysiert (Abbildung 18). Somit ist sie stereospezifisch und verwendet nur ein Enantiomer des Ureidoglykolats als Substrat.

Um festzustellen, welches Enantiomer des Ureidoglykolats von der UAH verwendet wird, wurde die Allantoicase als Hilfsmittel benutzt, um in einer Vorreaktion (Daten nicht gezeigt) aus Allantoat reines *S* – (-) Ureidoglykolat (siehe Abbildung 16) zu produzieren. Dieses wurde als Substrat (1 mM) für eine anschließende UAH-Aktivitätsmessung über die Zeit verwendet (siehe Kapitel 3.2.2.5). Gemessen wurden hierbei Ammoniak, Harnstoff, Ureidoglykolat und Glyoxylat (siehe

Kapitel 3.2.2.5.1.1 und 3.2.2.5.1.2).

Es stellte sich heraus, dass die *AtUAH* das *PsALC*-produzierte *S* – (-) Ureidoglykolat vollständig hydrolysiert und äquimolar Glyoxylat daraus generiert (Abbildung 19B). Dabei entstehen 2 mM Ammoniak pro 1 mM Ureidoglykolat und kein

Harnstoff (Abbildung 19C und D). Dieses Experiment deutet zusammen mit dem Vorherigen (Abbildung 18) darauf hin, dass die *AtUAH* spezifisch nur *S* – (-) Ureidoglykolat als Substrat verwendet und aus diesem unter Ammoniakfreisetzung Glyoxylat produziert.



4.1.1.2.2 Der UUH – Weg

Im Rahmen der Untersuchung der ureidabbauenden Enzyme aus *E. coli* wurde auch hier das ureidoglykolatabbauende Enzym (AllA) betrachtet. Es gab Hinweise darauf, dass es sich bei AllA um eine harnstofffreisetzende Ureidoglykolat Urea Hydrolase (UUH) handelt. Um diese Annahme anhand des aufgereinigten Enzyms zu bestätigen, wurde eine Aktivitätsmessung mit Ureidoglykolat als Substrat durchgeführt (Kapitel 3.2.2.5) und die Produktion von Ammoniak bzw. Harnstoff (Kapitel 3.2.2.5.1.1) durch die

Abbildung 19 – Reaktionsprodukte der *AtUAH* mit *S* – (-) Ureidoglykolat.

Bestimmung der Reaktionsprodukte während der enzymatischen Reaktion von *AtUAH* mit 1 mM *PsALC*-produziertem *S* – (-) Ureidoglykolat als Substrat. Gemessen wurden: (A) Ureidoglykolat, (B) Glyoxylat, (C) Ammoniak und (D) Harnstoff. Die Detektion von Ammoniak und Harnstoff (nach Umsatz mit Urease zu Ammoniak) erfolgte mittels der Berthelot-Reaktion. Ureidoglykolat und Glyoxylat wurden mit Hilfe der differenziellen Glyoxylatanalyse detektiert. Die Quantifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte durch einen entsprechenden Standard. Die Kontrolle erfolgte ohne Enzym. Fehlerbalken sind Standardabweichung ($n = 3$).

aufgereinigte *EcUUH* (Abbildung 9) untersucht. Nach fünfundzwanzigminütiger Reaktionszeit der *EcUUH* mit Ureidoglykolat als Substrat wurde der entstandene Harnstoff mit Urease umgesetzt, um das resultierende Ammoniak in einer kolorimetrischen Reaktion sichtbar zu machen.

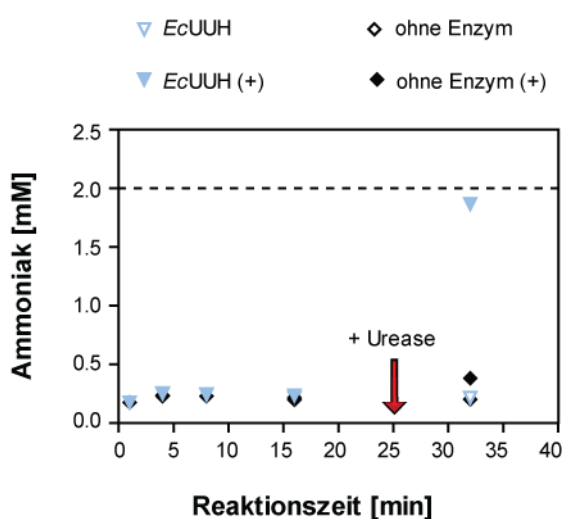


Abbildung 20 – Harnstoffproduktion der *EcUUH* mit racemischem Ureidoglykolat.

Bestimmung der Ammoniak- bzw. Harnstoffproduktion der *EcUUH* mit 2 mM racemischem Ureidoglykolat als Substrat. Gemessen wurde die Produktion von Ammoniak mittels der Berthelot-Reaktion. Der während der Reaktion entstehende Harnstoff wurde durch Zugabe von 10 mU Urease (+) zu Ammoniak umgesetzt. Die Quantifizierung des gebildeten Ammoniaks erfolgte durch einen Ammoniumstandard im Reaktionshintergrund. Die Kontrolle erfolgte ohne Enzym.

Es konnte bestätigt werden, dass es sich bei *EcAllA* um eine ureidoglykolatabbauende UUH handelt, die Harnstoff und nicht Ammoniak aus Ureidoglykolat freisetzt, da erst die Zugabe von Urease zur *EcUUH*-Reaktion zu einer Ammoniakproduktion führte (Abbildung 20). Hierbei wird

wahrscheinlich ähnlich der UAH-Reaktion auch nur ein Enantiomer des Ureidoglykolats (entspricht hier je 1 mM) als Substrat verwendet, da die freigesetzte Ammoniakmenge 2 mM beträgt, welche aus 1 mM Harnstoff freigesetzt wird. Da Harnstoff und Ureidoglykolat in dieser Reaktion in einem äquimolaren Verhältnis stehen (ein Mol Harnstoff entsteht pro einem Mol Ureidoglykolat, das abgebaut wird), kann der Rückschluss auf eine enantiomerenspezifische UUH gezogen werden, die Ureidoglykolat zu Glyoxylat unter Harnstofffreisetzung abbaut.

4.1.1.3 Der vollständige Abbau des Allantoats

Die vorherigen Experimente haben gezeigt, dass Allantoat auf zwei verschiedene Weisen zu Ureidoglykolat abgebaut werden kann. Der harnstofffreisetzende Weg wird durch Allantoicasen vermittelt und führt zur Produktion von *S*-Ureidoglykolat. Der ammoniakfreisetzende Weg wird von der AAH zunächst eingeleitet, wobei hier Hinweise auf das Entstehen von Ureidoglycin gefunden werden konnten. Zum ersten Mal konnte nachgewiesen werden, dass durch die Reaktion der AAH kein Ureidoglykolat entsteht und ein weiteres Enzym für die Synthese von Ureidoglykolat benötigt wird. Dieses Enzym konnte genetisch identifiziert

werden und seine Aktivität als ureidoglykolatproduzierende Ureidoglycin Aminohydrolase dargestellt werden. Erst durch dieses Enzym kommt es beim ammoniakfreisetzenden Abbau des Allantoats zur Produktion von Ureidoglykolat. Auch hier entsteht das *S*-Enantiomer des Ureidoglykols, was darauf hindeutet, dass Ureidoglykolat in lebenden Systemen generell als *S*-Enantiomer generiert wird. Darüber hinaus konnte dargelegt werden, dass auch Ureidoglykolat über ein Harnstoffintermediat oder ohne Harnstofffreisetzung abgebaut werden kann. Der harnstofffreisetzende Weg wird durch UUHs vermittelt und der ammoniakfreisetzende Weg durch UAHs. Für die UAHs konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass sie stereospezifisch nur *S*-Ureidoglykolat als Substrat verwenden. Diese Experimente und die folgenden zeigen zum ersten Mal die jeweiligen enzymatischen Aktivitäten im Ureidabbau mit aufgereinigten Enzymen.

Da sowohl die allantoatabbauenden und ureidoglykolatproduzierenden als auch die ureidoglykolatabbauenden und glyoxylatproduzierenden Enzyme des Stoffwechselweges identifiziert und charakterisiert wurden, sollte nun untersucht werden, ob diese zusammen *in vitro* in der Lage sind, Allantoat vollständig

zu Glyoxylat zu katabolisieren. Es sollte überprüft werden, ob die Reaktionen des Stoffwechselweges komplett durch diese Enzyme katalysiert werden können.

4.1.1.3.1 Der Allantoatabbau in *E. coli*

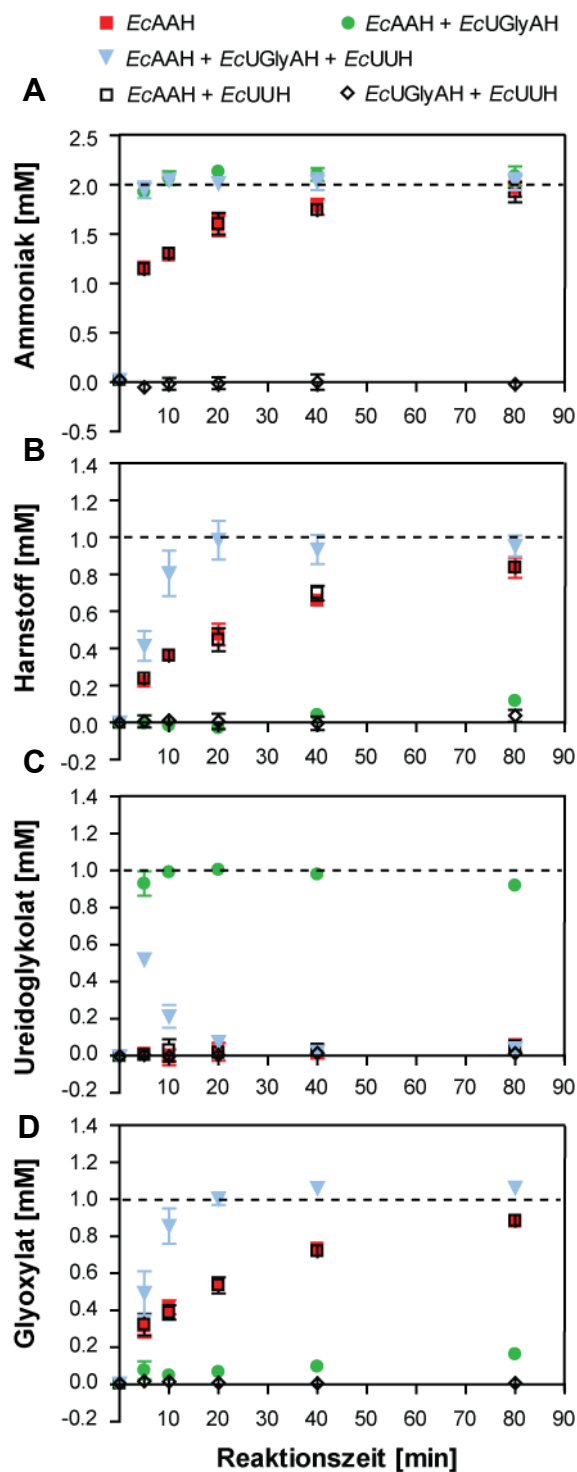


Abbildung 21 – Allantoatabbau durch die Enzyme aus *E. coli*.

Bestimmung der Reaktionsprodukte während der enzymatischen Reaktion der *EcAAH*, *EcUGlyAH* und *EcUUH* mit 1 mM Allantoat als Substrat. Gemessen wurden: (A) Ammoniak, (B) Harnstoff, (C) Ureidoglykolat und (D) Glyoxylat. Die Detektion von Ammoniak und Harnstoff (nach Umsatz mit Urease zu Ammoniak) erfolgte mittels der Berthelot-Reaktion. Ureidoglykolat und Glyoxylat wurden mit Hilfe der differenziellen Glyoxylatanalyse detektiert. Die Quantifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte durch einen entsprechenden Standard. Fehlerbalken sind SD (n = 3).

Um zu untersuchen, ob die AAH, die UGlyAH und die UUH ausreichen, um in *E. coli* Allantoat vollständig zu Glyoxylat umzusetzen, wurde eine Aktivitätsmessung mit allen Enzymen und Allantoat als Substrat durchgeführt. Hierbei wurden die Reaktionsprodukte Ammoniak, Harnstoff, Ureidoglykolat und Glyoxylat über die Reaktionszeit bestimmt.

Die *EcAAH* baut 1 mM Allantoat ab, wobei sie 1 mM Ammoniak abspaltet und höchstwahrscheinlich 1 mM Ureidoglycin produziert. Dieses ist sehr instabil und zerfällt zu 1 mM Ammoniak, 1 mM Harnstoff und 1 mM Glyoxylat. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, dass das erste mM Ammoniak aus Allantoat sehr schnell freigesetzt wird (innerhalb der ersten fünf Minuten), wohingegen die Freisetzung des zweiten mM Ammoniak, sowie die Entstehung von 1 mM Harnstoff und 1 mM Glyoxylat bis zum Reaktionsende andauert (Abbildung 21A, B & D). Dies deutet auf einen

schnellen ersten enzymkatalysierten Schritt und einen zweiten unkatalysierten Zerfallsschritt hin. Der Zusatz der *EcUUH* zur *EcAAH*-Reaktion führt zum gleichen Ergebnis, da die UUH in dieser Reaktion ohne Substrat (Ureidoglykolat) bleibt und somit keinen Einfluss auf die Reaktion nimmt. Fügt man allerdings die *EcUGlyAH* zur *EcAAH*-Reaktion hinzu, kommt es sogar zur Freisetzung beider mM Ammoniak innerhalb der ersten fünf Minuten (Abbildung 21A). Das zeigt, dass die *EcUGlyAH* die Freisetzung des zweiten mM Ammoniak enzymatisch katalysiert. Außerdem entsteht nur im Zusammenspiel dieser beiden Enzyme Ureidoglykolat (Abbildung 21C) und die Bildung der Zerfallsprodukte Glyoxylat und Harnstoff wird verhindert (Abbildung 21B & D). Setzt man alle drei Enzyme zusammen in eine Reaktion mit 1 mM Allantoat ein, werden zunächst durch die *EcAAH* und die *EcUGlyAH* 2 mM Ammoniak abgespalten und 1 mM Ureidoglykolat produziert (Abbildung 21A & C). Dieses akkumuliert aufgrund der Reaktionsgeschwindigkeit dieser beiden ersten Enzyme vorübergehend leicht in der Reaktionsmischung, wird dann aber innerhalb der ersten zwanzig Minuten vollständig von der *EcUUH* zu 1 mM Harnstoff und 1 mM Glyoxylat umgesetzt (Abbildung 21B & C). Die gesteigerte Geschwindigkeit der Harnstoff- und Glyoxylatfreisetzung lässt auch hier auf

eine enzymkatalysierte Reaktion schließen. Somit kann man sagen, dass in *E. coli* durch diese drei Enzyme Allantoat vollständig abgebaut werden kann, wobei hier der Stickstoff aus 1 Mol Allantoat in Form von zwei Mol Ammoniak und einem Mol Harnstoff freigesetzt wird und ein Mol Glyoxylat entsteht.

4.1.1.3.2 Der Allantoatabbau in *Arabidopsis thaliana*

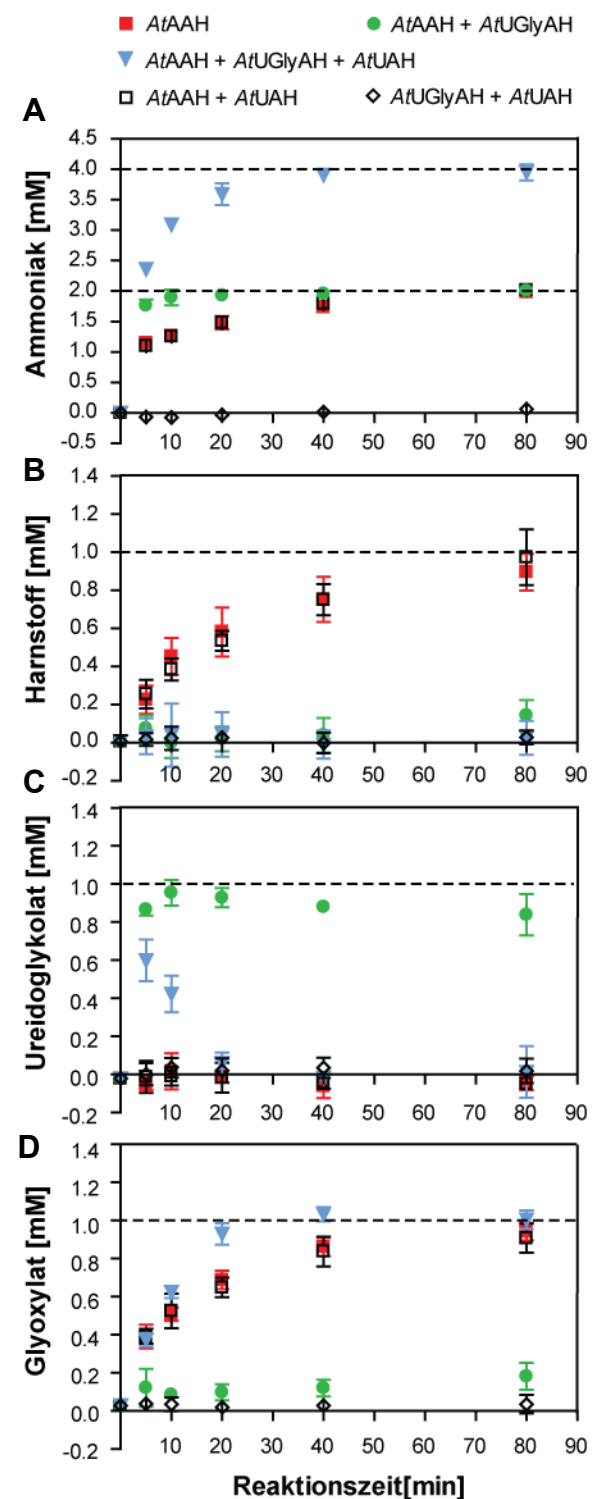
Die Ergebnisse aus den Experimenten mit den Enzymen aus *Arabidopsis* deuteten an, dass der vollständige Abbau des Allantoats auch hier wahrscheinlich durch das Zusammenspiel dieser drei Enzyme katalysiert wird. Analog zu den Experimenten für die Enzyme aus *E. coli* wurden auch für die pflanzlichen Enzyme kombinierte Enzymmessungen durchgeführt, bei denen die Reaktionsprodukte über die Zeit bestimmt wurden.

Es zeigte sich, dass die *AtAAH* sehr schnell 1 mM Ammoniak aus 1 mM Allantoat

Abbildung 22 – Allantoatabbau durch die Enzyme aus *Arabidopsis thaliana*.

Bestimmung der Reaktionsprodukte während der enzymatischen Reaktion der *AtAAH*, *AtUGlyAH* und *AtUAH* mit 1 mM Allantoat als Substrat. Gemessen wurden: (A) Ammoniak, (B) Harnstoff, (C) Ureidoglykolat und (D) Glyoxylat. Die Detektion von Ammoniak und Harnstoff (nach Umsatz mit Urease zu Ammoniak) erfolgte mittels der Berthelot-Reaktion. Ureidoglykolat und Glyoxylat wurden mit Hilfe der differentiellen Glyoxylatanalyse detektiert. Die Quantifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte durch einen entsprechenden Standard. Fehlerbalken sind SD (n = 3).

freisetzt und das mögliche Intermediat Ureidoglycin dann langsamer zu einem weiteren mM Ammoniak, 1 mM Harnstoff und 1 mM Glyoxylat zerfällt (Abbildung 22A, B & D). Der Zusatz der ureidoglykolatabbauenden *AtUAH*



beeinflusst die AAH-Reaktion nicht, wohingegen der Zusatz der AtUGlyAH sowohl die Ammoniakfreisetzung aus Allantoat beschleunigt als auch zur Produktion von Ureidoglykolat führt (Abbildung 22A & C). Dieses Ureidoglykolat wird in der Drei-Enzym-Reaktion in Gegenwart der AtUAH von dieser als Substrat verwendet, um weitere 2 mM Ammoniak und 1 mM Glyoxylat zu generieren (Abbildung 22A & D). Nur durch die Aktivität aller drei Enzyme wird der Purinringstickstoff aus Allantoat vollständig als Ammoniak freigesetzt. Dies weist darauf hin, dass alle drei Enzyme aus *Arabidopsis thaliana* nötig und ausreichend sind, um Allantoat komplett zu hydrolysieren. Hierbei wird der gesamte Stickstoff (vier Mol) aus 1 Mol Allantoat als Ammoniak freigesetzt und Glyoxylat entsteht.

4.2 Der Ureidabbau in *Arabidopsis thaliana*

Im vorherigen Kapitel wurden die enzymatischen Aktivitäten der Proteine aus *Arabidopsis thaliana* dargestellt. Diese *in vitro* Aktivitäten sollen im Folgenden zweifelsfrei belegt werden. Darüber hinaus soll die *in vivo* Funktion und Relevanz dieser Enzyme in *Arabidopsis thaliana* untersucht werden. Es soll herausgefunden

werden, ob die gemessenen *in vitro* Aktivitäten der Enzyme auch ihrer *in vivo* Funktionen entsprechen können und in wie fern sie dabei relevant sind.

Da zum Abbau der Ureide auch der Abbau des Allantoins gehört, soll dieser im Folgenden mit betrachtet werden. Das allantoinabbauende Enzym Allantoinase (ALN) wurde bereits zu Beginn des Projektes in *Arabidopsis thaliana* identifiziert und sein Gen in verschiedene Expressionsvektoren kloniert (Werner *et al.*, 2008). Biochemische Analysen wurden bisher nicht durchgeführt, allerdings seine *in vivo* Relevanz in *Arabidopsis* mittels T-DNA-Insertionslinien gezeigt (Yang und Han, 2004; Werner *et al.*, 2008).

4.2.1 Die beteiligten Enzyme

Um die normalerweise verwendete kolorimetrische Bestimmung der Reaktionsprodukte (Allantoin, Allantoat, Ureidoglykolat und Glyoxylat) zu validieren, wurden die Reaktionsprodukte der Enzyme im folgenden Experiment mittels NMR-Spektroskopie detektiert. Hier sollte auch die Bildung von Ureidoglycin bestätigt werden. wurde eine Aktivitätsmessung mit allen vier Enzymen aus *Arabidopsis* (ALN, Es AAH, UGlyAH und UAH) und 2 mM racemischem ¹³C-¹⁵N-Allantoin als Substrat durchgeführt.

Nach zweistündiger Reaktionszeit der Enzyme mit diesem Substrat wurde das

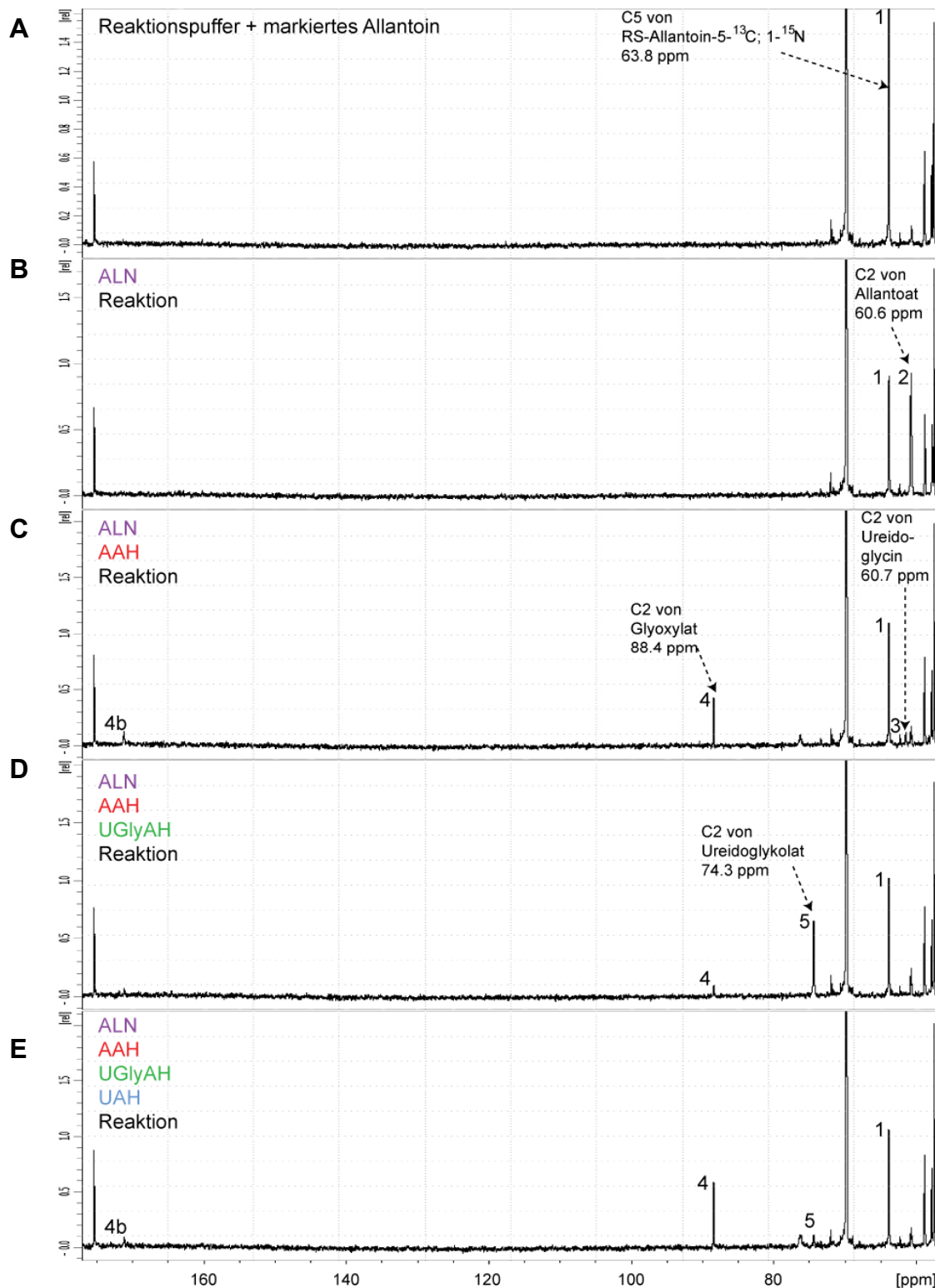


Abbildung 23 – ^{13}C -NMR-Analyse des vollständigen Ureidabbaus durch die Enzyme aus *A. thaliana*.

NMR-Signal (A) des Reaktionspuffers mit 2 mM racemischem ^{13}C - ^{15}N -Allantoin (1), (B) wie (A) nach zweistündiger Reaktion mit AtALN, (C) wie (B) mit zusätzlicher AtAAH, (D) wie (C) mit zusätzlicher AtUGlyAH und (E) wie (D) mit zusätzlicher AtUAH. (2) – (5): markiertes C2-Atom des Allantoats (2), des Ureidoglycins (3), des Glyoxylats (4) und des Ureidoglykolats (5). Die Identifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte durch einen entsprechenden Standard der jeweiligen Reinsubstanz im Reaktionshintergrund. Die NMR-Analyse und -Auswertung wurde von Dr. Schäfer durchgeführt.

Reaktionsgemisch in flüssigem Stickstoff eingefroren. Kurz nach dem Auftauen wurden die Proben dann mittels NMR-Spektroskopie vermessen. Als Standard dienten hier jeweils 20 mM der unmarkierten Reinsubstanz (für Allantoat, Ureidoglykolat und Glyoxylat).

Die NMR-Spektroskopie und deren Auswertung wurden hierbei von Dr. Schäfer in der Organischen Chemie durchgeführt.

Die *AtALN* setzt die Hälfte des racemischen Allantoins (entspricht 1 mM) zu Allantoat um. Aus diesem Grund können in der ALN-Reaktion sowohl das verbleibende Enantiomer des Allantoins als auch das gebildete Allantoat detektiert werden (Abbildung 23B 1 & 2). Das von der *AtALN* gebildete Allantoat wird von der *AtAAH* als Substrat verwendet, um aus diesem Ureidoglycin zu produzieren. Da dieses schnell zerfällt, ist nach zweistündiger Reaktionszeit nur noch ein kleiner Peak von Ureidoglycin detektierbar (Abbildung 23C 3). Allerdings ist dies der erste direkte Nachweis von Ureidoglycin überhaupt. Das gebildete Ureidoglycin zerfällt ohne weiteren enzymatischen Umsatz zu Glyoxylat (Abbildung 23C 4). Dieser Zerfall wird durch die Reaktion der *AtUGlyAH* verhindert (Abbildung 23 D), wobei sie aus Ureidoglycin Ureidoglykolat produziert (Abbildung 23D 5). Dieses Ureidoglykolat wird wiederum von der

AtUAH als Substrat verwendet und zu Glyoxylat (Abbildung 23E 4) abgebaut.

Dieses Experiment weist zum einen die Reaktionsprodukte der jeweiligen Enzyme direkt nach und belegt hierbei die Bildung von Ureidoglycin und zeigt zum anderen, dass Allantoin durch die aufeinanderfolgenden Aktivitäten dieser vier Enzyme aus *Arabidopsis thaliana* vollständig zu Glyoxylat abgebaut werden kann.

Für eine weiterführende biochemische Charakterisierung der ureidabbauenden Enzyme aus *Arabidopsis*, wurden ihre enzymkinetischen Parameter bestimmt. Dies war für die *AtUGlyAH* nicht möglich, da Ureidoglycin als Substrat zu instabil für eine derartige Analyse ist. Es wurden sechs verschiedene Substratkonzentrationen pro Enzym eingesetzt und die Reaktionsgeschwindigkeiten jeweils dreifach bestimmt.

Tabelle 14: die enzymkinetischen Parameter der ureidabbauenden Enzyme aus *Arabidopsis thaliana*

	K_m μM	spezif. Aktivität $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$	k_{cat} s^{-1}	katalyt. Effizienz $(\text{s}\cdot\text{M})^{-1}$
<i>AtALN</i>	5472,0	973,3	879,7	$1,61 \cdot 10^5$
<i>AtAAH</i>	54,7	62,7	55,5	$1,01 \cdot 10^6$
<i>AtUAH</i>	24,8	17,0	14,5	$5,85 \cdot 10^5$

Wie in Tabelle 14 dargestellt ist, scheinen die Enzyme in ihrer Aktivität unterschiedlich reguliert zu sein. Die *AtALN* benötigt eine etwa hundertfach höhere Substratkonzentration, um halbmaximale Geschwindigkeit zu

erreichen im Vergleich zur *AtAAH*. Allerdings ist sie auch etwa sechzehnmal so schnell in ihrer Produktbildung wie die *AtAAH*. Dies führt dazu, dass die *AtAAH* sechsmal so effizient ist wie die *AtALN*. Die *AtUAH* hingegen benötigt etwa nur die Hälfte der Substratkonzentration der *AtAAH*, ist dafür aber viermal langsamer in ihrer Produktbildung und somit nur halb so effizient.

4.2.2 Subzelluläre Lokalisation

Um herauszufinden in welchem Kompartiment der Ureidabbau in der Zelle stattfindet, wurden die beteiligten Enzyme subzellulär lokalisiert.

In Kooperation mit Dr. Imogen Sparkes konnte für die *AtALN* und *AtAAH* bereits

gezeigt werden, dass sie hauptsächlich im ER lokalisiert sind (Werner *et al.*, 2008). Auch die *AtUAH* wurde in diesem Zusammenhang im ER lokalisiert (Daten unveröffentlicht).

Da für die Suche nach der *AtUGlyAH* das Vorhandensein einer potenziellen ER-Zielsequenz ein Ausschlusskriterium war und die *AtUGlyAH* eine solche besitzt (Werner *et al.*, 2010), sollte nun überprüft werden, ob sie auch tatsächlich so wie die anderen Enzyme des Ureidabbaus im ER lokalisiert ist.

Hierfür wurde das entsprechende Gen der *AtUGlyAH* in einen pflanzlichen Expressionsvektor unter die Kontrolle eines 35S-Promotors und mit einer Sequenz zur C-terminalen YFP-Markierung kloniert (siehe Kapitel 3.2.1.1.1). Nach der

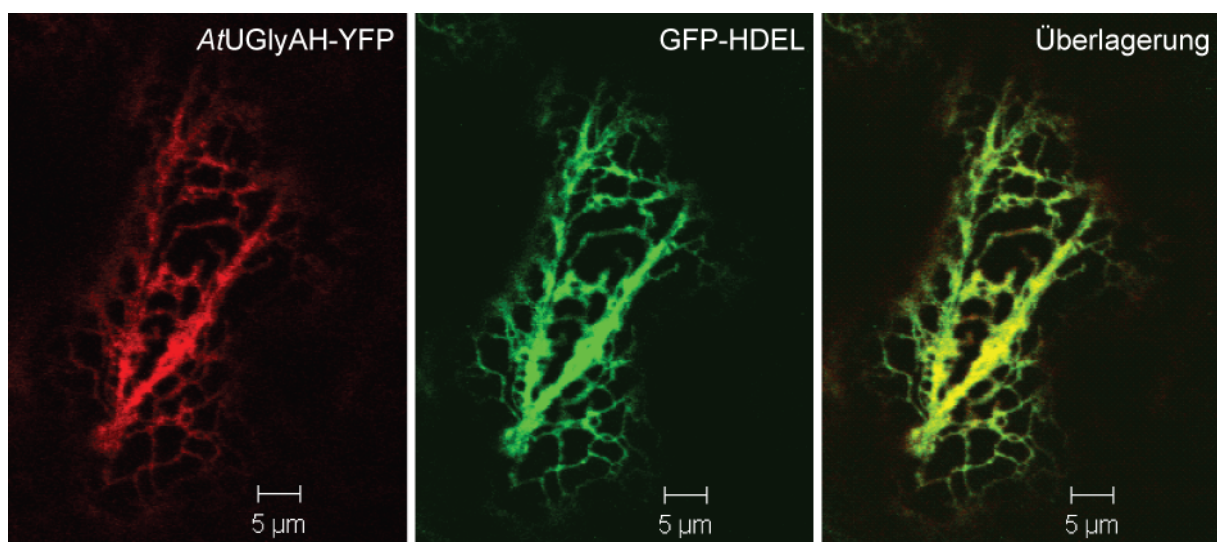


Abbildung 24 – Subzelluläre Lokalisation von *AtUGlyAH* in *Nicotiana tabacum*.

AtUGlyAH-YFP wurde zusammen mit dem ER-Marker GFP-HDEL transient in Blattepidermiszellen von *Nicotiana tabacum* überexprimiert. Die Bilder wurden mit Hilfe eines konfokalen Mikroskops erstellt. Die transiente Ko-Expression und konfokale Mikroskopie wurde von Dr. Sparkes durchgeführt.

Transformation von Agrobakterien mit diesem Konstrukt (siehe Kapitel 3.2.1.2.1.2), wurden diese für eine transiente Überexpression zu Dr. Sparkes geschickt, die im Zuge unserer Kooperation auch für die *AtUGlyAH* die subzelluläre Lokalisation untersuchte. Es wurden hierfür *Nicotiana tabacum* Pflanzen verwendet, die sowohl das zu lokalisierende Protein *AtUGlyAH*-YFP als auch jeweils einen Organellenmarker transient überexprimierten.

Es konnte experimentell bestätigt werden, dass auch die *AtUGlyAH* hauptsächlich im ER lokalisiert ist, da das YFP-Konstrukt dieses Proteins mit dem ER-Marker GFP-HDEL ko-lokalisiert (Abbildung 24 Überlagerung).

Darüber hinaus wurden stabil exprimierende Arabidopsislinien mit diesem Konstrukt hergestellt (siehe Kapitel 3.2.1.2.2.2), um die Ergebnisse aus dem heterologen Expressionssystem zu bestätigen.

Auch hier kann sowohl in Blättern als auch in Wurzeln von *Arabidopsis thaliana* ein Expressionsmuster erkannt werden, dass auf eine ER-Lokalisation der *AtUGlyAH* hindeutet (Abbildung 25).

Somit konnte für alle ureidabbauenden Enzyme in *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden, dass sie hauptsächlich im ER lokalisiert sind. Das bedeutet, dass die letzten Schritte des Purinabbaus, in denen

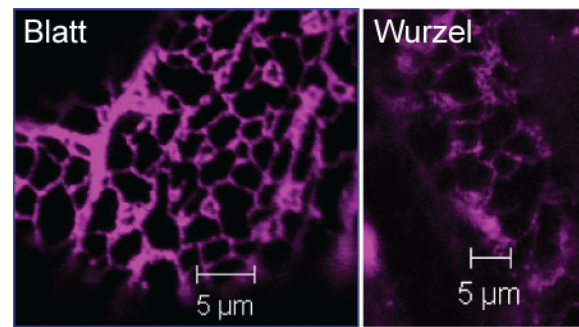


Abbildung 25 – Subzelluläre Lokalisation von *AtUGlyAH* in *Arabidopsis thaliana*.

AtUGlyAH-YFP-überexprimierten Arabidopsislinien wurden für eine Lokalisationsstudie im homologen System verwendet. Die Detektion des markierten Proteins erfolgte mittels konfokaler Mikroskopie, welche von Dr. Sparkes durchgeführt wurde.

der Ringstickstoff als Ammoniak freigesetzt wird, im ER der Pflanzenzelle stattfinden.

4.2.3 Komplexbildung der Enzyme

Da zum einen gezeigt werden konnte, dass alle ureidabbauenden Enzyme im ER lokalisiert sind und zum anderen, dass während des Allantoatabbaus instabile Reaktionsintermediate entstehen, sollte nun untersucht werden, ob die Enzyme möglicherweise einen Komplex bilden, in welchem der gesamte oder auch nur ein Teil des Allantoatabbaus katalysiert wird. Dies wäre aufgrund ihrer gemeinsamen Lokalisation möglich und würde die Gesamtabbaugeschwindigkeit der Ureide erhöhen. Hierbei könnten zusätzlich unkatalysierte Zerfallsreaktionen instabiler Intermediate vermieden werden, wenn die

Produkte von Enzym zu Enzym weitergeben werden (*substrate channeling*). Um zu untersuchen, ob diese Enzyme in der Lage sind, miteinander zu interagieren, wurde eine Koimmunopräzipitationsanalyse durchgeführt. Hierbei wurden die Enzyme paarweise transient in *Nicotiana benthamiana* koexprimiert (siehe Kapitel 3.2.1..2.2.1), wobei jeweils ein Enzym eine StrepII-Markierung trug und das andere

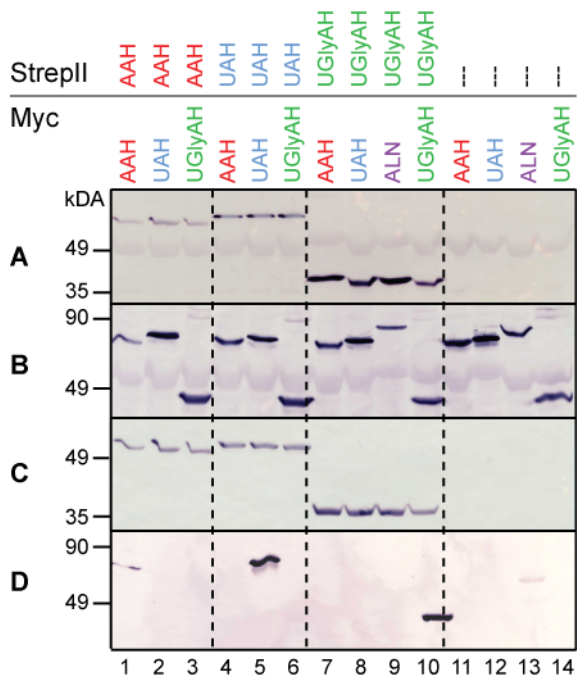


Abbildung 26 - Interaktionsstudie der Enzyme aus *Arabidopsis thaliana*.

StrepII- (A) und Myc- (B) markierte Arabidopsis Enzyme wurden paarweise transient in *Nicotiana benthamiana* koexprimiert. Die Aufreinigung des Komplexes erfolgte mittels StrepII-Affinitätschromatographie (C). Die Fähigkeit der koexprimierten Enzyme zur Komplexbildung wurde anhand des Myc-Signals in der Aufreinigung (D) visualisiert. Die Kontrollen erfolgten ohne Expression StrepII-markierter Proteine. Die Analyse wurde mittels Western Blot unter Verwendung von StrepTactin-AP Konjugat zur Detektion der StrepII-markierten Enzyme bzw. mittels Anti-c-Myc- und Anti-Maus-AP-Antikörper zur Detektion der Myc-Markierung durchgeführt.

Enzym eine Myc-Markierung. Mittels der StrepII-Markierung des einen Proteins wurde der mögliche Komplex aufgereinigt (siehe Kapitel 3.2.2.2.2) und mittels der Myc-Markierung des anderen Proteins der Komplex auf einem Western Blot detektiert (siehe Kapitel 3.2.2.4.3).

Anhand dieses Experimentes kann eine starke Interaktion zwischen den allantoatabbauenden Enzymen ausgeschlossen werden. Die jeweiligen Enzyme interagieren in allen Fällen mit sich selbst (Abbildung 26D 1, 5 & 10), wobei sie wahrscheinlich Homodimere oder andere Homomultimere bilden.

Für die *AtAAH* (Werner *et al.*, 2008) und *AtUAH* (laborinterne Daten) konnte eine dimere Form des jeweiligen Enzyms bereits nachgewiesen werden. Es kommt zu keiner Interaktion untereinander (weder als Heteromer noch als Komplex), da in keiner aufgereinigten Probe zwei unterschiedliche Proteine detektiert werden konnten (Abbildung 26C & D, 2 - 4 & 6 - 9). Auch nach Verwendung modifizierter Aufreinigungspuffer (mit z.B. weniger NaCl, wenig bis kein Triton, mit und ohne PEG und mit weniger DTT) konnte kein Hinweis auf eine Interaktion der allantoatabbauenden Enzyme gefunden werden. Somit kann zwar nicht ausgeschlossen werden, dass der Allantoat-abbau in einer Art Enzymkomplex stattfindet, allerdings wäre die Bindung der

Enzyme untereinander eher schwach oder es gibt *in vivo* eine Komponente, die ihnen die Komplexbildung ermöglicht.

4.2.4 *In vivo* Funktion und Relevanz der Enzyme

Da für die *AtALN*, *AtAAH*, *AtUGlyAH* und *AtUAH* mit *in vitro* Experimenten gezeigt werden konnte, dass sie zusammen in der Lage sind, den vollständigen Ureidabbau zu katalysieren, sollte nun überprüft werden, ob sie diese Funktion auch *in vivo* in *Arabidopsis thaliana* besitzen könnten und in wie fern sie dabei relevant sind. Die *AtUGlyAH* konnte bei diesen Experimenten nicht analysiert werden, da eine entsprechende T-DNA Insertionslinie nicht verfügbar ist.

Für die anderen drei Enzyme wurden zwei verschiedene Experimente mit den entsprechenden Enzymverlustmutanten und deren Komplementationslinien durchgeführt. Es sollte untersucht werden, in welchem Umfang sich der Verlust dieser Enzyme auf den Ureidabbau in *Arabidopsis thaliana* auswirkt.

4.2.4.1 Phänotypenanalyse

Im ersten Experiment sollte überprüft werden, ob der Verlust der einzelnen Enzyme sich auf die Fähigkeit von

Arabidopsis auswirkt, Ureide als einzige Stickstoffquelle zu verwenden.

Zu diesem Zweck wurde das Wachstum der verschiedenen Mutanten und ihrer Komplementationslinien (Tabelle 6) auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit Allantoin als einziger Stickstoffquelle (Tabelle 1) untersucht (siehe Kapitel 3.2.3.2).

Ureide sind generell keine gute Stickstoffquelle für *Arabidopsis* (Desimone *et al.*, 2002; Werner *et al.*, 2008), weswegen selbst der Wildtyp nach sechswöchigem Wachstum verhältnismäßig klein und leicht chlorotisch ist (Abbildung 27A). Der Verlust der *AtALN* (Abbildung 27B) oder der *AtAAH* (Abbildung 27C) führt zu einer kompletten Unfähigkeit von *Arabidopsis*, Allantoin als einzige Stickstoffquelle zu nutzen. Die Pflanzen keimen zwar aufgrund ihrer Stickstoffreserven im Samen, allerdings können die Pflanzen die angebotene Stickstoffquelle im Medium nicht nutzen, weswegen sie in ihrem weiteren Wachstum verhindert sind und letztendlich sterben. Der Verlust der *AtUAH* (Abbildung 27E) führt nicht zu so einem drastischen Phänotyp, jedoch ist das Wachstum der Mutante vermindert im Vergleich zum Wildtyp (Abbildung 27A). Die *Ature* (Abbildung 27G) zeigt keinen phänotypischen Unterschied im Vergleich zum Wildtyp, obgleich der Verlust der Urease einen zusätzlichen Effekt auf den *AtUAH*-Verlust hat, da die Pflanzen der

Kreuzung (Abbildung 27F) insgesamt wesentlich kleiner sind als beim *AtUAH*-Verlust allein (Abbildung 27E). Kreuzungslinien der *Atuah* oder der *Ature* mit der *Ataah* (Abbildung 27D & L) zeigen den Phänotyp der *Ataah*, da die AAH im Stoffwechselweg vor der UAH liegt bzw. die *Ataah* die stärkere Form des Phänotyps in Bezug auf die *Ature* aufweist. Die Komplementationslinien der jeweiligen Enzymverlustmutanten, welche die entsprechenden StrepII-markierten Enzyme exprimieren (Abbildung 27H, I & K), zeigen eine Reversion des Mutantphenotypes zurück zum Wildtypphänotyp oder sogar darüber hinaus, da diese Pflanzen größer und weniger chlorotisch aussehen als der Wildtyp. Nur im Fall der Komplementation der *Ataah* mit ΔN -*AtAAH-StrepII* (Abbildung 27J) kommt es zu einer nur teilweisen Abmilderung des Phänotyps im Vergleich zur Komplementation mit der vollständigen *AtAAH-StrepII* (Abbildung 27I).

Dieses Experiment weist bereits darauf hin, dass die *in vitro* Funktion der Enzyme auch ihrer *in vivo* Funktion entsprechen könnte. Darüber hinaus zeigt es, dass diese Enzyme die einzigen oder zumindest die Hauptenzyme sind, die den Ureidabbau in *Arabidopsis* katalysieren und damit für den Ureidabbau *in vivo* relevant sind. Dieses Experiment bestätigt frühere Ergebnisse bzw. Vordaten, die für die ALN, AAH und

UAH in *Arabidopsis* erhalten wurden (Yang und Han, 2004; Todd und Polacco, 2006; Werner, 2007; Przybycin, 2008; Werner *et al.*, 2008). Der Verlust der *AtALN* oder *AtAAH* führt wahrscheinlich deshalb zum vollständigen Unvermögen, Allantoin als einzige Stickstoffquelle zu nutzen, da beide Enzyme benötigt werden, um zum Einen Allantoin zu Allantoat umzusetzen und zum Anderen aus Allantoat Ammoniak freizusetzen. Ist aus Allantoin zunächst Allantoat und danach auch Ureidoglykolat entstanden, führt der Verlust des ureidoglykolatabbauenden Enzymes *AtUAH* dazu, dass nur noch die Hälfte (zwei Mol) des bereitgestellten Stickstoffs aus Allantoin (vier Mol) durch die *AtALN*, *AtAAH* und *AtUGlyAH* freigesetzt werden kann. Der Verlust der Urease führt allein zu keiner phänotypischen Veränderung, was darauf hindeutet, dass dieses Enzym nicht am Ureidabbau beteiligt ist. Allerdings kann man sehen, dass die *AtUAH*-Mutante auch aus dem Zerfall des Ureidoglykolats zu Harnstoff und Glyoxylat noch Stickstoff mit Hilfe der Urease gewinnt, da ihr Verlust den *Atuah*-Phänotyp noch verstärkt. Die Komplementationslinien zeigen nicht nur eine Wiederherstellung des Wildtypphänotyps, sondern vielleicht sogar eine verbesserte Fähigkeit, aus Ureiden Stickstoff zu gewinnen, da eine Überexpression der einzelnen Enzyme

wahrscheinlich den gesamten Abbau positiv beeinflusst. Die Komplementation der *AtAAH*-Mutante mit der ΔN -*AtAAH*-

StreptII, welche zu einem zytosolischen Protein führt (Werner *et al.*, 2008), bewirkt eine partielle Wiederherstellung der

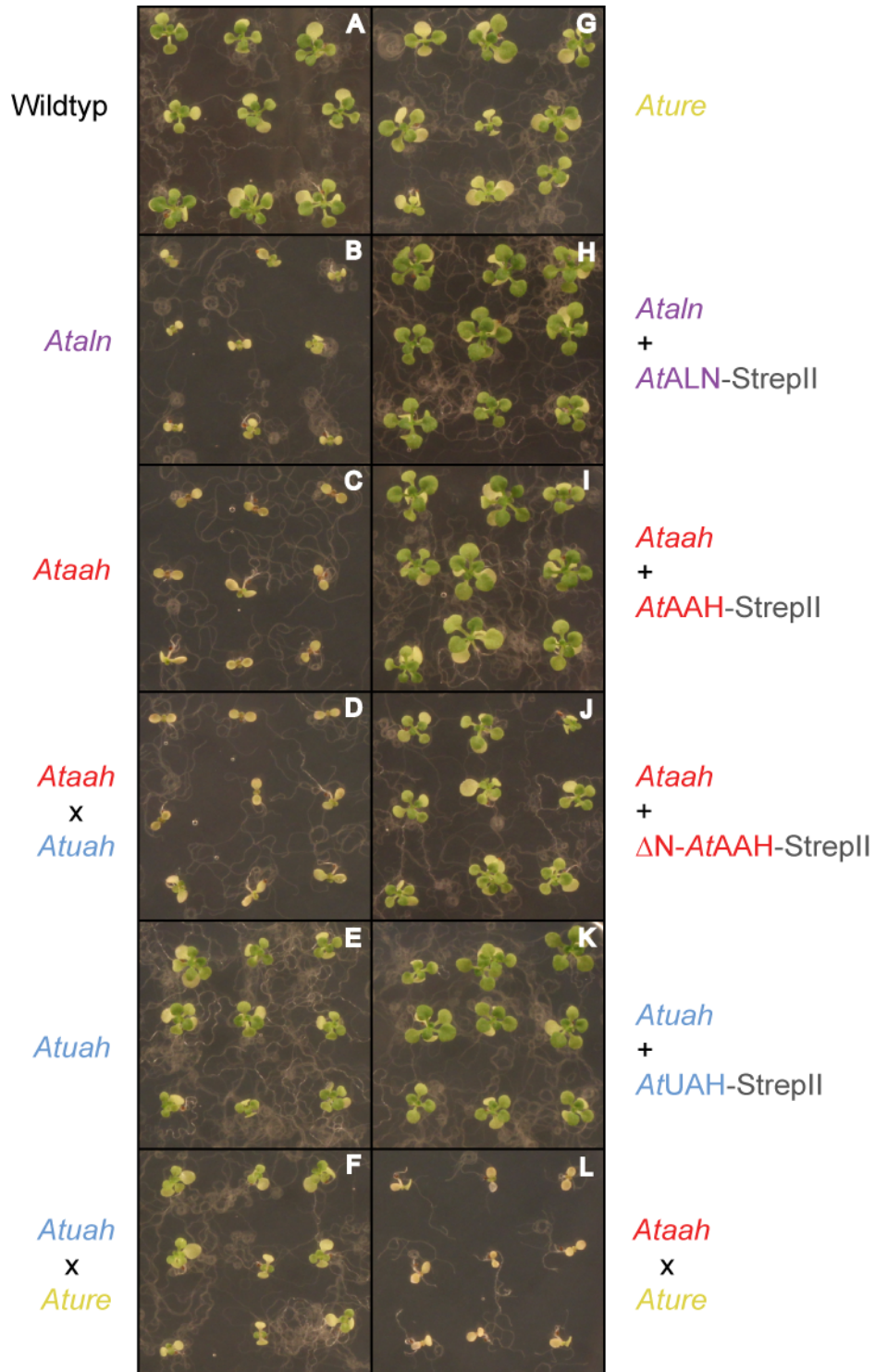


Abbildung 27 – Phänotypenanalyse mit Allantoin als einziger Stickstoffquelle.

Verlustmutanten ureidabbauender Enzyme (B - F, L) sowie der Urease (F, G, L), entsprechende Komplementationslinien (H - K) und der Wildtyp (A) wurden auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit 10 mM Allantoin als einziger Stickstoffquelle untersucht. Nach sechswöchigem Wachstum unter Langtagbedingungen wurden die Pflanzen fotografiert.

Nutzbarkeit von Allantoin als Stickstoffquelle. Dies ist möglich, wenn Allantoat aus dem ER teilweise ins Zytosol gelangt und dort nach der AAH-Reaktion das Ureidoglycin zu Glyoxylat, Ammoniak und Harnstoff zerfällt, welcher dann durch die zytosolische Urease für die Pflanze nutzbar gemacht werden kann.

Um diese Beobachtung der Phänotypen zu validieren, wurden von den in Abbildung 27 ausschnittsweise dargestellten $\frac{1}{2}$ MS-Platten mit Allantoin je Linie viermal je zehn Pflanzen geerntet und das Frischgewicht, das Trockengewicht und der Proteingehalt bestimmt. Da die Bestimmung des Trockengewichtes aus messtechnischen Gründen genauer ist und das Trockengewicht auch die tatsächliche Biomasse besser widerspiegelt als das Frischgewicht, sind im Folgenden nur die Werte bezogen auf das Trockengewicht dargestellt.

Übereinstimmend mit den beobachteten Phänotypen (Abbildung 27) zeigt auch die Analyse des Trockengewichtes (Abbildung 28) dieser Linien, dass der Verlust der *AtALN* oder *AtAAH* zu einer drastischen Reduktion des Trockengewichtes und damit auch der Biomasse führt. Die Urease-Mutante zeigt auch hier keinen signifikanten Unterschied verglichen mit dem Wildtyp, wobei auch die *AtUAH*-Mutante nicht signifikant unterschiedlich in ihrem Trockengewicht in Bezug auf den

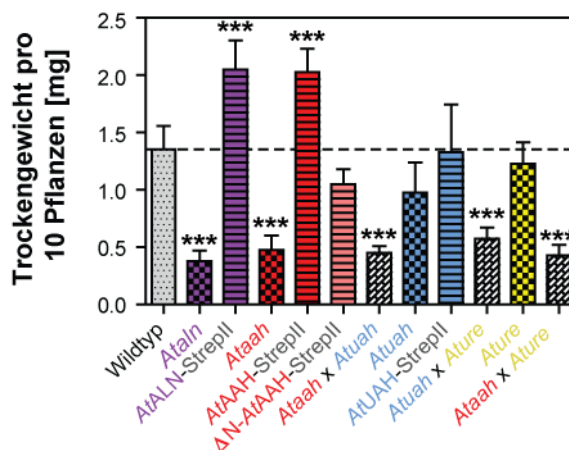


Abbildung 28 – Trockengewicht der verschiedenen Arabidopsislinien mit Allantoin als einziger Stickstoffquelle.

Verlustmutanten ureidabbauender Enzyme, der Urease, entsprechende Komplementationslinien und der Wildtyp wurden auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit 10 mM Allantoin als einziger Stickstoffquelle untersucht. Nach sechswöchigem Wachstum unter Langtagbedingungen wurden die Pflanzen zunächst fotografiert (Abbildung 27) und anschließend geerntet. Je 10 Pflanzen pro Linie wurden zusammen gewogen, wobei hier das Trockengewicht bestimmt wurde. Fehlerbalken sind Standardabweichung ($n = 4$). Sternchen bedeuten einen signifikanten Unterschied mit $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) und $p < 0.001$ (***) bezogen auf den Wildtyp. Die Statistik wurde mittels ANOVA gekoppelt mit einem zweiseitigen Dunnett T-Test bezogen auf den Wildtyp durchgeführt.

Wildtyp ist. Vergleicht man allerdings das mittlere Trockengewicht der *AtUAH*-Mutante mit dem des Wildtyps, ist auch hier die Tendenz zu einer reduzierten Biomasse deutlich erkennbar. Diese Tendenz der *AtUAH*-Mutante wird durch den zusätzlichen Verlust der Urease in der Kreuzungslinie verstärkt, so dass diese Linie einen hochsignifikanten Unterschied zum Wildtyp aufweist. Die Komplementation der jeweiligen Mutante mit der DNA des entsprechenden StrepII-

markierten Enzyms führt zu einer Reversion des Trockengewichtes zurück auf das Wildtypniveau (im Fall der *AtUAH*) oder sogar zu einem erhöhten Trockengewicht (im Fall der *AtALN* und *AtAAH*). Dies unterstützt die beobachtete Biomassesteigerung den Überexpressionslinien in der Phänotypenanalyse. Die Komplementation der *AtAAH*-Mutante mit der DNA der delokalisierten ΔN -*AtAAH* führt das Trockengewicht zwar statistisch zurück auf das Wildtypniveau, allerdings ist auch hier die Tendenz zum geringeren Trockengewicht erkennbar und der Unterschied zur Komplementation mit der vollständigen *AtAAH* ist deutlich (Abbildung 28).

Die Messung des Gesamtproteingehaltes der verschiedenen Arabidopsislinien zeigt, dass eine Reduktion der Biomasse in den *AtALN*- und *AtAAH*-Verlustmutanten zusätzlich mit einem signifikant verringerten Proteingehalt in dieser Biomasse einhergeht (Abbildung 29). Im Gegensatz dazu führt eine Überexpression der *AtALN* und *AtAAH* nicht zu einer signifikant gesteigerten Proteinmenge bezogen auf das Trockengewicht in den entsprechenden Linien. Hier bleibt das Verhältnis von Protein zu Trockengewicht im Vergleich zum Wildtyp konstant. Tendenziell besitzt auch die *AtUAH*-Mutante weniger Protein bezogen auf ihr Trockengewicht (Abbildung 29), wobei

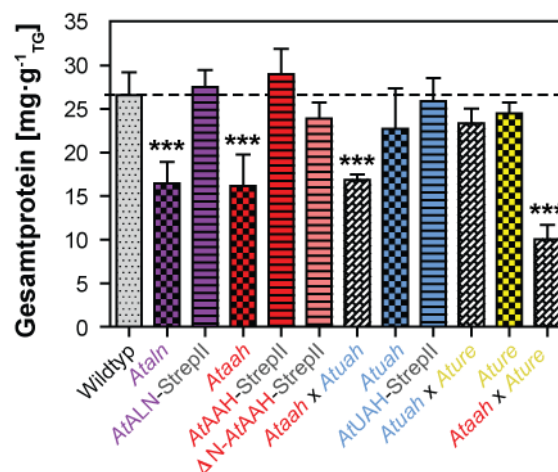


Abbildung 29 – Gesamtproteingehalt der verschiedenen Arabidopsislinien mit Allantoin als einziger Stickstoffquelle.

Verlustmutanten ureidabbauender Enzyme, der Urease, entsprechende Komplementationslinien und der Wildtyp wurden auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit 10 mM Allantoin als einziger Stickstoffquelle untersucht. Nach sechswöchigem Wachstum unter Langtagbedingungen wurden die Pflanzen zunächst fotografiert (Abbildung 27), geerntet und das Trockengewicht bestimmt (Abbildung 28). Anschließend wurde der Gesamtproteingehalt gemessen und auf das Trockengewicht bezogen. Fehlerbalken sind Standardabweichung ($n = 4$). Sternchen bedeuten einen signifikanten Unterschied mit $p < 0,05$ (*), $p < 0,01$ (**) und $p < 0,001$ (***) bezogen auf den Wildtyp. Die Statistik wurde mittels ANOVA gekoppelt mit einem zweiseitigem Dunnett T-Test bezogen auf den Wildtyp durchgeführt.

dieser Effekt im Gegensatz zur Biomasseproduktion an sich nicht durch den zusätzlichen Urease-Verlust verstärkt wird. Überraschend wirkt sich ein zusätzlicher Ureaseverlust massiv auf den *AtAAH*-Verlust aus, da hier der Proteingehalt noch einmal drastisch reduziert ist im Vergleich zum *AtAAH*-Verlust allein (Abbildung 29). Die Komplementationslinien zeigen generell ein Verhältnis von Protein zu Biomasse wie der Wildtyp, wobei auch hier möglicherweise die

Komplementation der *AtAAH*-Mutante mit der DNA der delokalisierten ΔN -*AtAAH* vielleicht nicht ganz das Wildtypniveau erreicht. Diese Daten deuten darauf hin, dass der Verlust der *AtALN* und *AtAAH* und die damit verbundene Unfähigkeit zur Nutzung der angebotenen Stickstoffquelle möglicherweise zunächst zu einer starken Reduktion der Aminosäureproduktion und damit verminderter Proteinbiosynthese führt. Dieser Mangel an Enzymen könnte dann zu einer Reduktion aller Stoffwechselprozesse führen, aus welcher folglich eine geringere Biomassebildung resultiert. Die möglicherweise bessere Verwertung der Stickstoffquelle durch die Überexpression der Enzyme könnte ähnlich hierzu zu einer gesteigerten Aminosäure- und damit auch Proteinbiosynthese führen, welche sich im gleichen Maße auf die Gesamtsteigerung der Biomasse auswirkt. Der geringe Effekt des Urease-Verlustes allein und zusätzlich auf den *AtUAH*-Verlust steht in starkem Kontrast zu dessen starkem Effekt auf den *AtAAH*-Verlust. Dies könnte darauf hindeuten, dass ohne externe Stickstoffquelle die Stickstoffremobilisierung aus Arginin eine große Rolle spielt. Ohne Urease kann der Stickstoff aus Arginin nur zur Hälfte verwertet werden. Diese Einschränkung könnte zur verringerten Proteinbiosynthese unter Stickstoffmangel beitragen.

4.2.4.2 Metabolitanalyse

Im zweiten Experiment sollte nun überprüft werden, ob der Verlust der einzelnen Enzyme zur Akkumulation der entsprechenden Metabolite in *Arabidopsis thaliana* führt.

Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen Mutanten und ihre Komplementationslinien (Tabelle 6) auf Erde angezogen und nach vierwöchigem Wachstum unter Langtagbedingungen untersucht (siehe Kapitel 3.2.3.3.1). Hierbei wurden folgende Metabolite gemessen und quantifiziert: Allantoin, Allantoat, Ureidoglykolat, Glyoxylat, Harnstoff und Ammoniak (siehe Kapitel 3.2.3.3.1).

Es konnte gezeigt werden, dass der Verlust der *AtALN* zu einer Akkumulation von Allantoin in den Pflanzen führt (Abbildung 30 2A), wohingegen Allantoat und Ureidoglykolat kaum noch detektierbar sind (Abbildung 30 2B & 2C). Der Verlust der *AtAAH* bedingt eine erhöhte Konzentration an Allantoat in allen Linien (Abbildung 30 4B, 7B & 12B), wobei der Gehalt an Ureidoglykolat stark reduziert ist (Abbildung 30 4C, 7C & 12C). In den *AtUAH*-Mutanten wiederum ist das Ureidoglykolatniveau erhöht (Abbildung 30 8C & 10C), es sei denn die Mutante ist mit der *AtAAH*-Mutante gekreuzt (Abbildung 30 7C) – hier akkumuliert Allantoat (Abbildung 30 7B), da die AAH im

Stoffwechselweg vor der UAH liegt. Auch in den Urease-Mutanten konnte ein entsprechend erhöhter Gehalt an Harnstoff gemessen werden (Abbildung 30 10F, 11F & 12F), wobei in der Kreuzung mit der *AtUAH*-Mutante die höchste Harnstoffkonzentration detektiert wurde.

Interessanterweise führt sowohl der Verlust der *AtUAH* und der Urease als auch die Überexpression der *AtUAH* zu einem reduzierten Gehalt an Allantoat (Abbildung 30) bzw. Allantoin, was auf eine Regulation

des Ureidgehalts durch Ureidoglykolat schließen lässt. Akkumuliert Ureidoglykolat wird möglicherweise entweder mehr Allantoin und / oder Allantoat abgebaut, um den Stickstoffverlust auszugleichen oder es wird weniger Allantoin / Allantoat produziert, um eine weitere Akkumulation von Ureidoglykolat zu vermeiden. Wenn Ureidoglykolat stark abgebaut wird und somit kaum vorhanden ist (Abbildung 30 9C), könnte auch Allantoat zu einem erhöhten Maße

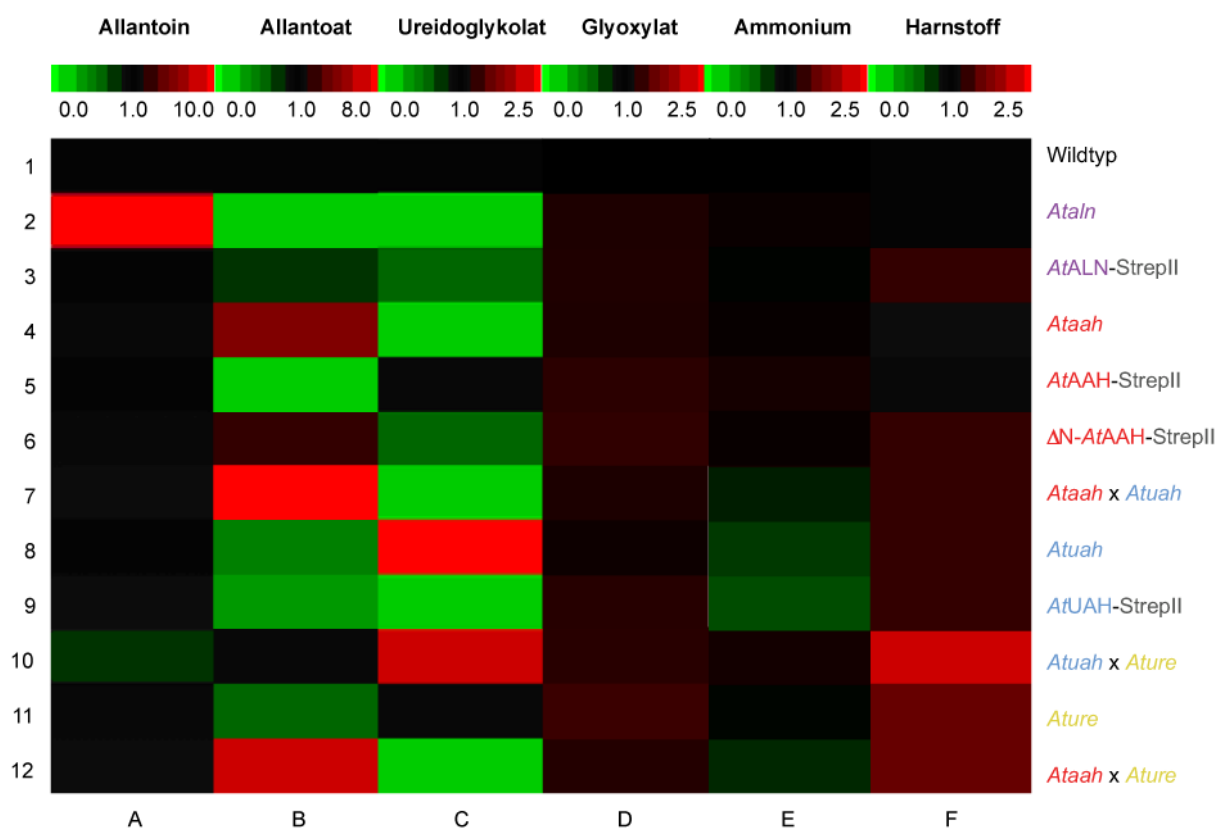


Abbildung 30 – Metabolitanalyse der verschiedenen Arabidopsislilien.

Verlustmutanten ureidabbauender Enzyme, der Urease, entsprechende Komplementationslinien und der Wildtyp wurden auf Erde angezogen und nach vierwöchigem Wachstum unter Langtagbedingungen metabolomisch untersucht. Gemessen wurden: Allantoin (A), Allantoat (B), Ureidoglykolat (C), Glyoxylat (D), Ammonium (E) und Harnstoff (F). Die Detektion von Ammonium und Harnstoff (nach Umsatz mit Urease zu Ammoniak) erfolgte mittels der Berthelot-Reaktion. Allantoin, Allantoat, Ureidoglykolat und Glyoxylat wurden mit Hilfe der differentiellen Glyoxylatanalyse detektiert. Die Quantifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte durch einen entsprechenden Standard. Für die Farbdarstellung verwendete Werte sind Mittelwerte (n = 5) normiert auf den Wildtyp, welcher gleich 1,0 gesetzt wurde.

abgebaut werden, da dies nicht zu einer Akkumulation von Ureidoglykolat führt. Es scheint, als würde eine Ansammlung von Ureidoglykolat vermieden werden. Dies könnte mit dessen Instabilität zusammen hängen, die sich auch in der erhöhten Harnstoffkonzentration in der Urease-Kreuzung widerspiegelt (Abbildung 30 10F). Zu einem veränderten Glyoxylat-, Harnstoff- oder auch Ammoniumgehalt führen diese Verlustmutanten der Enzyme des Ureidabbaus kaum, was darauf hindeutet, dass der Purinabbau nur unwesentlich zum pflanzlichen Gleichgewichtsgehalt dieser Metabolite beiträgt. Die Komplementation der Mutanten mit ihren entsprechenden Genen führt dazu, dass die Akkumulation des jeweiligen Metabolits verhindert wird. Das bedeutet, dass die Enzyme *in vivo* zum Abbau der Metabolite beitragen. Die Überexpression der *AtAAH* und *AtUAH* führt darüber hinaus zu einem geringeren Gehalt an Allantoat bzw. Ureidoglykolat, was auf eine gesteigerte Abbaufähigkeit hinweist und die Beobachtung aus der Phänotypenanalyse unterstützt.

Dieses Experiment bestätigt die Ergebnisse, die für die *AtALN* und *AtAAH* erhalten wurden (Todd und Polacco, 2006; Werner *et al.*, 2008) und bietet einen noch stärkeren Hinweis darauf, dass die *in vitro* Funktion der Enzyme auch ihrer *in vivo* Funktion entspricht. Weiterhin zeigt es, dass die

Reaktionen des Ureidabbaus in *Arabidopsis thaliana* maßgeblich wenn nicht sogar ausschließlich durch diese Enzyme katalysiert werden.

Zusammenfassend kann man sagen, dass mittels der Phänotypenanalyse und der Metabolitanalyse folgende Schlussfolgerungen nahe liegen:

1. In *Arabidopsis* wird Allantoin durch die ALN abgebaut, da ohne sie Allantoin akkumuliert und Allantoat und Ureidoglykolat nicht mehr gebildet werden bzw. die Pflanze unfähig ist, mit Allantoin als einziger Stickstoffquelle zu überleben.
2. In *Arabidopsis* wird der Allantoatabbau über die AAH katalysiert, da deren Verlust zur Akkumulation von Allantoat und Mangel an Ureidoglykolat führt und auch diese Pflanzen Allantoin nicht als Stickstoffquelle nutzen können.
3. In *Arabidopsis* wird Ureidoglykolat mit Hilfe der UAH katabolisiert, da ihr Verlust zur Akkumulation von Ureidoglykolat führt und die Pflanzen nur noch vermindert fähig sind, Allantoin als Stickstoffquelle zu verwenden.
4. Die Überexpression dieser Enzyme führt zu einem verbesserten Ureidabbau in *Arabidopsis*, da die Pflanzen mit Allantoin als Substrat

eine höhere Biomasse aufweisen und das entsprechende Metabolit kaum detektierbar ist, was auf eine höhere Abbaurate hinweist.

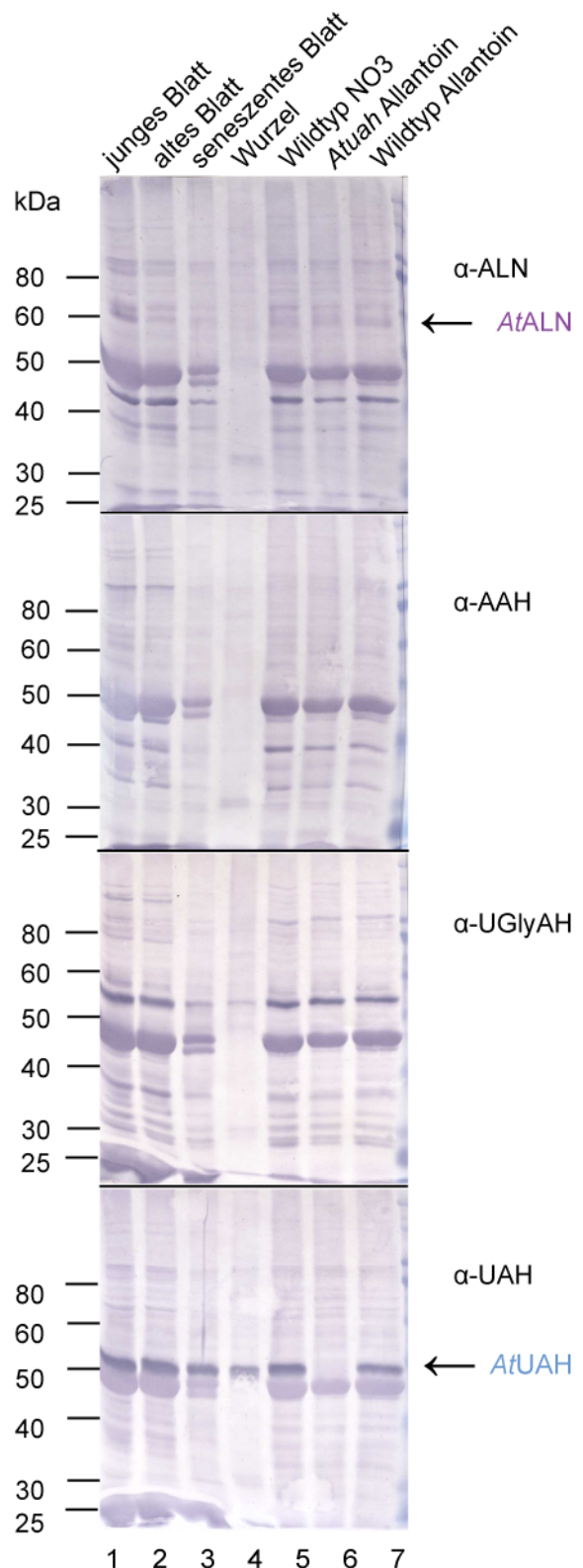
4.2.5 *In vivo* Proteingehalt der Enzyme

Um das native Proteinniveau der Enzyme in *Arabidopsis thaliana* zu untersuchen, wurden spezifische Antikörper für jedes Enzym hergestellt (siehe Kapitel 3.2.2.2.1.2). Mit Hilfe dieser Antikörper sollte untersucht werden, ob und wenn ja, zu welchem Maß die Enzyme in den verschiedenen Geweben von *Arabidopsis* vorhanden sind und, ob sie sich durch Allantoin als einzige Stickstoffquelle in ihrem Proteinniveau erhöhen lassen (siehe Kapitel 3.2.3.4.1). Zu diesem Zweck wurden zum einen zehn Wochen alte Wildtyppflanzen geerntet und aus der Rosette folgende Proben entnommen: Junges Blatt, altes Blatt und seneszendes Blatt. Darüber hinaus wurde auch die

Abbildung 31 – natives Proteinniveau der ureidabbauenden Enzyme in *Arabidopsis thaliana*.

Rohextrakte verschiedener Gewebe von zehn Wochen alten *Arabidopsis* Wildtypen (1-4), sowie Rohextrakte gesamter Pflanzen von sieben Wochen alten Keimlingen gewachsen auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit Nitrat oder Allantoin als Stickstoffquelle (5-7) wurden mittels Gelelektrophorese und Western Blot analysiert. Die Detektion der ureidabbauenden Enzyme erfolgte durch einen spezifischen Antikörper für jedes Enzym.

Wurzel verwendet. Zum anderen wurden sieben Wochen alte Pflanzen des Wildtyps und der *Atuah* von $\frac{1}{2}$ MS-Platten mit Nitrat oder Allantoin als Stickstoffquelle



untersucht.

In allen untersuchten Proben konnte weder die *AtAAH* noch die *AtUGlyAH* detektiert werden und die *AtALN* möglicherweise sehr schwach (Abbildung 31). Im Gegensatz dazu konnte die *AtUAH* in allen Proben detektiert werden. Da die Antikörper für die *AtALN*, *AtAAH* und *AtUAH* etwa gleich sensitiv sind und für die *AtUGlyAH* nur etwa vierfach schwächer (siehe Anhang), ist davon auszugehen, dass die ersten drei Enzyme des Ureidabbaus in *Arabidopsis thaliana* einen sehr geringen Proteingehalt aufweisen, so dass sie bei dieser Analyse nur knapp auf oder eher unter dem Detektionslimit von ca. 5 ng pro Bande (siehe Anhang Abbildung 53) lagen. Das *AtUAH*-Niveau hingegen ist sehr hoch in allen Geweben und bei beiden Stickstoffquellen, wobei in der *AtUAH*-Mutante keine *AtUAH* detektiert werden konnte (Abbildung 31, Spur 6). Die *AtUAH*-Menge ist hierbei in allen Proben etwa gleich groß bezogen auf den Gesamtproteingehalt, was darauf hindeutet, dass die Proteinmenge unabhängig vom Gewebe oder der Stickstoffquelle reguliert wird. Das relativ hohe und ubiquitäre Proteinniveau der *AtUAH* deutet darüber hinaus darauf hin, dass der letzte Schritt des Ureidabbaus in Bezug auf seine Enzymmenge unreguliert stattfindet. Dies begründet sich möglicherweise in der

Vermeidung der Akkumulation des instabilen und reaktiven Ureidoglykolats und möglicherweise auch im Ausgleich zur geringeren Aktivität (k_{cat}) der *AtUAH* im Vergleich zu den anderen ureidabbauenden Enzymen (siehe Tabelle 14). Dass die anderen drei Enzyme kaum bis gar nicht in einem dieser Gewebe detektierbar waren und auch nicht durch Allantoin als einzige Stickstoffquelle in ihrer Proteinmenge zu einem sichtbaren Maß induziert wurden, weist auf eine sehr feine oder möglicherweise sogar keine Regulation der Proteinmenge und eine hohe Aktivität der Enzyme hin.

4.3 Der Ureidabbau in anderen Pflanzen

Da für die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden konnte, dass der Ureidabbau durch die vier Enzyme ALN, AAH, UGlyAH und UAH katalysiert wird, sollten nun auch andere Pflanzen untersucht werden, um zu prüfen, ob diese Enzyme universell den Abbau für Ureide in Pflanzen vermitteln. Ein Proteinsequenzvergleich konnte bereits zeigen, dass viele Pflanzen, darunter auch Reis und das Moos *Physcomitrella patens*, Gene für eine mögliche AAH, UGlyAH und UAH in ihrem Genom enthalten haben (Werner *et al.*, 2010). Es sollte nun untersucht werden,

ob es sich bei diesen Kandidaten um funktionelle AAH-, UGlyAH- und UAH - Proteine handelt. Es wurden die Enzyme aus Reis (*Oryza sativa*) als monokotyle Pflanze und aus Sojabohne (*Glycine max*) als ureidexportierende Leguminose untersucht.

4.3.1 Die ureidabbauenden Enzyme aus Reis

Um zu überprüfen, ob es sich bei den durch einen genomischen Sequenzvergleich ermittelten *OsAAH*-, *OsUGlyAH*- und *OsUAH*-Kandidaten auch tatsächlich um die Proteine mit entsprechender Funktion handelt, wurden die Gene mittels RT-PCR von cDNA aus *Oryza sativa* Nipponbare amplifiziert und in einen pflanzlichen Expressionsvektor unter die Kontrolle eines 35S-Promotors und mit einer Sequenz zur C-terminalen StrepII-Markierung kloniert (von Feng Qiu Cao, siehe Tabelle 2). Mit Hilfe von Agrobakterien wurden diese Konstrukte transient in Blättern von *Nicotiana benthamiana* überexprimiert (siehe Kapitel 3.2.2.1.2) und die Proteine mittels ihrer StrepII-Markierung affinitätschromatographisch aufgereinigt (siehe Kapitel 3.2.2.2.1).

Die Proteine aus Reis konnten in Blättern von *N. benthamiana* überexprimiert werden (Abbildung 32B 2 & 7). Die

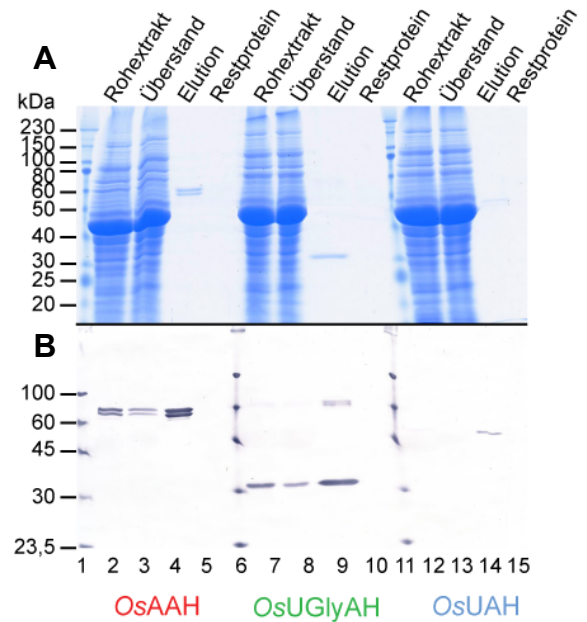


Abbildung 32 - Affinitätsaufreinigung der *OsAAH*, der *OsUGlyAH* und der *OsUAH* aus *N. benthamiana*.

Verschiedene Fraktionen der Aufreinigung wurden mit SDS-Gelelektrophorese getrennt und anschließend mit (A) Colloidal Coomassie Färbung zur Gesamtproteinindektion und (B) Western Blot zur Detektion des StrepII-markierten Proteins dargestellt. Spuren 1, 6 & 11, 5 μ l Prestained Protein Ladder (NEB) oder Strep-tag protein ladder (IBA) als Marker; Spuren 2 - 5, 7 - 10 & 12 - 15, 8 μ l Proteinlösung pro Spur. Spuren 2, 7 & 12, Rohextrakt mit den löslichen Proteinen; Spuren 3, 8 & 13, Überstände nach Inkubation mit der Strep-Tactin MacroPrep Matrix (IBA); Spur 4, Überstand nach fünftem Waschschritt der Matrix; Spuren 4, 9 & 14, Proteinelutionen mit Biotin und Spuren 5, 10 & 15, Restproteine an der Matrix nach der Elution.

Affinitätsaufreinigung der Proteine mittels ihrer StrepII-Markierung führte zu einer Aufreinigung (Abbildung 32A 4, 9 & 14) und Anreicherung (Abbildung 32B 4, 9 & 14) der Proteine in der Elution. Die *OsAAH* lässt sich in allen Fraktionen inklusive der Rohextraktfraktion in zwei elektrophoretisch unterscheidbare

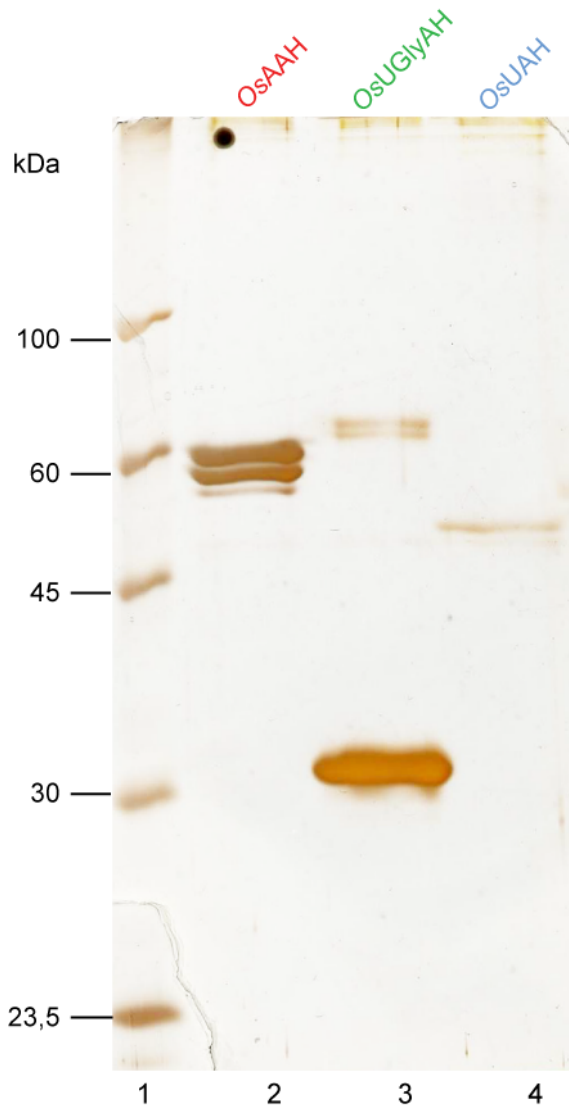


Abbildung 33 – Reinheit der Strep-affinitätschromatographisch aufgereinigten Enzyme aus Reis.

Die Reinheit der Elutionen ist dargestellt mittels SDS-Gelelektrophorese und Silber Färbung zur Gesamtproteinindektion. Spur 1, 5µl Strep-Tag protein ladder (IBA) als Marker; Spuren 2 - 4, 8 µl Proteinelution pro Spur. Spur 2, Elution der *OsAAH*; Spur 3, Elution der *OsUGlyAH* und Spur 4, Elution der *OsUAH*.

Formen (Doppelbände) trennen (Abbildung 32B 2, 3 & 4). Die *OsUGlyAH* hingegen zeigt als Monomer nur eine Form, es ist aber auch ein höhermolekulares Signal in allen Fraktionen zu erkennen, welches möglicherweise auf ein *OsUGlyAH*-Dimer

zurück zu führen ist (Abbildung 32B 7, 8 & 9). Dieses tritt wie bei der *OsAAH* trotz reduzierender und denaturierender Bedingungen in der SDS-Gelelektrophorese schon in der Rohextraktfraktion auf und lässt sich auch in zwei Formen trennen.

Um die Reinheit der Proteine in der Elution zu zeigen, wurden diese außerdem mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt (siehe Kapitel 3.2.2.4.1) und mit Silbernitrat gefärbt (siehe Kapitel 3.2.2.4.2.2).

Außer dem jeweilig aufgereinigten Protein war durch diese Färbung kein weiteres Protein detektierbar (Abbildung 33). Dies bedeutet, dass die enzymatischen Aktivitäten, die unter Verwendung dieser Elutionen gemessen wurden, allein auf diese Proteine zurückzuführen sind. Das ist auch für alle anderen Proteine, die mit diesem Verfahren aufgereinigt wurden, anzunehmen, da sie dieselbe Reinheit besitzen (Daten nicht gezeigt).

Die gereinigten Reisproteine wurden in eine Aktivitätsmessung mit 1 mM Allantoat als Substrat eingesetzt (siehe Kapitel 3.2.2.5) und die Ammoniakproduktion über die Zeit bestimmt (siehe Kapitel 3.2.2.5.1.1).

Es konnte gezeigt werden, dass durch die *OsAAH* aus 1 mM Allantoat 2 mM Ammoniak freigesetzt werden (Abbildung 34). Diese Reaktion der *OsAAH* wird durch die Zugabe der *OsUGlyAH* beschleunigt. Der Zusatz der *OsUAH* zu diesen beiden Enzymen führt zu einer Ammoniak-

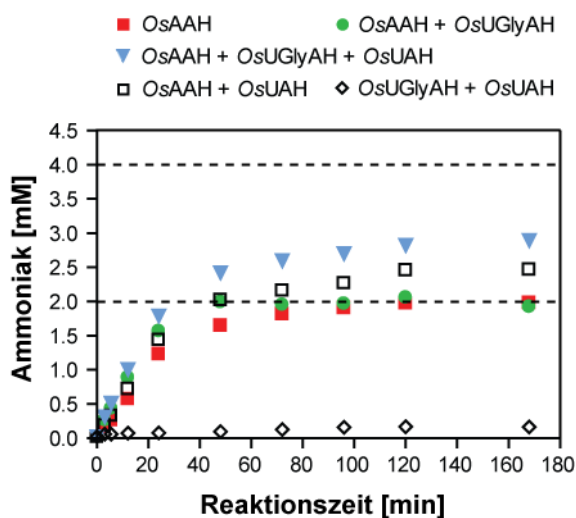


Abbildung 34 – Aktivitätstest ureidabbauender Enzyme aus Reis.

Bestimmung der Ammoniakproduktion während der enzymatischen Reaktion der *OsAAH*, *OsUGlyAH* und *OsUAH* mit 1 mM Allantoat als Substrat. Die Detektion von Ammoniak erfolgte mit Hilfe der Berthelot-Reaktion. Die Quantifizierung des gebildeten Ammoniaks erfolgte durch einen Ammoniumstandard im Reaktionshintergrund.

freisetzung von mehr als 2 mM (ca. 3 mM), allerdings wird die vollständige Freisetzung von 4 mM Ammoniak nicht erreicht (Abbildung 34). Somit scheinen die *AAH*, *UGlyAH* und *UAH* aus Reis die entsprechenden enzymatischen Aktivitäten ihrer Orthologen aus *Arabidopsis thaliana* aufzuweisen. Überraschenderweise zeigt die Reaktion der *OsAAH* mit der *OsUAH* entgegen dem Ergebnis aus *Arabidopsis* (Abbildung 6 und Abbildung 22) nicht den gleichen Kurvenverlauf wie die *OsAAH* allein (Abbildung 34). Zum einen läuft die gekoppelte Reaktion schneller als die Einzelreaktion der *OsAAH* und zum anderen entstehen mehr als nur 2 mM Ammoniak aus 1 mM Allantoat. Eine

mögliche Erklärung wäre, dass die *OsAAH* in der Lage ist, einen Teil des Ureidoglycins vor dem nichtenzymatischen Zerfall in Ureidoglykolat umzusetzen, welches der *OsUAH* dann als Substrat dient. Alternativ könnte es sein, dass die *OsUAH* einen Teil des Ureidoglycins vor dem Zerfall als Substrat verwendet und hier die zweite Ureidogruppe unter Ammoniakfreisetzung hydrolysiert.

Diese zusätzliche Aktivität der *OsAAH* oder *OsUAH* wurde für die Arabidopsisenzyme nicht beobachtet und erfordert zusätzliche Untersuchungen, vor allem in Bezug auf die Messung der anderen Reaktionsprodukte, die dabei entstehen.

Die relativ schwache Aktivität der *OsUAH* kann zum einen an ihrer geringen Überexpressions- und damit verbundenen Aufreinigungsmenge liegen (Abbildung 32) und zum anderen an einer niedrigeren Aktivität der *OsUGlyAH*, die ihr Substrat produziert. Es wäre auch eine geringere Eigenaktivität der *OsUAH* möglich. Um diese Frage zu klären und die Enzyme aus Reis mit denen aus *Arabidopsis* zu

Tabelle 15: die enzymkinetischen Parameter der ureidabbauenden Enzyme in Reis

	K_m μM	spezif. Aktivität $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$	k_{cat} s^{-1}	katalyt. Effizienz $(\text{s} \cdot \text{M})^{-1}$
OsAAH	83,4	91,2	78,7	$0,94 \cdot 10^6$
OsUAH	188,4	64,3	55,6	$2,95 \cdot 10^5$

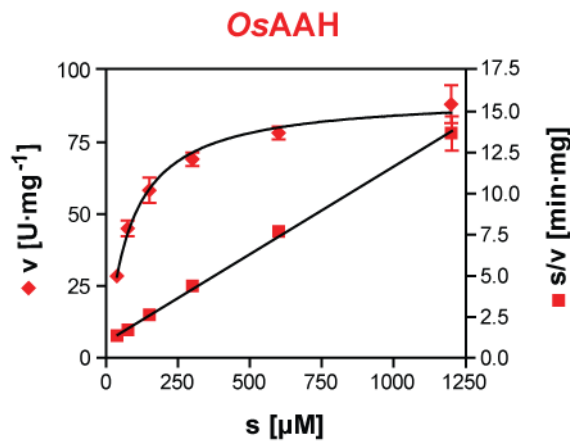


Abbildung 35 – Bestimmung der enzymkinetischen Parameter der OsAAH.

Bestimmt wurde die Geschwindigkeit der Ammoniakproduktion der OsAAH mit 6 verschiedenen Konzentrationen (37,5 µM – 1200 µM) an Allantoat als Substrat bei einer Reaktionszeit von 3 min. Die Detektion von Ammoniak erfolgte mit Hilfe der Berthelot-Reaktion. Die Quantifizierung des gebildeten Ammoniaks erfolgte durch einen Ammoniumstandard im jeweiligen Reaktionshintergrund. Der Proteingehalt der verwendeten OsAAH-Elution wurde mittels NanoOrange bestimmt und die Geschwindigkeit als U pro mg reine OsAAH-HASTrep angegeben für jede Substratkonzentration. Die Berechnung von s/v ermöglicht die Darstellung nach Hanes und ist angegeben in min·mg reine OsAAH-HASTrep.

vergleichen, wurden die enzymkinetischen Parameter der OsAAH und OsUAH bestimmt (siehe Kapitel 3.2.2.5). Exemplarisch ist die Bestimmung der enzymkinetischen Parameter der OsAAH dargestellt, wobei diese sowohl die Darstellung der Geschwindigkeit (hier als spezifische Aktivität) für jede Substratkonzentration als auch den Hanes-Plot beinhaltet (Abbildung 35). Die enzymkinetischen Werte für die OsAAH und die OsUAH sind in Tabelle 15 dargestellt.

Abbildung 35 zeigt den linearen Verlauf in der Darstellung nach Hanes. Dies ist ein

guter Beleg dafür, dass sich das Enzym gemäß dem kinetischen Modell von Michaelis und Menten verhält.

Die OsUAH ist wie auch die AtUAH das langsamere Enzym im Vergleich zur OsAAH bzw. AtAAH (Tabelle 14 & Tabelle 15). Dafür benötigt die OsUAH mehr als doppelt so viel Substrat wie die OsAAH, um halbmaximale Geschwindigkeit zu erreichen (Tabelle 15), im Gegensatz zur AtUAH, die nur die Hälfte der AtAAH-Substratkonzentration hierfür benötigt (Tabelle 14). Beide AAHs besitzen die gleiche katalytische Effizienz. Die OsUAH ist etwa viermal so schnell wie die AtUAH, hat aber einen ca. achtfach höheren K_m , weswegen die OsUAH nur halb so effizient ist wie die AtUAH.

Diese kinetischen Parameter der OsAAH und OsUAH könnten teilweise erklären, warum die Aktivitätsmessung (Abbildung 34) diese Ergebnisse lieferte. Beide Enzyme besitzen zwar vergleichbare enzymkinetische Parameter für ihr Substrat wie ihre orthologen Enzyme aus Arabidopsis, allerdings ist die OsUAH nur halb so effizient wie die AtUAH, was im Zusammenspiel mit ihrer geringen Proteinmenge in der Elution den unvollständigen Umsatz (drei Mol Ammoniak und nicht vier aus 1 Mol Allantoat) erklären könnte. Es gibt aber keinen Hinweis auf eine Zusatzaktivität der OsAAH mit Ureidoglycin, da sie die

gleiche katalytische Effizienz wie die *AtAAH* besitzt. Bei einer Zusatzaktivität der *OsAAH* mit ihrem Produkt Ureidoglycin wäre von einer erhöhten katalytischen Effizienz auszugehen.

4.3.2 Die ureidabbauenden Enzyme aus Sojabohne

Die Untersuchung des Ureidabbaus in Sojabohne wurde begonnen, da er in diesen eine spezielle Relevanz besitzt. Sojabohnen gehören zu den tropischen Leguminosen, die in der Lage sind, mit Hilfe von Rhizobien atmosphärischen Stickstoff zu fixieren. Dieser Stickstoff wird dann in Form von Ureiden aus der Wurzel exportiert, weswegen man tropische Leguminosen auch als Ureidexporter bezeichnet. Ureide stellen also während der Fixierung die Hauptstickstoffquelle für diese Pflanzen dar, wodurch der Ureidabbau unter diesen Bedingungen eine zentrale Bedeutung bekommt.

4.3.2.1 Die beteiligten Enzyme I

Die Untersuchung des Ureidabbaus in Sojabohne begann fast gleichzeitig mit der Untersuchung der ureidabbauenden Enzyme aus *Arabidopsis thaliana*. So wurden die *GmAAH* und *GmUAH* mittels Proteinsequenzvergleich unter Verwendung

der Arabidopsisenzyme identifiziert, die entsprechenden Gene kloniert und die Enzyme biochemisch charakterisiert (Werner, 2007; Przybycin, 2008, Werner *et al.*, 2008). Aufgrund der Daten aus Arabidopsis war davon auszugehen, dass es auch in Sojabohne eine UGlyAH geben könnte. Da das Genom von Sojabohnen zu diesem Zeitpunkt noch nicht sequenziert war, wurde die *AtUGlyAH*-Proteinsequenz verwendet und mit Hilfe von tBLASTn nach ESTs aus Sojabohne gesucht, die translatiert dieser Proteinsequenz ähnlich sind. Es wurden fünf ESTs pro Sequenzabschnitt ausgewählt und deren DNA-Sequenzen verwendet, um eine Konsensussequenz der möglichen *GmUGlyAH* zu erhalten. Aufgrund dieser Konsensussequenz wurden die entsprechenden Primer entworfen und das Gen mittels PCR von cDNA aus *Glycine max* Williams 82 amplifiziert. Anschließend wurde die kodierende Sequenz der möglichen *GmUGlyAH* in einen pflanzlichen Expressionsvektor unter die Kontrolle eines 35S-Promotors und mit einer Sequenz zur C-terminalen StrepII-Markierung kloniert (siehe Kapitel 3.2.1.1.1) und mittels Agrobakterien in *Nicotiana benthamiana* überexprimiert (siehe Kapitel 3.2.2.1.2). Wie auch die *AtUGlyAH* (Abbildung 7) konnte die *GmUGlyAH* zu hoher Reinheit mittels der StrepII-Affinitätschromatographie

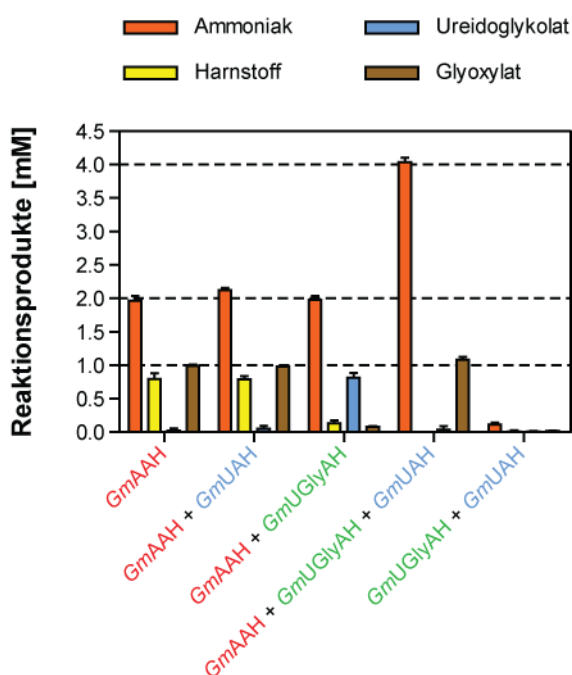


Abbildung 36 - Allantoatabbau in Sojabohne.

Darstellung der Reaktionsprodukte nach 80 minütiger enzymatischer Reaktion der *GmAAH*, *GmUGlyAH* und *GmUAH* mit 1 mM Allantoat als Substrat. Gemessen wurden: Ammoniak, Harnstoff, Ureidoglykolat und Glyoxylat. Die Detektion von Ammoniak und Harnstoff (nach Umsatz mit Urease zu Ammoniak) erfolgte mittels der Berthelot-Reaktion. Ureidoglykolat und Glyoxylat wurden mit Hilfe der differentiellen Glyoxylatanalyse detektiert. Die Quantifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte durch einen entsprechenden Standard. Fehlerbalken sind SD ($n = 3$).

aufgereinigt werden (Daten nicht gezeigt). Um die Aktivität der potenziellen *GmUGlyAH* zu testen, wurde auch hier in Anwesenheit der aufgereinigten *GmAAH* und der aufgereinigten *GmUAH* eine Aktivitätsmessung mit 1 mM Allantoat als Substrat durchgeführt und die Reaktionsprodukte über die Zeit bestimmt (siehe Kapitel 3.2.2.5).

Es zeigte sich, dass nach achzigminütiger Reaktionszeit der *GmAAH* 2 mM

Ammoniak, 1 mM Harnstoff und 1 mM Glyoxylat gebildet wurden (Abbildung 36), wobei auch hier wahrscheinlich zunächst Ureidoglycin entstand, welches dann nichtenzymatisch zerfiel. Der Zusatz der ureidoglykolatabbauenden *GmUAH* beeinflusst die *GmAAH*-Reaktion nicht, wohingegen der Zusatz der *GmUGlyAH* sowohl die Ammoniakfreisetzung aus Allantoat beschleunigt (Daten nicht gezeigt) als auch zur Produktion von Ureidoglykolat führt (Abbildung 36). Dieses Ureidoglykolat wird in der Drei-Enzym-Reaktion zusammen mit der *GmUAH* von dieser als Substrat verwendet, um weitere 2 mM Ammoniak und 1 mM Glyoxylat zu generieren (Abbildung 36). Auch in Sojabohne wird nur durch die Aktivität aller drei Enzyme der Purinringstickstoff aus Allantoat als Ammoniak freigesetzt, was darauf hinweist, dass alle drei Enzyme aus Sojabohne nötig und ausreichend sind, um 1 Mol Allantoat vollständig zu vier Mol Ammoniak und einem Mol Glyoxylat abzubauen.

4.3.2.2 In vivo Funktion I

Da auch für die *GmAAH*, *GmUGlyAH* und *GmUAH* die *in vitro* Aktivitäten gezeigt werden konnten, sollte nun überprüft werden, ob sie diese Funktion auch *in vivo* besitzen könnten. Hierfür wurden zunächst

AtAAH- und *AtUAH*- Verlustmutanten von *Arabidopsis* mit den cDNA-Konstrukten der entsprechenden Gene aus Sojabohne transformiert. Es wurden die Samen von heterozygoten Linien verwendet (Tabelle 6). So waren $\frac{1}{4}$ der verwendeten Samen homozygot für die *GmAAH* bzw. *GmUAH*, $\frac{1}{2}$ der Samen heterozygot und $\frac{1}{4}$ der Samen ohne *GmAAH* bzw. *GmUAH*. Das Wachstum dieser Linien wurde im selben Experiment (siehe 4.2.4.1 Phänotypenanalyse) mit den verschiedenen Mutanten aus *Arabidopsis* und ihren Komplementationslinien auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit Allantoin als einziger Stickstoffquelle untersucht (dargestellt in Abbildung 27).

Zur besseren Vergleichbarkeit sind die Ergebnisse für den Wildtyp, die *Ataah*, die *Atuah* und ihre homologen Komplementationen in Abbildung 37 erneut gezeigt.

Es konnte festgestellt werden, dass die *GmAAH* (Abbildung 37-6) sowie die *AtAAH* (Abbildung 37-4) in der Lage ist, die *Ataah* (Abbildung 37-2) zu komplementieren. Dies konnte auch für die *GmUAH* beobachtet werden. Hier komplementierte das Gen der Sojabohne (Abbildung 37-7) den *AtUAH*-Verlust in *Arabidopsis* (Abbildung 37-3) genauso gut wie das *Arabidopsis*gen selbst (Abbildung 37-5). Dieses Ergebnis konnte auch durch die Messung des Trockengewichtes und des Proteingehaltes in diesen Komplementationslinien bestätigt werden (Daten nicht gezeigt).

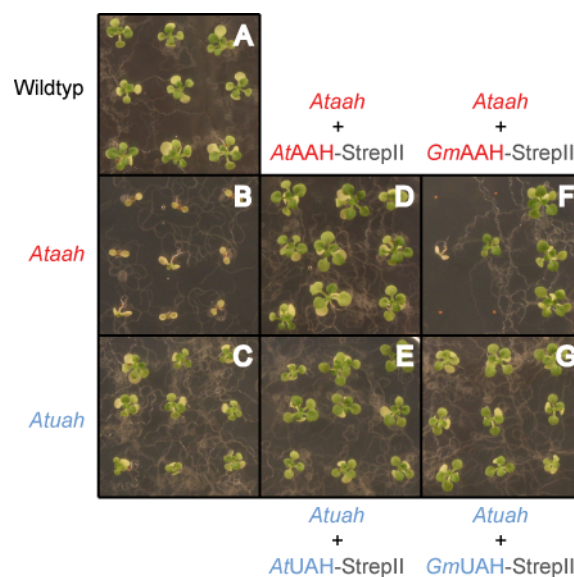


Abbildung 37 – Phänotypenanalyse der Komplementation der Arabidopsismutanten mit den Genen aus Sojabohne.

Fotografien des Wildtyps (A), der Arabidopsismutanten *Ataah* (B) und *Atuah* (C), der entsprechenden Komplementationslinien (D & E) und der Komplementationslinien mit der *GmAAH* (F) bzw. der *GmUAH* (G) sind abgebildet nach sechswöchigem Wachstum unter Langtagbedingungen auf $\frac{1}{2}$ MS-Medium mit 10 mM Allantoin als einziger Stickstoffquelle. A, B, C, D und E wurden bereits in **Abbildung 27** dargestellt.

tationslinien bestätigt werden (Daten nicht gezeigt). Auch hier führte die Komplementation mit dem jeweiligen Sojabohnengen zum gleichen Trockengewicht und Proteingehalt wie die Komplementation mit dem entsprechenden *Arabidopsis*gen (siehe 4.2.4.1 Phänotypenanalyse).

In der Metabolitanalyse konnte darüber hinaus gezeigt werden, dass die Sojabohnenenzyme (Abbildung 38 4 & 7) wie auch ihre *Arabidopsis*orthologen (Abbildung 38 3 & 6) in der Lage sind, die Metabolitakkumulation in den

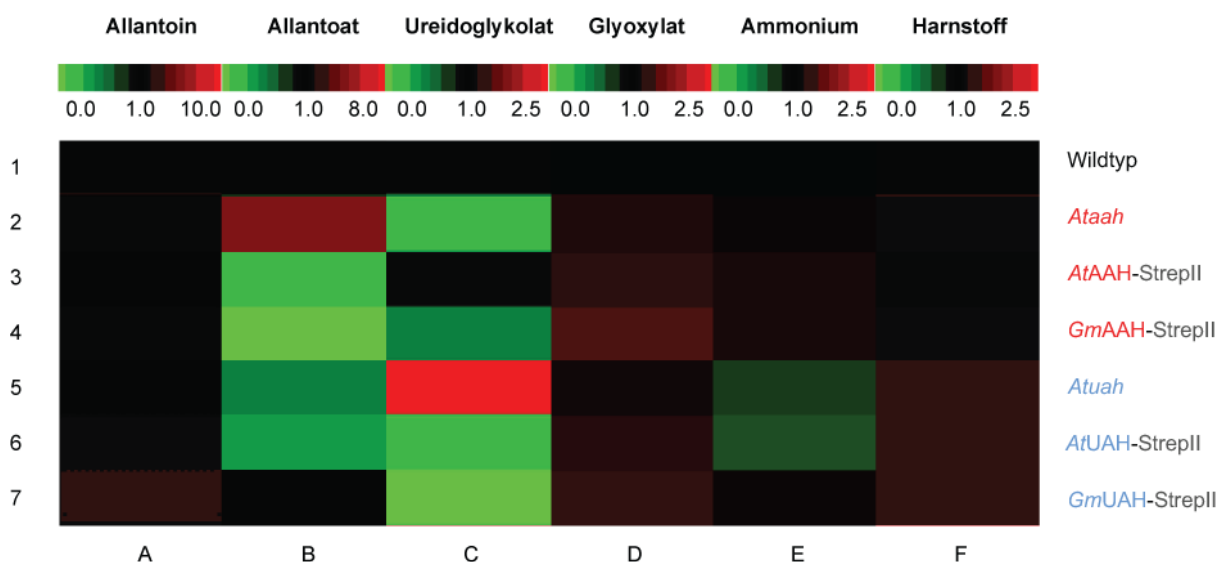


Abbildung 38 – Metabolitanalyse der Komplementation der Arabidopsismutanten mit den Genen der Sojabohnenzyme.

Der Wildtyp (1), die Arabidopsismutanten *Ataah* (2) und *Atuah* (5), ihre entsprechenden Komplementationslinien (3 & 6) und die Komplementationslinien mit den Genen der *GmAAH* (4) bzw. der *GmUAH* (7) wurden auf Erde angezogen und nach vierwöchigem Wachstum unter Langtagbedingungen metabolomisch untersucht. Gemessen wurden: Allantoin (A), Allantoat (B), Ureidoglykolat (C), Glyoxylat (D), Ammonium (E) und Harnstoff (F). Die Detektion von Ammonium und Harnstoff (nach Umsatz mit Urease zu Ammoniak) erfolgte mittels der Berthelot-Reaktion. Allantoin, Allantoat, Ureidoglykolat und Glyoxylat wurden mit Hilfe der differentiellen Glyoxylatanalyse detektiert. Die Quantifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte durch einen entsprechenden Standard. Für die Farbdarstellung verwendete Werte sind Mittelwerte ($n = 5$) normiert auf den Wildtyp, welcher gleich 1,0 gesetzt wurde.

entsprechenden Arabidopsismutanten (Abbildung 38 2 & 5) zu verhindern. Dies deutet darauf hin, dass in diesen Linien die *GmAAH* und die *GmUAH* genauso wie die *AtAAH* und *AtUAH* den Abbau von Allantoat bzw. Ureidoglykolat katalysieren. Da die *GmAAH* und die *GmUAH* in Arabidopsis die Funktion des Allantoat- bzw. Ureidoglykolatabbaus übernehmen können, ist es sehr wahrscheinlich, dass sie diese *in vivo* Funktion auch im homologen System (Sojabohne) besitzen.

4.3.2.3 Die beteiligten Enzyme II

Im Januar 2010 wurde die Sequenzierung des Genoms von Sojabohne veröffentlicht (Schmutz *et al.*, 2010). Bei Sojabohnen handelt es sich um palaeopolyploide Pflanzen, bei denen es zu zwei Genomduplikationsereignissen gekommen ist. Diese Genomduplikationen geschahen vor ca. 59 und vor ca. 13 Millionen Jahren und wurden gefolgt von Gendiversifizierungen, Genverlusten und zahlreichen chromosomalen Reorganisationen. Dies

fürte dazu, dass 75% der vorhandenen Gene in multiplen Kopien vorliegen

(Schmutz *et al.*, 2010).

So gibt es im Sojabohnengenom insgesamt vier *ALNs*, zwei *AAHs*, zwei *UGlyAHs* und zwei *UAHs*. Diese wurden mit 1-4 oder 1-2 nummeriert. Da bereits mit den cDNAs von jeweils einer *GmAAH*, *GmUGlyAH* und *GmUAH* gearbeitet wurde, für die gezeigt werden konnte, dass sie aktive Enzyme kodieren, wurden die bereits verwendeten Gene in der Benennung jeweils mit 1 bezeichnet (siehe Tabelle 16).

Um Hinweise darauf zu erhalten, ob es sich

Tabelle 16: die multiplen Genekopien für ureidabbauende Enzyme in Sojabohne

Gen	Genort	Enzym
ALN 1	Glyma15g07910	<i>GmALN 1</i>
ALN 2	Glyma13g31430	<i>GmALN 2</i>
ALN 3	Glyma13g31420	<i>GmALN 3</i>
ALN 4	Glyma15g07920	<i>GmALN 4</i>
AAH 1	Glyma09g05600	<i>GmAAH (1)</i>
AAH 2	Glyma15g16870	<i>GmAAH 2</i>
UGlyAH 1	Glyma17g15820	<i>GmUGlyAH (1)</i>
UGlyAH 2	Glyma05g05490	<i>GmUGlyAH 2</i>
UAH 1	Glyma10g32850	<i>GmUAH (1)</i>
UAH 2	Glyma20g34790	<i>GmUAH 2</i>

bei dem jeweils zweiten paralogen Gen bzw. einigen der vier Allantoinasegenen um Pseudogene handeln könnte oder es Hinweise auf eine fehlende bzw. veränderte

Tabelle 17: Proteinsequenzanalyse der ureidabbauenden Enzyme in Sojabohne

Enzym	Funktionalität möglich?	Sequenzidentität	Signalvorhersage	Lokalisationsvorhersage
GmALN 1	ja	zu <i>GmALN 2</i> : 95.5% zu <i>GmALN 3</i> : 85.4% zu <i>GmALN 4</i> : 86.0%	Signalanker mit 0,861	ER mit 0,97 (Rang 1)
GmALN 2	ja	zu <i>GmALN 1</i> : 95.5% zu <i>GmALN 3</i> : 84.8% zu <i>GmALN 4</i> : 85.0%	Signalanker mit 0,820	ER mit 0,84 (Rang 1)
GmALN 3	ja	zu <i>GmALN 1</i> : 85.4% zu <i>GmALN 2</i> : 84.8% zu <i>GmALN 4</i> : 97.1%	Signalanker mit 0,862	ER mit 0,87 (Rang 1)
GmALN 4	ja	zu <i>GmALN 1</i> : 86.0% zu <i>GmALN 2</i> : 85.0% zu <i>GmALN 3</i> : 97.1%	Signalanker mit 0,911	ER mit 0,86 (Rang 1)
GmAAH 1	ja	zu <i>GmAAH 2</i> : 98.1%	Signalpeptid mit 0,995	ER mit 0,16 (Rang 2)
GmAAH 2	ja	zu <i>GmAAH 1</i> : 98.1%	Signalpeptid mit 0,996	ER mit 0,20 (Rang 1)
GmUGlyAH 1	ja	zu <i>GmUGlyAH 2</i> : 95.6%	Signalpeptid mit 1,000	ER mit 0,42 (Rang 2)
GmUGlyAH 2	ja	zu <i>GmUGlyAH 1</i> : 95.6%	Signalpeptid mit 1,000	ER mit 0,31 (Rang 1)
GmUAH 1	ja	zu <i>GmUAH 2</i> : 93.3%	Signalpeptid mit 1,000	ER mit 0,21 (Rang 1)
GmUAH 2	nein	zu <i>GmUAH 1</i> : 93.3%	Signalpeptid mit 1,000	ER mit 0,23 (Rang 1)

Proteinaktivität und / oder –lokalisierung gibt, wurden die Proteinsequenzen der Gene zunächst *in silico* analysiert.

Die beiden paralogen Gene der Enzyme führen zu nahezu identischen Proteinsequenzen (Tabelle 17). Die vier Allantoinasen kann man in 2 Gruppen einteilen (1 & 2 und 3 & 4), wobei die Proteinsequenzen innerhalb einer jeden Gruppe wieder eine sehr hohe Identität aufweisen und zur anderen Gruppe etwa 85% identisch sind (Tabelle 17). Für alle Enzymsequenzen wurde eine mögliche ER-Lokalisation vorhergesagt (Multiloc), wobei die Allantoinasen im Gegensatz zu den anderen Enzymen des Ureidabbaus einen Signalanker anstelle eines Signalpeptides tragen sollen (SignalP 3.0 HMM). Auch in den konservierten Bereichen eines jeden Enzyms (siehe Anhang) konnten keine grundlegenden Abweichungen der Proteinsequenz in einem der Paralogen gefunden werden, welche auf eine Veränderung der Aktivität hinweisen könnten. Im Gegensatz dazu enthält die *GmUAH 2* ein Stopcodon im ersten Exon (siehe Anhang), so dass dieses Gen ein Pseudogen ist.

Da mit der *in silico* Analyse außer für die *GmUAHs* keine offensichtlichen Unterschiede zwischen den Proteinsequenzen der zwei bzw. vier Paralogen gefunden werden konnte, sollten die Enzyme im Weiteren biochemisch

untersucht und miteinander verglichen werden, um herauszufinden, ob es Unterschiede in den enzymkinetischen Parametern gibt.

Tabelle 18: die enzymkinetischen Parameter der ureidabbauenden Enzyme aus Sojabohne

	K_m μM	spez. Aktiv. U/mg	k_{cat} s^{-1}	kat. Effiz. $(\text{s}\cdot\text{M})^{-1}$
<i>GmALN 1</i>	11758	1596	1484	$1,26 \cdot 10^5$
<i>GmALN 2</i>	15251	3678	3424	$2,24 \cdot 10^5$
<i>GmALN 3</i>	13118	83	76	$5,81 \cdot 10^3$
<i>GmALN 4</i>	17089	761	702	$4,11 \cdot 10^4$
<i>GmAAH 1</i>	46	88	76	$1,63 \cdot 10^6$
<i>GmAAH 2</i>	107	97	84	$0,78 \cdot 10^6$
<i>GmUAH 1</i>	40	21	17	$4,3 \cdot 10^5$

Es wurde alle Gene, die noch nicht untersucht wurden von Dr. Nieves Medina Escobar kloniert (siehe Tabelle 2). Wie auch die bereits untersuchten Gene wurden sie transient in *Nicotiana benthamiana* überexprimiert (siehe Kapitel 3.2.2.1.2). Anschließend wurden die Enzyme parallel aufgereinigt und für eine Bestimmung der enzymkinetischen Parameter verwendet (siehe Kapitel 3.2.2.5).

GmALN 1 und *GmALN 2* besitzen einen ähnlichen K_m -Wert und eine ähnliche katalytische Effizienz (Tabelle 18) vergleichbar mit den Werten des Arabidopsisenzym (Tabelle 14). Die *GmALN 3* und *GmALN 4* dagegen zeigen

eine zehnfach bis hundertfach verringerte katalytische Effizienz bedingt durch eine geringere Katalysegeschwindigkeit (Tabelle 18).

Das könnte darauf hindeuten, dass die *GmALN 1* und *GmALN 2* die beiden aktiven Enzyme in Sojabohne sind, wobei hier die *GmALN 2* das noch effizientere Enzym ist. Die beiden *GmAAHs* zeigen keinen Unterschied in ihrer spezifischen Aktivität, allerdings wurde für die *GmAAH 2* ein doppelt so hoher K_m -Wert bestimmt, wodurch die katalytische Effizienz gegenüber *GmAAH 1* halbiert wird. Generell liegen beide Enzyme im Bereich der Werte, die für die Arabidopsis-AAH bestimmt wurden (Tabelle 14). Die *GmUAH 1* bleibt hier ohne Vergleich zur *GmUAH 2*, da diese kein funktionelles UAH-Protein bildet. Allerdings liegen die Werte der *GmUAH 1* auch hier ungefähr im Bereich der Werte des Arabidopsisenzyms (Tabelle 14). Für die beiden UGlyAHs konnte die Bestimmung der kinetischen Parameter in Ermangelung des Substrates nicht durchgeführt werden, allerdings waren beide Enzyme *in vitro* aktiv (Abbildung 36 und Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend konnten mit Hilfe der *in vitro* Daten die vier paraloge Allantoinasen möglicherweise auf zwei hauptfunktionelle Enzyme reduziert werden.

4.3.2.4 In vivo Funktion II und in vivo Relevanz

Für die *GmAAH 1* und *GmUAH 1* konnte die *in vivo* Funktion bereits im heterologen System Arabidopsis gezeigt werden (Abbildung 37 und Abbildung 38).

Für eine Untersuchung der Funktion aller Enzyme im homologen System wären die entsprechenden Verlustmutanten in Sojabohne nötig. Diese sind schwierig zu erhalten, weswegen der Enzymverlust (aller Paralogen gleichzeitig) mittels Virus-induzierter Genabschaltung (VIGS) bewirkt wurde. Die VIGS-Technik in Sojabohne wurde durch Dr. Nieves Medina Escobar in unserem Labor etabliert und für dieses Projekt angewendet. Der hierbei verwendete VIGS-Vektor wurde von Zhang *et al.*, 2010 veröffentlicht. Bisher ist diese Gruppe die Einzige weltweit, die mit diesem System die Menge spezifischer Transkripte reduzieren kann. Der Einsatz dieser Technik in unserem Labor wurde bisher auf das transkriptionelle Herunterregulieren der *GmUAH* fokussiert, da die *in vivo* Funktion dieses Enzyms im Leguminosenfeld sehr umstritten ist. Dr. Medina Escobar stellte drei verschiedene Konstrukte her, um das Transkriptniveau der *GmUAH* mittels VIGS in Sojabohnen herunter zuregulieren (Tabelle 5). Von ihr generierte RT-PCR Daten bestätigten eine erfolgreiche Virusinfektion der

verwendeten Pflanzen und darüber hinaus eine Reduktion der *GmUAH*-Transkriptmenge. Nun sollte das korrespondierende Proteinniveau (siehe Kapitel 3.2.3.4.2) und das Metabolitprofil der Ureide (siehe Kapitel 3.2.3.3.2) in den verwendeten Pflanzen bestimmt werden, um den Einfluss der Verminderung der *GmUAH*-Transkriptmenge *in vivo* zu untersuchen.

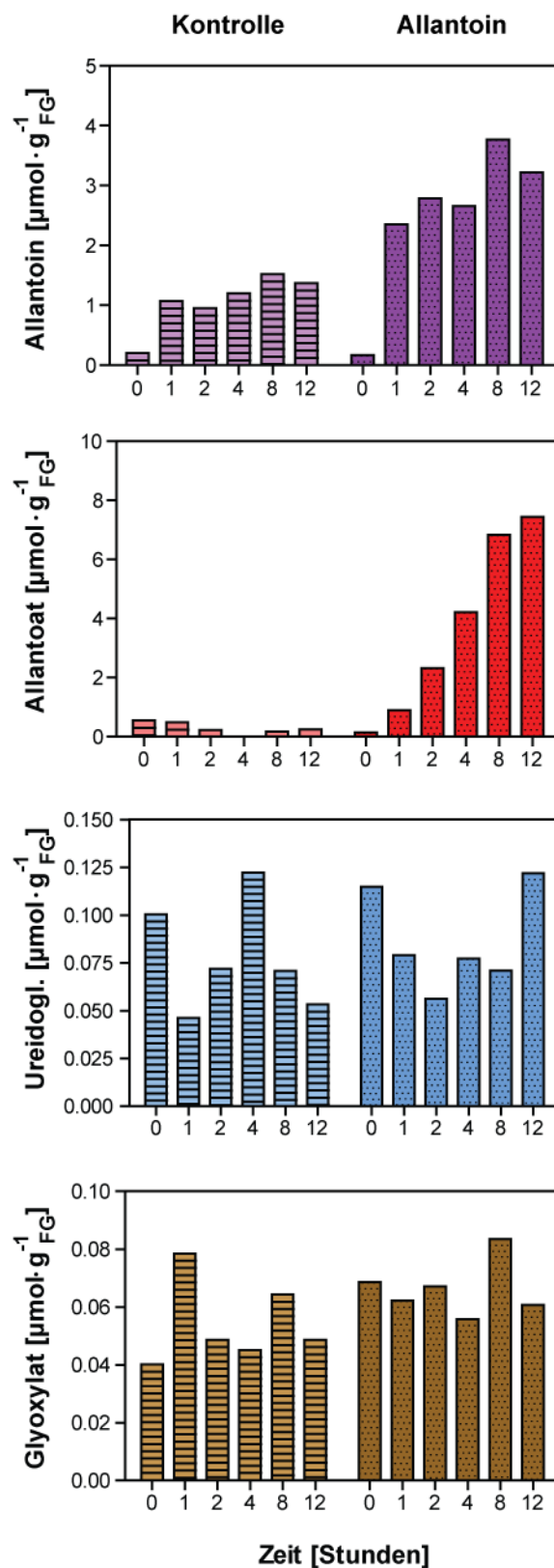
Da unter Wachstumsbedingungen auf Erde (Kapitel 3.2.3.1.3) keine Akkumulation von Ureiden gemessen werden konnte (Daten nicht gezeigt), wurden die Blätter der infizierten Pflanzen über die Petiolen mit 10 mM Allantoin versorgt (siehe Kapitel 3.2.3.1.3). So sollte der Ureidabbau verstärkt und die Intermediate für die Analyse angereichert werden. Hierfür wurde zunächst ein Zeitkursexperiment mit einem uninfizierten Blatt durchgeführt, welches die Aufnahme und Verwendung des angebotenen Allantoins und den besten Zeitpunkt für die Probennahme in den folgenden Experimenten darlegen sollte.

Es zeigte sich, dass Allantoin von den Blättern aufgenommen und in Allantoat

umgewandelt wird, welches daraufhin mit der Zeit akkumuliert (Abbildung 39). Dem entgegen ändern sich die Konzentrationen

Abbildung 39 – Allantoinaufnahme und -umsatz im Zeitkurs.

Blätter der Sojabohne wurden von der Pflanze abgetrennt und ihre Petiolen über zwölf Stunden in 10 mM HEPES_{pH8} (Kontrolle) oder 10 mM Allantoin inkubiert. Gemessen wurden Allantoin, Allantoat, Ureidoglykolat und Glyoxylat mit Hilfe der differentiellen Glyoxylatanalyse. Die Quantifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte durch einen entsprechenden Standard.



von Ureidoglykolat und Glyoxylat nicht, was entweder auf einen Mangel an aktiven *GmAAHs* hinweist oder auf einen sofortigen Umsatz von Ureidoglykolat und Glyoxylat. Anhand des Allantoatprofils wurde der Zeitpunkt der Probennahme für die Folgeexperimente auf acht Stunden festgelegt, da danach die Allantoatakkumulation kaum noch zunahm (Abbildung 39).

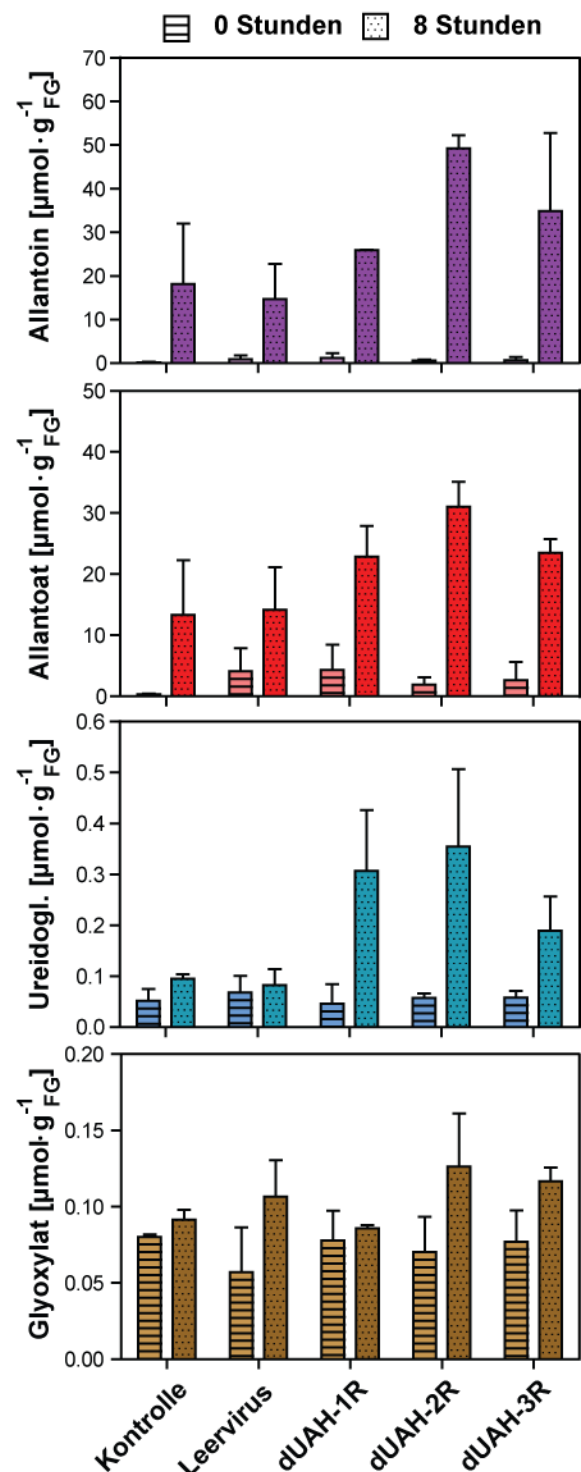
In einem Folgeexperiment wurden Blätter von sechs Wochen alten Sojapflanzen verwendet. Die Pflanzen waren dreieinhalb Wochen vor der Probennahme mit je einem der drei verschiedenen VIGS-Konstrukte zur Reduktion der *GmUAH* Transkriptmenge oder einem leeren Virus zur Kontrolle infiziert worden. Auch hier wurden die Blätter (je drei pro Konstrukt) von den Pflanzen abgetrennt und über die Petiolen für acht Stunden mit 10 mM Allantoin versorgt, wobei Proben sowohl vor der Inkubation (T0) als auch nach der Inkubationszeit entnommen wurden (T8).

In allen Blättern erfolgte die Aufnahme und

Abbildung 40 – Metabolitanalyse der Sojabohnenblätter infiziert mit *GmUAH*-VIGS-Konstrukten.

Infizierte Blätter von Sojabohnen, die keine Viren (Kontrolle) bzw. Viren mit dem Leervektor (Leervirus) oder Viren mit einem der drei verschiedenen *GmUAH*-VIGS-Konstrukte enthielten, wurden von der Pflanze abgetrennt und ihre Petiolen über acht Stunden in 10 mM Allantoin inkubiert. Gemessen wurden Allantoin, Allantoat, Ureidoglykolat und Glyoxylat mit Hilfe der differentiellen Glyoxylatanalyse. Die Quantifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte durch einen entsprechenden Standard. Fehlerbalken sind SD ($n = 3$).

Umwandlung von Allantoin, da es nach der achtstündigen Inkubationszeit in allen Proben im Vergleich zum Zeitpunkt Null zu einer Akkumulation von Allantoin und auch Allantoat kam (Abbildung 40). Wie auch im Zeitkursexperiment (Abbildung 39)



akkumulierten Ureidoglykolat und Glyoxylat weder in den uninfizierten Blättern (Kontrolle) noch in den infizierten Blättern mit dem leeren Virus. Dem entgegen akkumulierte Ureidoglykolat deutlich in den Blättern, die mit den Viren zur Stummschaltung der *GmUAH* infiziert wurden (Abbildung 40). Dies deutet daraufhin, dass die *GmUAH* am Ureidoglykolatabbau *in vivo* in Sojabohne beteiligt ist. Darüber hinaus weisen diese Daten auf eine generell sehr hohe *GmUAH*-Aktivität hin, da es sowohl hier in den Kontrollen als auch im Zeitkursexperiment trotz des verstärkten Ureidabbaus zu keiner Ureidoglykolatakkumulation kam, obwohl Allantoin und Allantoat akkumulierten. Weiterhin ist eine gesteigerte Akkumulation von Allantoin und Allantoat in den Blättern mit UAH-VIGS im Vergleich zu den beiden Kontrollen erkennbar (Abbildung 40). Dies könnte möglicherweise eine negative Rückkopplung andeuten, die aus der Akkumulation von Ureidoglykolat oder dem Verlust der *GmUAH* resultiert.

Um zu überprüfen, ob die Ureidoglykolatakkumulation in diesen Blättern wirklich auf ein verringertes *GmUAH*-Proteinniveau zurückzuführen ist und ob dieser Verlust möglicherweise einen Einfluss auf den Proteingehalt der anderen Enzyme (vor allem der *GmALNs* und *GmAAHs*) hat, wurde eine Western Blot Analyse mit je

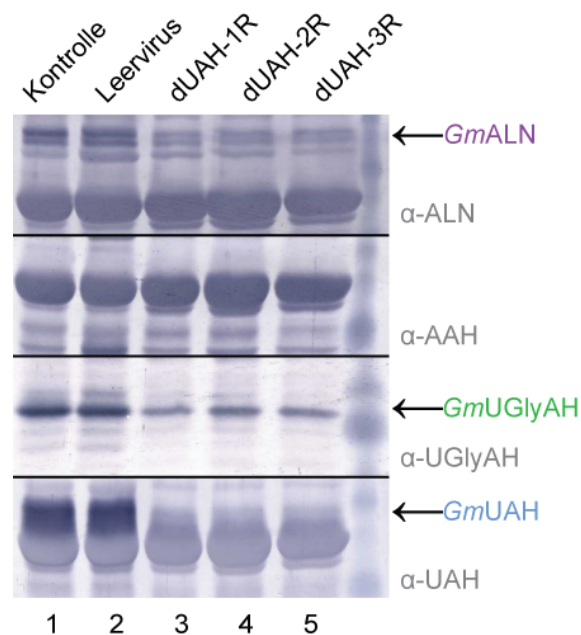


Abbildung 41 – Western Blot Analyse der *GmUAH*-verminderten Sojabohnenblätter.

Für je eines der drei Blätter, die in der Metabolitanalyse verwendet wurden, wurden die Proteinniveaus der *GmALNs*, *GmAAHs*, *GmUGlyAHs* und *GmUAH* bestimmt. Hierfür wurden pro Probe 8 µg Rohextrakt mittels Gelelektrophorese und Western Blot analysiert. Die Detektion der ureidabbauenden Enzyme erfolgte durch einen spezifischen Antikörper für jede Enzymart.

einem der drei biologischen Replikate pro Konstrukt durchgeführt.

Anhand der spezifischen Detektion der Enzyme in den verschiedenen Extrakten wird deutlich, dass die Viren, die die *GmUAH*-Stummschaltungskonstrukte enthielten zu einer drastischen Reduktion des *GmUAH*-Proteinniveaus führten (Abbildung 41, Spuren 3, 4 & 5). Dies könnte zu der verringerten Fähigkeit, Ureidoglykolat abzubauen geführt haben und damit zur beobachteten Ureidoglykolatakkumulation in diesen Blättern. Darüber hinaus waren auch die

Proteinniveaus der *GmALNs* und der *GmUGlyAHs* in diesen Proben reduziert im Vergleich zu den Kontrollen (Abbildung 41, Spuren 1 & 2), wobei die *GmAAHs* in keiner der Proben eindeutig detektiert werden konnten. Dieses Resultat könnte die verstärkte Akkumulation von Allantoin und Allantoat (in Annahme, die *GmAAHs* verhalten sich ähnlich) erklären und verstärkt damit die Hinweise auf eine negative Regulation des Proteingehaltes der anderen ureidabbauenden Enzyme aufgrund der Akkumulation von Ureidoglykolat oder dem Verlust der *GmUAH*. Auch die Vermutung einer generell sehr hohen *GmUAH*-Aktivität kann anhand der Western Blot Analyse bestätigt werden, da der Proteingehalt dieses Enzymes sehr hoch ist (Abbildung 41, Spuren 1 & 2).

Dieses Experiment zeigt zum ersten Mal die *in vivo* Funktion und Relevanz der *GmUAH* in Sojabohne und deutet darüber hinaus auf eine Regulation des Ureidabbaus durch Ureidoglykolat oder die *GmUAH* hin.

4.3.2.5 *In vivo* Proteingehalt & Metabolitprofil

Um Informationen über die Regulation des Ureidabbaus in Sojabohnen zu erhalten, wurden verschiedene Studien zum Proteingehalt (siehe Kapitel 3.2.3.4.2) und

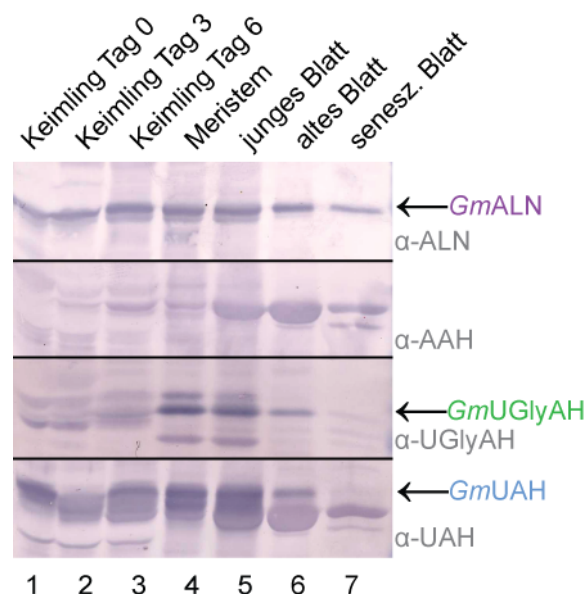


Abbildung 42 - natives Expressionsniveau der ureidabbauenden Enzyme in Sojabohne. Rohextrakte von Keimlingen (1-3), sowie unterschiedlich alter Blätter (4-7) wurden mittels Gelelektrophorese und Western Blot analysiert. Die Detektion der ureidabbauenden Enzyme erfolgte durch einen spezifischen Antikörper für jede Enzymart.

Metabolitprofil der Ureide (siehe Kapitel 3.2.3.3.2) durchgeführt.

Hierfür wurde zunächst das Proteinniveau der ureidabbauenden Enzyme in Sojabohnen während der Keimung und in verschieden alten Blättern (bis hin zur Seneszenz) untersucht, da der Ureidabbau hier verstärkt benötigt werden soll. Während der Keimung konnten die *GmALNs* gleichbleibend stark detektiert werden, die *GmAAHs* gar nicht, die *GmUGlyAHs* schwach und die *GmUAH* stark an Tag 0 und an Tag 6 (Abbildung 42, Spuren 1, 2 & 3). Dies deutet daraufhin, dass der Ureidabbau während der Keimung stattfinden kann, die beteiligten Enzyme (außer der *GmUAH*) in ihrem Proteingehalt

aber nicht besonders stark gesteigert oder reguliert sind. Das geringere Proteinniveau der *GmUAH* an Tag drei der Keimung wirft Fragen auf, die durch weitere Experimente geklärt werden müssen. In den verschiedenen alten Blättern (die Meristemprobe enthielt dabei sehr junge Blätter) ist dagegen eine unterschiedliche Regulation der ureidabbauenden Enzyme zu erkennen. Für die verschiedenen Blattproben wurde immer der Extrakt desselben Frischgewichtes (0,8 µg) aufgetragen. Anhand der unspezifischen Proteindetektionen im Blothintergrund lässt sich die Abnahme des Proteingehaltes mit dem steigenden Blattalter gut erkennen (Abbildung 42, Spuren 4, 5, 6 & 7). Während die *GmALNs* in ihrem Proteinniveau in allen Blattaltern nahezu konstant bleiben und nur wenig abnehmen, nimmt der Proteingehalt der *GmUGlyAHs* und der *GmUAH* zusammen mit dem Gesamtproteingehalt stark ab, so dass sie in seneszenten Blättern kaum noch zu detektieren sind (Abbildung 42 7). Die *GmAAHs* können auch hier in keinem der Gewebe detektiert werden. Die verstärkte Proteinmenge der *GmALNs* im Vergleich zu den anderen (ureidabbauenden) Proteinen im steigenden Blattalter könnte auf eine verstärkte Generation von Allantoat aus Purinen hinweisen, welches dann aber nicht weiter abgebaut sondern möglicherweise aus dem Blatt über das

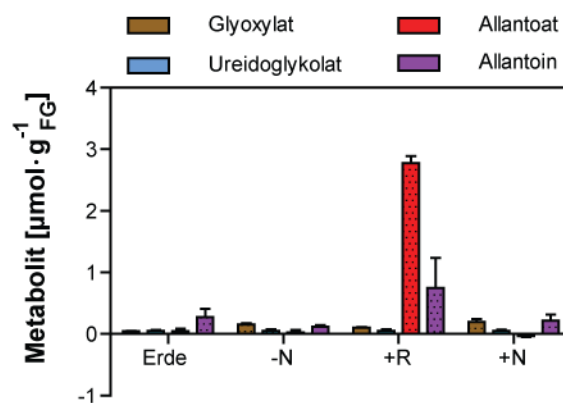


Abbildung 43 – Metabolitgehalt in Blättern von Sojabohnen mit unterschiedlichen Stickstoffquellen.

Sojabohnen wurden für acht Wochen auf Erde oder in Vermikulit/Perlit angezogen. Die Pflanzen in V/P wurden entweder mit gar keinem Stickstoff versorgt (-N), enthielten Knöllchen (+R) oder wurden mit Ammoniumnitrat (+N) gedüngt. Gemessen wurden Allantoin, Allantoat, Ureidoglykolat und Glyoxylat mit Hilfe der differentiellen Glyoxylatanalyse. Die Quantifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte durch einen entsprechenden Standard. n=2 (techn. Repl.).

Phloem exportiert wird (konform mit Layzell und LaRue, 1982).

Um die Regulation des Ureidabbaus in Abhängigkeit verschiedener Stickstoffquellen zu untersuchen, wurden Blätter acht Wochen alter Sojabohnen, die entweder auf Erde oder auf Vermikulit/Perlit mit entweder keinem Stickstoff (-N), keinem Stickstoff aber Rhizobien (+R) oder mit Ammoniumnitrat (+N) gewachsen waren (siehe Kapitel 3.2.3.1.3), untersucht. Hierbei wurde zunächst das Metabolitprofil der Ureide in den verschiedenen Pflanzen bestimmt.

Generell war kein Unterschied zwischen den Pflanzen auf Erde und in Vermikulit/Perlit mit Ammoniumnitrat zu

erkennen. In beiden Bedingungen kann ein geringes Niveau an Allantoin detektiert werden, wohingegen Allantoat und Ureidoglykolat kaum nachweisbar sind (Abbildung 43). Ohne Stickstoffversorgung der Pflanzen, ist dieser Allantoingehalt noch vermindert. Im Gegensatz dazu ist bei der Sojabohne unter fixierenden Bedingungen (+R) eine deutliche Akkumulation der Ureide Allantoin und Allantoat nachzuweisen, wohingegen Ureidoglykolat auch hier kaum detektierbar war (Abbildung 43). Somit ähnelt das Metabolitprofil dieser fixierenden Pflanze dem, der mit Allantoin versorgten Pflanzen (Abbildung 39 & Abbildung 40), außer dass in der fixierenden Pflanze sehr viel mehr Allantoat als Allantoin im Blatt detektiert werden konnte (konform mit McClure und Israel, 1979).

Das Proteinniveau der korrespondierenden Enzyme zeigt kaum eine Reaktion auf die unterschiedlichen Stickstoffquellen. Die in Vermikulit/Perlit gewachsenen Pflanzen verhalten sich alle fast identisch in Bezug auf die Proteinmenge der ureidabbauenden Enzyme (Abbildung 44, Spuren 2, 3 & 4), unabhängig von der jeweiligen Stickstoffquelle. Dieses Ergebnis entspricht den Daten aus Arabidopsis (Abbildung 31), aber nicht den Erwartungen, da sowohl durch den starken Stickstoffmangel als auch vor allem durch die Fixierung und der damit verbundenen Hauptstickstoffquelle

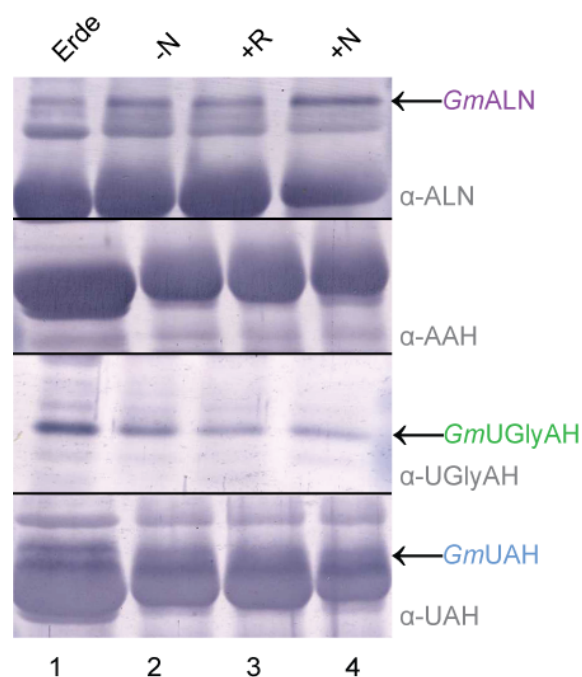


Abbildung 44 – natives Expressionsniveau in Blättern von Sojabohnen mit unterschiedlichen Stickstoffquellen.

Die Blattrohextrakte der für die Metabolitanalyse verwendeten Pflanzen (Abbildung 43) wurden mittels Gelelektrophorese und Western Blot analysiert. Die Detektion der ureidabbauenden Enzyme erfolgte durch einen spezifischen Antikörper für jede Enzymart.

(Ureide) eine Steigerung des Proteingehaltes der ureidabbauenden Enzyme im Vergleich zur mit Ammoniumnitrat versorgten Pflanze vermutet wurde. Damit scheint eine Regulation des Ureidabbaus mittels der Enzymaktivitäten wahrscheinlicher als eine Regulation des Proteinniveaus. Möglich wäre auch, dass die Stickstoffquelle nicht zu einer Regulation des Ureidabbaus führt. Abschließend sollte das Metabolitprofil verschiedener Gewebe von Pflanzen unter fixierenden (R) und nichtfixierenden Bedingungen (N) vergleichend untersucht werden. Hierfür wurden sechs Wochen alte

Sojabohnen verwendet, die auf Vermikulit/Perlit angezogen wurden und entweder mit Rhizobien versetzt und ohne Stickstoff gedüngt oder mit Ammoniumnitrat versorgt wurden (siehe Kapitel 3.2.3.1.3). Geerntet wurden hierbei die Knöllchen, Wurzeln, Sprosse und Blätter von je drei Pflanzen pro Bedingung, welche daraufhin gemischt wurden, so dass jeder Messwert den mittleren Wert aus drei biologischen Replikaten darstellt.

In Übereinstimmung mit den Daten von Matsumoto *et al.*, 1977 konnte in allen untersuchten Geweben der nichtfixierenden Pflanzen, die mit Ammoniumnitrat versorgt wurden, ein leichter Gehalt an Allantoin gemessen werden wohingegen Allantoat kaum detektierbar war (Abbildung 45 N). In den Sprossen und Blättern der fixierenden Sojabohnen konnte ein hoher Gehalt an beiden Ureiden detektiert werden, wobei generell der Spross die höchste Ureidakkumulation aufwies (konform mit Matsumoto *et al.*, 1977) und Allantoat höhere Konzentrationen in allen Geweben erreichte als Allantoin (Abbildung 45 F), so wie es auch von McClure und Israel, 1979 veröffentlicht wurde. In den Knöllchen konnte die zweithöchste Akkumulation der Ureide gemessen werden wohingegen die Wurzel, die die Knöllchen trug, keine Ureide akkumulierte und somit metabolomisch von den Wurzeln der nichtfixierenden Pflanzen kaum zu

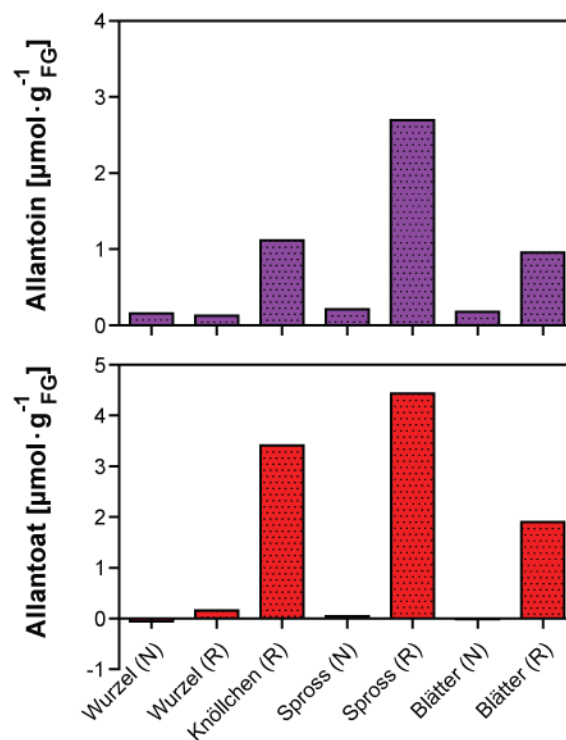


Abbildung 45 - Metabolitgehalt in Geweben von Sojabohnen unter fixierenden und nichtfixierenden Bedingungen.

Sojabohnen wurden für sechs Wochen auf Vermikulit/Perlit angezogen und enthielten Knöllchen (R) oder wurden mit Ammoniumnitrat (N) gedüngt. Gemessen wurden Allantoin, Allantoat, Ureidoglykolat und Glyoxylat mit Hilfe der differentiellen Glyoxylatanalyse, wobei nur der Allantoin- und Allantoingehalt dargestellt sind. Die Quantifizierung der Reaktionsprodukte erfolgte durch einen entsprechenden Standard.

unterscheiden war. Dies deutet daraufhin, dass die Wurzel nicht über die mittels Fixierung gebildeten Ureide mit Stickstoff versorgt wird im Gegensatz zum Spross und den Blättern. Der Spross als Transport- und Lagergewebe beinhaltet die meisten Ureide, gefolgt vom Bildungsort der Ureide – den Knöllchen und letztlich den Blättern, wo die Ureide verbraucht werden, um die Pflanze mit Stickstoff zu versorgen.

5 Diskussion

Die Verfügbarkeit von Stickstoff begrenzt häufig das Wachstum von Pflanzen. Generell können Pflanzen Stickstoff in Form von Nitrat und Ammonium aus dem Boden aufnehmen. Darüber hinaus sind einige Pflanzen (z.B. Leguminosen) in der Lage, eine Symbiose mit stickstofffixierenden Bodenbakterien einzugehen, welche aus atmosphärischem Stickstoff (N₂) Ammonium generieren und mit diesem sogar den gesamten Stickstoffbedarf einer Pflanze decken können (Schubert, 1986). Die organischen Verbindungen, die mit diesem Ammonium von der Pflanze generiert werden, können entweder als Amide (Asparagin und Glutamin) oder als Ureide (Allantoin und Allantoat) zu den überirdischen Teilen der Pflanze durch das Xylem exportiert werden (Herridge *et al.*, 1978). Dementsprechend werden Leguminosen bezüglich der Komponenten, die sie für die Mobilisierung des bakteriell fixierten Stickstoffs verwenden, als Amid- oder Ureidexporter klassifiziert (Schubert, 1986). Weiterhin sind Pflanzen dazu fähig, bereits assimilierten Stickstoff effizient innerhalb der Pflanze umzuverteilen. So werden stickstoffhaltige Verbindungen aus alten Geweben (*sources*) abgebaut, um den Stickstoff für die Entwicklung neuer, junger Gewebe (*sinks*) zu verwenden. Die Ureide

Allantoin und Allantoat sind hierbei Zwischenprodukte des Abbaus von Purinnukleotiden. Die Ureide werden entweder vollständig abgebaut und der Purinringstickstoff als Ammoniak freigesetzt und reassimiliert oder sie werden als Stickstoffspeicher eingelagert (Reinbothe und Mothes, 1962). Ferner können Ureide als einzige äußere Stickstoffquelle von Pflanzen verwendet werden (Desimone *et al.*, 2002; Pelissier *et al.*, 2004) und sollen auch eine wichtige Rolle beim Entgiften reaktiver Sauerstoffspezies in Pflanzen übernehmen (Brychkova *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2010). Die Funktion der Ureide in Pflanzen ist also vielfältig, denn sie beinhaltet eine Rolle in der Stickstoffremobilisierung, die Nutzung als Stickstoffquelle, die Verwendung als Exportform, den Einsatz als Stickstoffspeicher und den Zellschutz. Für ein Verständnis der vielfältigen Funktionen der Ureide in Pflanzen ist die Untersuchung des Ureidmetabolismus von zentraler Bedeutung, vor allem im Hinblick auf die Nutzungseffizienz von Stickstoff in Pflanzen.

Generell ist für den Abbau von Allantoin nur ein Enzym bekannt: die Allantoinase (ALN). Dem entgegen können sowohl Allantoat als auch Ureidoglykolat über zwei verschiedene Klassen von Enzymen abgebaut werden (Abbildung 4). Die Klasse der Amidinohydrolasen (Allantoicase

(ALC) und Ureidoglykolat Urea Hydrolase (UUH)) ist harnstofffreisetzend, wohingegen die Klasse der Amidohydrolasen (Allantoat Amidohydrolase (AAH) und Ureidoglykolat Amidohydrolase (UAH)) Ammoniak und Kohlenstoffdioxid freisetzt. Bei der Allantoat Amidohydrolase wird hierbei ein Intermediat (Ureidoglycin) angenommen (Trijbels und Vogels, 1966a), da zwei hydrolytische Schritte benötigt werden, um unter Ammoniakfreisetzung Ureidoglykolat zu produzieren.

Der Abbau der Ureide in Pflanzen wurde seit Langem untersucht, aber die beteiligten Enzyme sind nur zum Teil identifiziert. So wurden Allantoinasen (ALNs) beschrieben und ihre Gene kloniert (Yang und Han, 2004) und auch Allantoat Amidohydrolasen (AAHs) identifiziert, kloniert und die Proteine biochemisch charakterisiert (Todd und Polacco, 2006; Werner *et al.*, 2008). Die ersten Ureidoglykolat Amidohydrolasen (UAHs) wurden in unserem Labor identifiziert, kloniert und die Enzyme biochemisch charakterisiert (Werner, 2007; Przybycin, 2008; Werner *et al.*, 2010).

Bei laborinternen Experimenten, die nachweisen sollten, dass in Pflanzen Allantoat durch die beiden ammoniakfreisetzenden Amidohydrolasen abgebaut wird, zeigte sich, dass die AAH und UAH nicht ausreichen, um den gesamten Stickstoff aus Allantoat freizusetzen, und

dass es ein weiteres Enzym geben muss, welches am Ureidabbau beteiligt ist. Die vollständige enzymatische Beschreibung des Ureidabbaus und die Untersuchung der *in vivo* Funktion und Relevanz der UAHs in Pflanzen stellten die Hauptziele dieser Arbeit dar.

5.1 Die Enzyme

Das überraschendste Ergebnis in dieser Arbeit war, dass Ureidoglykolat nicht das Reaktionsprodukt der AAH ist (Abbildung 6). Dies war seit über 40 Jahren eine zentrale Komponente im Modell des Ureidabbaus. In den siebziger Jahren wurde exzellente Forschung (durch Trijbels, Vogels und van der Drift) am bakteriellen Ureidabbau betrieben, die einen großen Teil des Wissens generierte. Diese Forscher vermuteten zunächst, dass das Reaktionsprodukt der AAH Ureidoglycin sei (Trijbels und Vogels, 1966a; Vogels, 1966). Später postulierten sie, dass das Reaktionsprodukt der AAH Ureidoglykolat sei, welches über das Intermediat Ureidoglycin generiert werde (van der Drift *et al.*, 1970).

Diese Auffassung wurde im Forschungsfeld akzeptiert aber nie experimentell bestätigt. Durch die Herstellung rekombinanter AAH war es später möglich, die genaue Reaktion isoliert zu untersuchen. Allerdings wurde

auch in unserem Labor, wo diese Untersuchung mit Enzymen aus Arabidopsis und Sojabohne zuerst gelang, zunächst das ursprüngliche Modell nicht angezweifelt (Werner *et al.*, 2008). Auch hier wurde davon ausgegangen, dass Ureidoglykolat das Endprodukt der AAH-Reaktion sei, so dass erst der spätere Misserfolg der Darstellung des Gesamtumsatzes zusammen mit der UAH zur genaueren Untersuchung der Reaktionsprodukte der AAH führte.

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass Ureidoglycin tatsächlich im Ureidabbau gebildet wird, aber nicht als Intermediat, sondern als Endprodukt der AAH-Reaktion (Abbildung 23, Werner *et al.*, 2010). Dies erklärte die fehlende Reaktionsfolge der AAH und der UAH, da die AAH nicht das Substrat der UAH generiert.

Die logische Folge aus diesen Ergebnissen war die Suche nach einem Enzym, das Ureidoglycin in Ureidoglykolat unter Ammoniakfreisetzung überführt. Dieses Enzym wurde mit Hilfe einer umfassenden vergleichenden Genomanalyse aufgrund seiner genetischen Verbindung zur *AAH* und dem gemeinsamen Vorkommen in bakteriellen Genomen identifiziert (Werner *et al.*, 2010). Dieses Enzym kann Ureidoglykolat produzieren (Abbildung 14), verwendet dabei aber nicht Allantoat als Substrat (Abbildung 22) sondern das

Reaktionsprodukt der AAH – Ureidoglycin. Es handelt sich daher um eine Ureidoglycin Aminohydrolase (UGlyAH), die aus Ureidoglycin unter Ammoniakfreisetzung Ureidoglykolat produziert (Abbildung 22). Die UGlyAHs aus Arabidopsis und *E. coli* wurden unabhängig von einer zweiten Forschergruppe identifiziert und untersucht (Serventi *et al.*, 2010). Sie bestätigen die hier dargestellten Ergebnisse der UGlyAH in Bezug auf ihre Aktivität und Lokalisation im ER. Darüber hinaus konnten sie eine Manganabhängigkeit der UGlyAH nachweisen und postulierten, dass es sich bei dem nativen Enzym um ein Monomer handeln würde (Serventi *et al.*, 2010). Dies steht in Kontrast zum Ergebnis der Interaktionsstudie dieser Arbeit, welches auf eine multimere Form der *AtUGlyAH* hinweist (Abbildung 26). Erst kürzlich wurde dies durch die Kristallstruktur der *AtUGlyAH* bestätigt (Shin *et al.*, 2012). Es wird beschrieben, dass die native *AtUGlyAH* ein Oktamer ist, mit Mangan als molekularem Anker, um Ureidoglycin zu binden. Darüber hinaus wurde ein K_m -Wert von 1,77 mM, ein k_{cat} -Wert von 761 s^{-1} und eine katalytische Effizienz von $4,3 \cdot 10^5 \text{ (s}\cdot\text{M)}^{-1}$ bestimmt. Diese Werte liegen im Bereich der Werte der anderen ureidabbauenden Enzyme aus Arabidopsis (Tabelle 14). Die Reaktion der UGlyAH mit Ureidoglycin, um Ureidoglykolat zu generieren, ist essentiell

in Bezug auf die Reaktion der UAH, die Ureidoglykolat umsetzt, um aus diesem Glyoxylat unter Ammoniakfreisetzung zu bilden (Abbildung 6).

So kann unter Verwendung der AAH, UGlyAH und UAH / UUH der vollständige Abbau des Allantoats *in vitro* mit aufgereinigten Enzymen erreicht werden. Dies gelang mit den Enzymen der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* (Abbildung 22), des mikrobiologischen Modellorganismus *Escherichia coli* (Abbildung 21), der monokotylen Pflanze *Oryza sativa* (Abbildung 34) und der tropischen Leguminose *Glycine max* (Abbildung 36).

Ein Hinweis auf ein weiteres Intermediat (Hydroxyglycin) konnte hierbei leider nicht gefunden werden, wobei von diesem als eigentlichem Reaktionsprodukt der UAH auszugehen ist (Werner und Witte, 2011). Die AAH hydrolysiert eine Amidgruppe des Allantoats. Daher ist es möglich, dass die strukturell ähnliche UAH die Amidgruppe des Ureidoglykolats hydrolysiert und somit eigentlich Hydroxyglycin produziert (Abbildung 46). Dieses zerfällt dann *in vitro* nicht-enzymatisch zu Glyoxylat und Ammoniak. Es ist möglich, dass es ein Enzym gibt, welches *in vivo* den Hydroxyglycinabbau katalysiert. Bei diesem Enzym sollte auch in Betracht gezogen werden, dass es möglicherweise nicht Glyoxylat produziert.

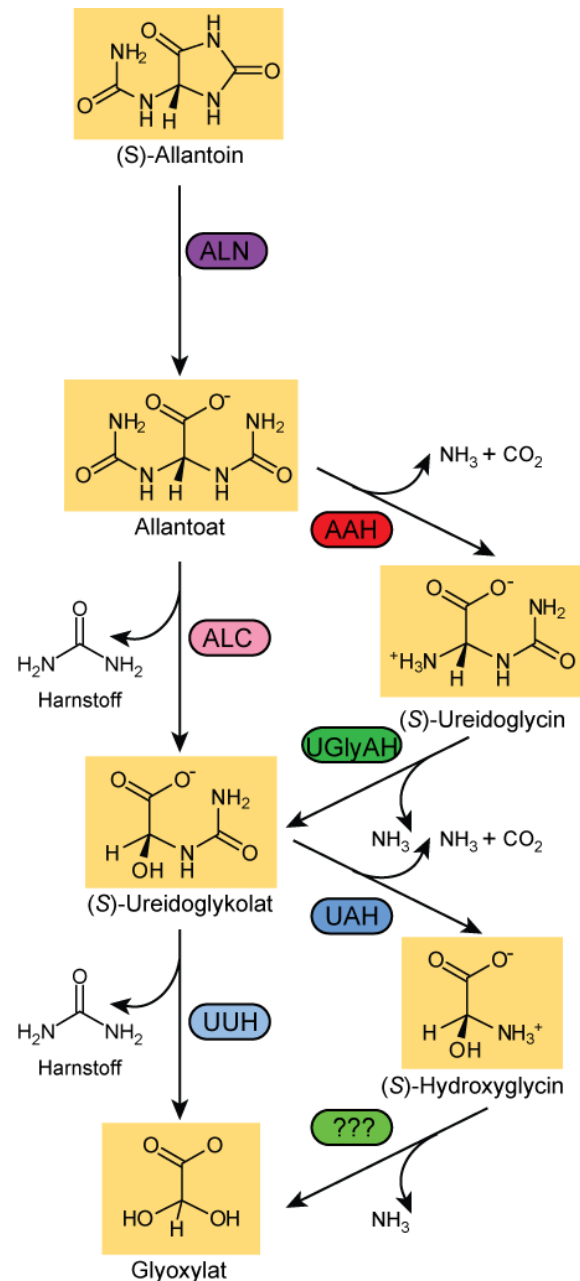


Abbildung 46 - der neue Ureidabbau

Das Ureid Allantoin wird durch die Allantoinase (ALN) zu Allantoat hydrolysiert. Allantoat kann entweder durch die harnstoffreisetzende Allantoicase (ALC) direkt zu Ureidoglykolat oder zunächst durch die ammoniakreisetzende Allantoat Amidohydrolase (AAH) zu Ureidoglycin und anschließend durch die Ureidoglycin Aminohydrolase (UGlyAH) zu Ureidoglykolat abgebaut werden. Ureidoglykolat kann ähnlich wie Allantoat entweder durch eine harnstoffreisetzende Ureidoglykolat Urea Hydrolase (UUH) direkt zu Glyoxylat oder durch eine ammoniakreisetzende Ureidoglykolat Amidohydrolase (UAH) zunächst zu Hydroxyglycin und dann zu Glyoxylat abgebaut werden.

Durch die harnstofffreisetzende UUL wird enzymatisch Glyoxylat aus Ureidoglykolat produziert (Abbildung 21) und Glyoxylat wird auch in intakten Sojabohnenblättern als Produkt des Allantoatabbaus beschrieben (Winkler *et al.*, 1988b). Allerdings könnten durch eine Variation des Hydroxyglycinabbaus verschiedene Produkte entstehen. So ist es möglich, durch die Aktivität einer Hydrolase Ammoniak und Glyoxylat, durch eine Reduktase Glycin und durch eine Transaminase Glyoxylat und eine Aminosäure zu produzieren. Für die Identifikation des Enzyms müssen sowohl die Bildung des Hydroxyglycins durch die UAH als auch das *in vivo* Endprodukt des Ureidabbaus in Pflanzen untersucht werden. Zusammenfassend führen die Daten dieser Arbeit zu einem neuen Bild über die Anzahl und Art der ureidabbauenden Enzyme, welches das alte Modell des Ureidabbaus teilweise ersetzt und erweitert (Abbildung 46).

5.2 Ureidabbau in Pflanzen

Für den Ureidabbau in Pflanzen wurde nach Messungen mit markiertem Allantoat in Samenschalenextrakten von Sojabohnen vermutet, dass Allantoat durch einen Enzymkomplex, der sowohl eine Allantoat

Amidohydrolase Aktivität als auch eine Ureidoglykolat Amidohydrolase Aktivität enthalten soll, abgebaut wird (Winkler *et al.*, 1988b). Diese Vermutung wurde dadurch unterstützt, dass Ureidoglykolat *in vivo* nicht akkumuliert (Winkler *et al.*, 1987). Dies wurde auch in den hier dargestellten Experimenten beobachtet (Abbildung 39; Abbildung 40; Abbildung 43 und Abbildung 45). Allerdings konnte in der Interaktionsstudie kein Hinweis auf eine Interaktion der allantoatabbauenden Enzyme gefunden werden (Abbildung 26). Möglich wäre ein solcher Komplex, da alle ureidabbauenden Enzyme im ER lokalisiert sind (Abbildung 24, Werner *et al.*, 2008; Serventi *et al.*, 2010 und laborinterne Daten) und er darüber hinaus die Geschwindigkeit des Ureidabbaus erhöhen und den Zerfall der instabilen Intermediate verhindern würde. Auch Allantoat ist kaum detektierbar, wohingegen ein gewisser Allantoingehalt stets gemessen werden konnte (Abbildung 43 und Abbildung 45). Dies könnte auf einen Komplex hindeuten, der die ALN mit einschließt. Vielleicht wird diese benötigt, um den Komplex auszubilden oder möglicherweise müssen alle Enzyme anwesend sein, um den Komplex zu stabilisieren, so dass er in der Interaktionsstudie, die nur paarweise und ohne ALN durchgeführt wurde, nicht nachweisbar war. Der Komplex könnte darüber hinaus die Enzyme stabilisieren, da

ein geringerer Proteingehalt der ALN und der UGlyAH in Sojabohnenextrakten detektiert werden konnte, wenn die UAH fehlte (Abbildung 41). Dies gilt auch für die AAH, die zwar nicht detektiert werden konnte, aber metabolomisch führte der Verlust der UAH auch zu einer stärkeren Akkumulation von Allantoat (Abbildung 40). Darüber hinaus besitzen entweder die ALNs oder die AAHs möglicherweise einen Signalanker, der sie an die ER-Membran bindet (siehe Anhang Tabelle 20). Eine solche Membranbindung der ALNs konnte in Blättern der Sojabohne gefunden werden (Thomas *et al.*, 1983). Diese ALN-Bindung an die ER-Membran könnte die Ausbildung des Komplexes *in vivo* ermöglichen und die Komponente sein, die *in vitro* fehlt. Eine Membranbindung der ALNs könnte ferner die schlechten Aufreinigungsergebnisse und möglicherweise auch die beobachtete Instabilität der ALNs erklären (Daten nicht gezeigt). Gegen einen Enzymkomplex *in vivo* sprechen drei Dinge. Erstens weichen die enzymkinetischen Parameter der Enzyme stark voneinander ab (Tabelle 14; Tabelle 15; Tabelle 18 und Shin *et al.*, 2012). Man kann die Enzyme des Ureidabbaus in zwei verschiedene Gruppen bezüglich der Regulation ihrer Aktivität einteilen. Die erste Gruppe (ALN und UGlyAH) besitzt eine sehr hohe Katalysegeschwindigkeit (k_{cat}) und einen sehr hohem K_m -Wert.

Dagegen zeigt die zweite Gruppe (AAH und UAH) eine geringere Katalysegeschwindigkeit auf, besitzt aber auch einen sehr niedrigen K_m . Die Geschwindigkeit der Katalyse ist wie folgt verteilt: $ALN > UGlyAH \ggg AAH > UAH$. In einem Komplex, in dem alle Enzyme äquimolar vorliegen, könnte eine solche Geschwindigkeitsverteilung zur Akkumulation der Substrate im Komplex führen. Wenn die Substratmenge sehr hoch ist (im unteren millimolaren Bereich), hängen die Enzymgeschwindigkeiten nur vom jeweiligen k_{cat} ab. In diesem Fall würden Allantoat und Ureidoglykolat akkumulieren. Bei geringeren Substratkonzentrationen (im unteren mikromolaren Bereich) ist die katalytische Effizienz ein Maß für die jeweilige Enzymgeschwindigkeit. Die katalytische Effizienz der Enzyme ist wie folgt verteilt; $AAH > UAH > UGlyAH > ALN$, wobei die Geschwindigkeiten direkt von der jeweiligen Ureidkonzentration abhängen. Diese Variante wäre prinzipiell vorstellbar, da geringe Konzentrationen eher physiologisch sind und somit das langsamste Enzym den Eingang in den Komplex darstellen würde. Nun ist es natürlich auch möglich, dass der Enzymkomplex nicht nur die Proteine stabilisiert, sondern auch ihre Einzelaktivitäten steigert, so dass die Werte, die *in vitro* unter bestimmten

Bedingungen gemessen wurden nicht mit den *in vivo* Aktivitätsdaten übereinstimmen. Zweitens spricht das native Molekulargewicht der Enzyme zumindest gegen einen äquimolaren Komplex. Die Allantoinase (aus *E. coli*) ist ein Homotetramer (Kim *et al.*, 2009), wohingegen die AAH (Agarwal *et al.*, 2007; Werner *et al.*, 2008) und die UAH (laborinterne Daten) Homodimere sind. Für die UGlyAH wird eine oktamere Form beschrieben (Shin *et al.*, 2012). Dies würde bedeuten, der Komplex besteht aus einem Tetramer, einem Dimer gefolgt von einem Oktamer und wieder einem Dimer. Dies würde die Aktivität der ALNs und UGlyAHs überproportional erhöhen im Vergleich zur AAH und UAH. Drittens und entscheidend spricht das unterschiedliche Proteinniveau der Enzyme in der Pflanze (Abbildung 31; Abbildung 41; Abbildung 42; und Abbildung 44) gegen einen Komplex. Während der Gehalt an UAH im Extrakt meist sehr hoch ist, ist die Proteinmenge der ALN und UGlyAH eher moderat. Dem entgegen ist die AAH auf der Proteinebene nur so schwach vorhanden, dass sie bisher nicht detektiert werden konnte. Bei einem äquimolaren Komplex sollte der Gehalt aller nativen Enzyme ungefähr gleich hoch sein, da sie nur zusammen den stabilen Komplex ausbilden können. Dies bedeutet, das Proteinniveau der UGlyAH müsste am höchsten sein, da sie mit acht Monomeren am Komplex

beteiligt ist, gefolgt von der ALN mit vier Monomeren und der AAH und UAH mit jeweils zwei Monomeren. Dies entspricht nicht dem jeweiligen Proteingehalt, der in den Extrakten detektiert werden konnte. Das tatsächliche Proteinniveau der Enzyme könnte nur mit einem Komplex erklärt werden, in dem zwar alle Enzyme enthalten sind, aber nicht in äquimolaren Mengen. Wahrscheinlicher ist es deshalb, dass die Enzyme keinen Komplex bilden und dass die beobachteten Phänomene sich anders begründen. So könnte der vergleichsweise hohe Proteingehalt der UAH ihre geringere Katalysegeschwindigkeit ausgleichen oder sogar erhöhen in Bezug auf die anderen Enzyme. Dies würde auch erklären, warum Ureidoglykolat nicht akkumuliert. Dies gilt umgekehrt auch für die AAH. Das katalytisch effizienteste Enzym liegt in der geringsten Proteinmenge vor. Dieses geringe Proteinniveau bei sehr hoher Enzymeffizienz reicht aus, um eine Akkumulation von Allantoat zu verhindern. Nur bei einem plötzlichen Metabolitanstieg (wie im Fall der Versorgung mit 10 mM Allantoin) reicht dieses geringe Proteinniveau nicht aus, um einen schnellen Abbau zu gewährleisten und Allantoat akkumuliert. Im Gegensatz dazu ist der Gehalt an UAH-Proteinen wahrscheinlich so hoch, dass selbst die Maximalauslastung der AAH-Aktivität nicht zur Überlastung der UAH-Aktivität und damit zur

Akkumulation von Ureidoglykolat führt (Abbildung 39 und Abbildung 40). Die UGlyAH ist etwa halb so effizient wie die AAH. Der hohe Proteingehalt an UGlyAH im Gegensatz zur undetektierbaren AAH könnte auch hier den entsprechenden Aktivitätsausgleich schaffen. So könnte mit Hilfe der Proteinmenge eine ausgeglichene enzymatische Aktivität über den gesamten Ureidabbau erreicht werden.

Die Reduzierung des Proteingehalts an ALNs und UGlyAHs, wenn die UAH in Sojabohne fehlt (Abbildung 41), könnte auf eine negative Rückkopplung innerhalb des Ureidabbaus zurückzuführen sein. Auch der verminderte Allantoin- oder Allantoat-gehalt, der in Arabidopsis *UAH*- Mutanten beobachtet wurde (Abbildung 30), deutet auf eine negative Rückkopplung hin, die in diesem Fall oberhalb der ALN in den Purinabbau eingreifen müsste. Die Transkriptmengen der ALNs, AAHs und UGlyAHs sind in Sojabohnen unverändert, wenn die UAH stummgeschaltet wurde (Daten von Dr. Nieves Medina Escobar). Dies deutet auf eine Regulation des Proteingehaltes auf der Translationsebene oder der Ebene des Proteinabbaus hin.

Interessanterweise lassen sich die ureidabbauenden Enzyme in ihrem Proteinniveau sowohl in Arabidopsis als auch in Sojabohne nicht durch die verschiedenen Stickstoffquellen bzw. durch Stickstoffmangel induzieren (Abbildung 31 und

Abbildung 44). Für die ALN aus Arabidopsis konnte eine transkriptionelle Hochregulation durch Stickstoffmangel gefunden werden (Werner *et al.*, 2008), welche sich im Proteingehalt nicht widerspiegelt. Dies weist entweder daraufhin, dass es experimentelle Unterschiede zwischen den Versuchen gab, oder dass eine höhere Transkriptakkumulation nicht zu einem erhöhten Proteingehalt an ALN führte. Eine Wiederholung dieser Experimente bei gleichzeitiger Messung von mRNA-, Protein- und Metabolitgehalten wäre daher nötig.

Die Datenlage deutet bisher darauf hin, dass die Enzyme des Ureidabbaus unabhängig von der Stickstoffquelle konstitutiv exprimiert werden und möglicherweise keiner transkriptionellen und translationellen Regulation unterliegen. Nicht auszuschließen ist jedoch, dass eine Regulation auf der Aktivitätsebene zum Beispiel über posttranslationale Modifikationen oder die Verfügbarkeit des Kofaktors erfolgt (Mangan im Fall der AAH, UGlyAH und UAH).

Im Gegensatz zu den unterschiedlichen Stickstoffquellen bzw. zu Stickstoffmangel, führt das Altern eines Blattes zu Veränderungen im Proteingehalt der ureidabbauenden Enzyme. Während in Arabidopsis das Proteinniveau der ALN mit dem Blattalter und dem damit verbundenen Gesamtproteingehalt abnimmt, bleibt der

UAH-Gehalt fast konstant (Abbildung 31). In Sojabohne hingegen bleibt die Proteinmenge der ALNs bis zur Seneszenz fast konstant, wohingegen der UGlyAH- und UAH-Gehalt abnimmt und in der Seneszenz kaum noch zu detektieren ist (Abbildung 42). Dies weist möglicherweise auf einen unterschiedlichen Export des Purinringstickstoffs bei Pflanzen in der Seneszenz hin. Eine mögliche Interpretation ist, dass Ureide in Arabidopsis vollständig unter Ammoniakfreisetzung abgebaut werden und der Purinringstickstoff in Form von Amidin über das Phloem aus seneszentem Gewebe exportiert wird. Im Gegensatz dazu exportiert die Sojabohne möglicherweise das Ureid Allantoat, da die UGlyAH und die UAH in seneszentem Gewebe kaum noch exprimiert sind. Diese Vermutung wird durch Daten von Layzell und LaRue, 1982 gestützt, die im Petiolenphloem von Sojabohnen Allantoat aber kaum Allantoin gemessen haben, unabhängig davon, ob die Pflanze fixierten Stickstoff assimilierte oder nicht.

5.3 *In vivo* Funktion und Relevanz

Mit Hilfe der Phänotypenanalyse (Abbildung 27) und der Metabolitanalyse (Abbildung 30) konnte für Arabidopsis gezeigt werden, dass der Ureidabbau durch

die ALN, AAH und UAH vermittelt wird. Diese Schlussfolgerung kann aus folgenden Beobachtungen gezogen werden: 1. Der jeweilige Enzymverlust führt zu einer Unfähigkeit bzw. verminderten Fähigkeit der Pflanze, Ureide als Stickstoffquelle zu nutzen. 2. In den jeweiligen Enzymverlustmutanten akkumuliert der entsprechende Metabolit, der *in vitro* als jeweiliges Substrat nachgewiesen wurde. 3. Die Überexpression der jeweiligen Enzyme führt zu einer Reduzierung des entsprechenden Substratgehaltes und zu einer besseren der Nutzung von Ureiden als Stickstoffquelle. Somit entspricht die *in vitro* Aktivität der Enzyme wahrscheinlich auch ihrer *in vivo* Funktion. Unterstützt wird diese Aussage auch durch die gemessenen enzymkinetischen Parameter der Enzyme, die im Bereich der Parameter anderer Enzyme mit deren jeweiligem *in vivo* Substrat liegen (z.B. Rubisco und Glutaminsynthetase, BRENDA). Die K_m -Werte der Enzyme liegen im Größenordnungsbereich der Metabolitkonzentrationen, die in Arabidopsis und Sojabohne gemessen wurden. So ergaben sich in Arabidopsis Konzentrationen von 0,1 μmol beziehungsweise 0,05 μmol pro Gramm Frischgewicht für Allantoin und Allantoat (siehe Anhang Abbildung 52) während in Sojabohne 3 μmol beziehungsweise 4 μmol pro Gramm Frischgewicht detektiert wurden

(Abbildung 45). Bei einer hypothetischen Gleichverteilung der Metabolite im Blatt ergeben sich hieraus Konzentrationen, die im Bereich der K_m -Werte liegen. Allerdings ist davon auszugehen, dass die Konzentrationen lokal im Blatt noch wesentlich höher sind. Somit kann das *in vitro* Substrat der Enzyme auch ihr *in vivo* Substrat sein.

Die Art der ureidabbauenden Enzyme in Leguminosen ist seit Langem umstritten (für Reviews siehe Winkler *et al.*, 1988a; Todd *et al.*, 2006; Witte, 2011). Während einige Forschergruppen zeigen konnten, dass der Ureidabbau in Leguminosen ohne Harnstoffintermediat verläuft (Polacco *et al.*, 1982; Winkler *et al.*, 1985; Winkler *et al.*, 1987; Winkler *et al.*, 1988b; Stahlhut und Widholm, 1989; Wells und Lees, 1991; Stebbins und Polacco, 1995), behaupten andere, eine harnstofffreisetzende Ureidoglykolat Urea Hydrolase gefunden zu haben (Munoz *et al.*, 2001; Munoz *et al.*, 2006) und die Bildung von Harnstoff im Ureidabbau belegen zu können (Shelp und Ireland, 1985; Vadez und Sinclair, 2000; Todd und Polacco, 2004). Diese Ergebnisse wurden bisher durch Rohextraktmessungen, Messungen mit intakten Blättern oder klassisch-biochemisch aufgereinigten Enzymen erhalten. Diese gereinigten Enzyme aus *Cicer arietinum* und *Phaseolus vulgaris* wurden jedoch weder genetisch identifiziert noch lokalisiert und ihre

Aktivitäten konnten nicht ohne Phenylhydrazin bestimmt werden. Später entdeckten die Autoren, dass diese vermeintlichen Ureidoglykolat Urea Hydrolasen keinen Harnstoff und Glyoxylat produzieren, sondern Ureidoglykolat auf Phenylhydrazin transferieren – eine Substanz, die es in Pflanzen nicht gibt (Munoz *et al.*, 2011). Somit konnte bisher keine UUH-Aktivität mit einem pflanzlichen Protein gezeigt werden.

Im Gegensatz dazu wurde die *in vivo* Funktion und Relevanz für die beiden ammoniakfreisetzenden Enzyme in Arabidopsis (Todd und Polacco, 2006; Werner *et al.*, 2008 und diese Arbeit) und für die ammoniakfreisetzende UAH der Sojabohne (diese Arbeit) gezeigt. Obwohl die Bestätigung der *in vivo* Relevanz des ammoniakfreisetzenden Allantoatabbaus schritts in Sojabohne noch fehlt, ist diese wahrscheinlich, da die *in vivo* Funktion der GmAAH in Arabidopsis bestätigt wurde (Werner *et al.*, 2008 und diese Arbeit). Der Ureidabbau in Leguminosen wird wie der Ureidabbau in Arabidopsis vermutlich von den ammoniakfreisetzenden Enzymen AAH, UGlyAH und UAH vermittelt, da 1. Diese im Gegensatz zu harnstofffreisetzenden Enzymen genetisch identifiziert werden konnten. 2. Ihre Aktivität mit den reinen Enzymen *in vitro* nachgewiesen wurde. 3. Sie im ER lokalisiert werden konnten (Werner *et al.*,

2008 und laborinterne Daten), wo auch die jeweils anderen ureidabbauenden Enzyme lokalisiert wurden. 4. Ihre enzymkinetischen Parameter eine *in vivo* Funktion ermöglichen und 5. Ureidoglykolat akkumuliert, wenn die UAH fehlt.

Da keiner dieser Punkte für ein harnstofffreisetzendes Enzym aus Sojabohne oder einer anderen Pflanze gezeigt werden konnte, ist mithilfe dieser Arbeit der heutige Stand des Wissens, dass es nur den AAH- und UAH-vermittelten Abbauweg in Sojabohnen und wahrscheinlich auch in allen anderen Pflanzen gibt. Diese Generalisierung für alle Pflanzen ist deshalb wahrscheinlich, da orthologe Gene für diese Enzyme in allen Pflanzen vorhanden sind, für die die vollständige Genomsequenz veröffentlicht wurde (Witte, 2011).

5.4 Die Enzyme der Sojabohne

Da es sich bei Sojabohnen um palaeopolyploide Pflanzen handelt, bei denen es zu zwei Genomduplikationsereignissen gekommen ist, liegen 75% der Gene in multiplen Kopien vor (Schmutz *et al.*, 2010). Aus diesem Grund sind in Sojabohnen vier ALNs, zwei AAHs, zwei UGlyAHs und zwei UAHs im Genom kodiert. Die *in silico* Analyse konnte die

zweite UAH als funktionelles Enzym ausschließen, wohingegen die biochemische Untersuchung Hinweise auf einen möglichen Ausschluss zweier Allantoinasen geben konnte. Die *GmALN 3* und *GmALN 4* sind aufgrund ihrer ungünstigen enzymkinetischen Parameter womöglich *in vivo* nicht funktionell, so dass nur *GmALN 1* und *GmALN 2* für den Allantoinumsatz in Sojabohne relevant sein könnten.

Dieses Ergebnis wird durch laborinterne Daten von Dr. Nieves Medina Escobar unterstützt, die nachweisen konnte, dass die 5'UTRs der *GmALN 3* und *GmALN 4* nur eine Länge von 10 Nukleotiden besitzen, was auch durch EST-Daten gestützt wird. Sehr kurze 5'UTR Sequenzen (< 20 Nukleotide) führen zu einer ineffektiven Translation der RNA (Kawaguchi und Bailey-Serres, 2005), so dass die Transkription dieser beiden Gene wahrscheinlich nicht oder nur kaum zu den entsprechenden Proteinen führt.

Zwei biochemisch unterscheidbare Allantoinasen in Sojabohnen wurden auch von Bell und Webb, 1995 in Knöllchen und Kotyledonen beschrieben. Allerdings zeigen die publizierten N-terminalen Sequenzdaten, dass es sich bei den beiden Formen wahrscheinlich um die *GmALN 2* handelte, die bei der Enzymreinigung vermutlich proteolytischer Spaltung ausgesetzt war. Dass es sich hier um die

GmALN 2 sowohl im Knöllchen als auch in den Kotyledonen handeln könnte, wird auch durch laborinterne RT-PCR Daten von Dr. Nieves Medina Escobar unterstützt. Sie konnte zeigen, dass für die *GmALN 2* sehr hohe und konstitutive Transkriptmengen in allen Geweben der Sojabohne akkumulieren, während für die *GmALN 1* geringere und die *GmALN 3* und *GmALN 4* kaum Transkripte nachgewiesen werden konnten. Dies deutet auf eine ubiquitäre, stark exprimierte *GmALN 2* hin, was sich sowohl mit den Aktivitätsdaten (siehe Tabelle 18) als auch mit den nativen Proteinniveaus (siehe Abbildung 42 und Abbildung 44) verknüpfen lässt, obwohl die verschiedenen Paralogen in diesen Messungen des Proteinniveaus nicht unterschieden werden können. Allerdings ist aufgrund der höheren Transkriptmenge für die *GmALN 2* von einer vergleichbar höheren Proteinmenge in Bezug auf die *GmALN 1* auszugehen. Auch die Gene der beiden *GmAAHs* und *GmUGlyAHs* werden transkribiert, wobei für die *GmAAH 1* und *GmUGlyAH 1* höhere Transkriptmengen akkumulierten als für ihre korrespondierenden Kopien (RT-PCR Daten von Dr. Nieves Medina Escobar). So könnte auch hier eine der beiden Genkopien vorrangig transkribiert werden und so als Protein die hauptsächliche Funktion in der Pflanze übernehmen. Wenn man die erhöhte Transkriptakkumulation für die *GmALN 2*,

GmAAH 1 und *GmUGlyAH 1* mit den auch jeweilig höheren katalytischen Effizienzen der korrespondierenden Enzyme verknüpft (für die *GmUGlyAHs* nicht untersucht), dann könnte dies vielleicht auf eine Funktion dieser Proteine als hauptsächlich aktive Enzyme im Ureidabbau hinweisen. Es ist möglich, dass jeweils beide Paraloge zum Ureidabbau in Sojabohne beitragen, wenn auch mit unterschiedlichen Anteilen. Fakt ist, dass außer für die beiden UAHs jeweils zwei Gene für jedes Enzym transkribiert werden, prinzipiell zu einer translatierbaren mRNA führen und die möglicherweise *in vivo* entstehenden Proteine auch eine vergleichbare Aktivität aufweisen. Es ist vorstellbar, dass es zwei aktive Paraloge gibt, um eine höhere Gesamtaktivität bereitzustellen, oder die Paralogen sind unterschiedlich reguliert. Alternativ könnte seit den Genomduplikationen noch nicht genug Zeit vergangen sein, um eines der Paralogen stumm zu schalten, so wie es im Fall der *GmUAH 2* geschehen ist.

5.5 Der Ureidabbau allgemein

Die Reaktionen des Ureidabbaus können durch verschiedene Enzyme katalysiert werden. Es gibt die harnstofffreisetzenden und die ammoniakfreisetzenden Enzyme,

die je nach Organismus auch gemischt vorliegen können (Tabelle 19).

Tabelle 19: die Enzyme des Ureidabbaus in verschiedenen Organismen

	Hefe	E. coli	Pflanzen
Allantoat	ALC	AAH + UGlyAH	AAH + UGlyAH
Ureidoglyk.	UUH	UUH	UAH

Darüber hinaus sind noch weitere Enzyme bekannt, die am Ureidabbau beteiligt sind. So wurden Ureidoglycin Transaminasen in *Klebsiella pneumoniae* und *Bacillus subtilis* (French und Ealick, 2010; Ramazzina *et al.*, 2010) und eine Ureidoglykolat Dehydrogenase in *E. coli* (Cusa *et al.*, 1999) identifiziert und charakterisiert. Dies zeigt, dass ureidabbauende Enzyme aus mehreren evolutiven Entwicklungen stammen, was in verschiedenen Organismen zu unterschiedlichen metabolischen Wegen für die Umsetzung der Ureide geführt hat.

Es wird angenommen, dass der Ureidabbau seine Funktion im Stickstoffrecycling besitzt, wobei auch der Kohlenstoff in Form von Glyoxylat wiederverwertet wird. Das in Pflanzen durch den Ureidabbau gebildete CO₂ soll hingegen verloren gehen (Coker und Schaefer, 1985).

Pflanzen ohne Ureidabbau sind phänotypisch im Labor unter experimentellen Bedingungen kaum vom Wildtyp zu unterscheiden (Daten nicht gezeigt). Im

Gegensatz dazu sind Pflanzen in der Natur, wo die Verfügbarkeit von Stickstoff stark limitierend auf das Wachstum wirkt, von einer Wieder-verwertung aller Stickstoffverbindungen abhängig. Daher ist der Ureidabbau in allen Pflanzen hoch konserviert.

Darüber hinaus sollen die Ureide eine Funktion in der Entgiftung reaktiver Sauerstoffspezies haben (Brychkova *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2010). Dies ließe sich weiterführend anhand der vorhandenen Enzymverlustmutanten in Arabidopsis untersuchen, die die Ureide akkumulieren oder auch mit Hilfe der Überexpressionslinien, die ein deutlich geringeres Ureidniveau aufzeigen und unfähig sein sollten, die Ureide bei Stress zu akkumulieren.

5.6 Ausblick

Um die *in vivo* Funktion und Relevanz der ureidabbauenden Enzyme in Sojabohne vollständig zu beschreiben, sollten auch die *GmALNs*, *GmAAHs* und *GmUGlyAHs* mittels Virus-induzierter Genabschaltung (VIGS) in ihrem Transkriptniveau herunter reguliert werden. Der Vorteil dieses Systems liegt darin, dass die für die Stummschaltung verwendete DNA-Sequenz der Zielgene zwischen allen Kopien eines Genes so ähnlich ist, dass alle

Transkripte der Paralogen herunter reguliert werden können. Bei vier Allantoinasen ist das ein Vorteil im Vergleich zu Einzelgenmutationen wie z.B. mittels T-DNA Insertion. Die Konstrukte hierfür wurden bereits für die *GmALNs* und *GmAAHs* von Dr. Nieves Medina Escobar bereitgestellt (siehe Material) und erste Versuche zur Stummschaltung dieser Gene unternommen. Auch bei diesen VIGS-Experimenten könnte zunächst mittels Allantoinversorgung über die Petiolen überprüft werden, ob der entsprechende Metabolit im Blatt akkumuliert, wenn der Proteingehalt des jeweiligen Enzyms im Rohextrakt reduziert wurde. Wäre dies der Fall, würde es die *in vivo* Funktion und Relevanz der restlichen ureidabbauenden Enzyme in Sojabohne nachweisen, so wie es für die *GmUAH* schon gezeigt werden konnte. Darüber hinaus sollte es das Ziel sein, die Gene unter fixierenden Bedingungen stumm zu schalten. Da die Ureide unter fixierenden Bedingungen 75% - 80% des transportierten Stickstoffs im Xylem ausmachen (Matsumoto *et al.*, 1977; McClure und Israel, 1979), ist ihr Abbau wahrscheinlich von hoher Relevanz unter diesen Bedingungen. Diese Vermutung könnte durch das Ausschalten der *GmAAHs* unter fixierenden Bedingungen geklärt werden, da Allantoat den Haupttransportmetabolit darstellt und Allantoin über Allantoat abgebaut werden

muss. Die Unfähigkeit zum Allantoatabbau und damit zur Freisetzung des Stickstoffs aus den exportierten Ureiden könnte aufzeigen, wie wichtig der Ureidabbau für tropische Leguminosen ist, denn es wäre prinzipiell auch möglich, dass sie mit den 20% der exportierten Aminosäuren überleben können. Vielleicht wird sogar die Fixierung verstärkt, um an weiteren Stickstoff in Form von Aminosäuren zu gelangen. Oder das Exportprofil wird in Richtung Aminosäuren verändert, so dass diese vermehrt exportiert werden, obwohl Sojabohnen eigentlich Ureidexporter sind. Möglicherweise wird aber auch die Fixierung reduziert, wenn Allantoat akkumuliert, da es in der Pflanze als Überproduktion erkannt wird. Interessant wäre es auch, zu untersuchen, was im Vergleich passiert, wenn man die Ureidbildung in den Wurzeln inhibiert (z.B. durch Stummschalten der XDH), so wie es von Lee *et al.*, 1993 für die Uricase der ureidexportierenden Leguminose *Vigna aconitifolia* durchgeführt wurde. Auf diese Weise könnten die Regulationsmechanismen der Stickstofffixierung in tropischen Leguminosen aufgedeckt werden, welche teilweise bereits diskutiert wurden (Lukaszewski *et al.*, 1992; Bacanamwo und Harper, 1997; Serraj *et al.*, 1999; Vadez *et al.*, 2000; Todd und Polacco, 2004). Dass nun zum ersten Mal ein Gen für ein ureidabbauendes Enzym in

Sojabohne stummgeschaltet werden konnte – ein Verfahren, das wahrscheinlich auch für die Gene der anderen ureidabbauenden Enzyme durchgeführt werden kann - ermöglicht eine bessere und detailliertere Untersuchung der Regulation der Stickstofffixierung in Sojabohnen. Wichtig ist es hierbei auch, die Aktivität der Nitrogenase (wie z.B. in Bacanamwo und Harper, 1997 beschrieben) zu messen, um die Fixierungsaktivität zu bestimmen.

Darüber hinaus könnte auch die Regulation des Ureidabbaus an sich untersucht werden, indem man die einzelnen Enzyme ausschaltet. Der Verlust der *GmUAH* gab bereits erste Hinweise darauf, dass es eine negative Rückkopplung innerhalb des Ureidabbaus geben könnte. Inwiefern diese Rückkopplung auch durch den Verlust anderer Enzyme bewirkt werden kann und auf welche Weise sie bewirkt wird, sollte Gegenstand zukünftiger Untersuchungen sein.

In *Arabidopsis* führte die Überexpression der ALN oder AAH zu einer gesteigerten Biomasse der Pflanzen im Vergleich zum Wildtyp, wenn sie auf Allantoin als Stickstoffquelle wuchsen (Abbildung 28). Da Sojabohnen unter fixierenden Bedingungen bis zu 80% Ureide als Stickstoffquelle verwenden, könnte auch hier durch die Überexpression eines der beiden Enzyme möglicherweise eine Biomassesteigerung erreicht werden. Der

Ausgang dieses Versuches ist ungewiss, da hierbei möglicherweise ein Eingriff in die Regulation der Stickstofffixierung vorgenommen wird. Wenn allerdings die Biomassesteigerung durch Überexpression auch in Sojabohne bewirkt werden kann, weil sie wie *Arabidopsis* in der Lage ist, die Ureide besser zu verwerten, dann wäre dies vor allem interessant und wichtig im Hinblick auf eine mögliche Steigerung des Ertrags von Sojabohnen. Dass die Biomassesteigerung in *Arabidopsis* auch die Schoten bzw. Samen mit einbezieht, wurde zwar nicht untersucht, aber es ist wahrscheinlich, dass auch diese besser mit Stickstoff versorgt werden und somit größere und / oder mehr Samen bilden. Das könnte (bei einem positiven Ergebnis in Sojabohne) für eine Ertragssteigerung aller tropischen und möglicherweise auch subtropischen Leguminosen verwendet werden.

Da diese Pflanzengruppe wichtige Kulturpflanzen wie Bohnen, Erbsen und Linsen beinhaltet, könnte eine Ertragssteigerung in diesen Pflanzen einen wichtigen Beitrag zur Landwirtschaft leisten.

6 Anhang

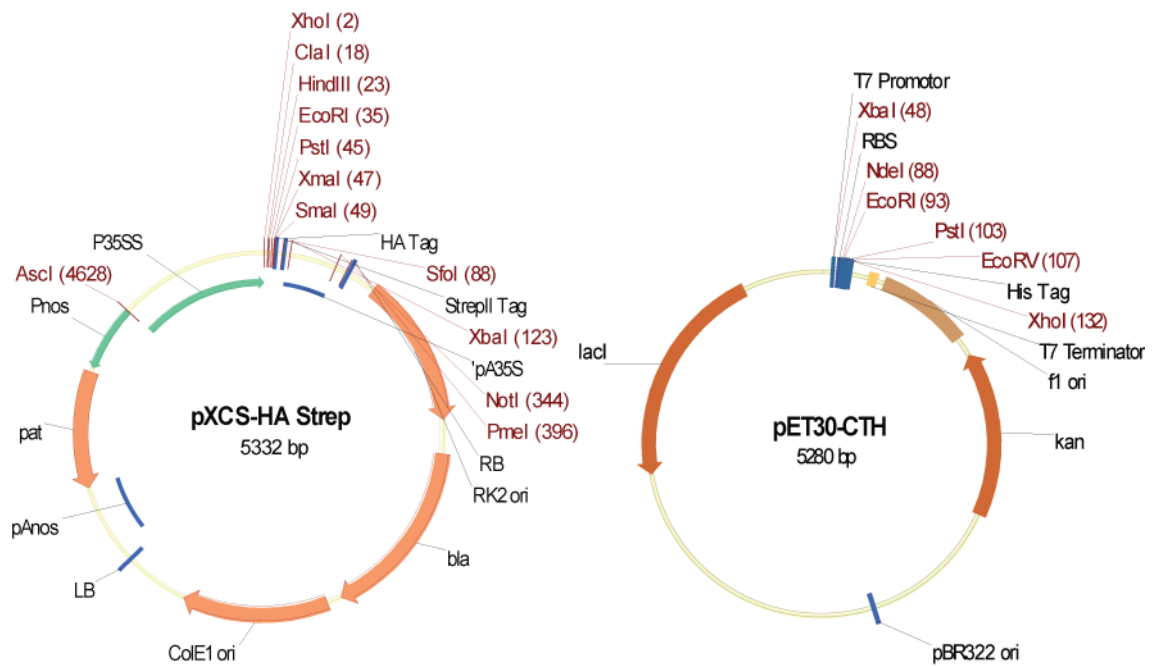


Abbildung 47 – graphische Darstellung der Expressionsvektoren pXCS-HAStrep und pET30-CTH.

```

GmALN 1 1 ..MDQLLWRVLP LLTILVSGVFFYLQDSYIAQFYALIKLPRDKCSLLPHRHFWISSKRI
GmALN 2 1 ..MDQLLWRVLP LLTILVSGVFFYLQDSYIAQLFPLIKLPRDKCSLLPHRHFWISSKRI
GmALN 3 1 ..MEQFVWRVLP LLTILMSLVVFFYLQDSYRAHHPPLVKKLPRSKCSLLPHRHFWITSKRI
GmALN 4 1 ..MEHFVWRVLP LLTILISLVVFFYLQDSYRAHHPPLVKFPRNKCSLLPHRHFWITSKRI
AtALN 1 MERTLLQWRLLP LLALIVALFSFFFAS.....PRSLQENNKCSLLPHDHFYWISSKRI
OsALN 1 MAMAAAKCRVLP LLAVAAALAAALLYRAPFS.....KSLGGEGCSLLPHDHFWTASERV
EcALN 1 .....MSFDLITKNGTV

```

```

GmALN 1 59 VTPQGIISGSVEINDGKIIISVVEGHANQGKPK.QEEVIDYGDVAVIMPGLIDVHVHLDEPG
GmALN 2 59 VTPQGIISGSVEINDGKIIISVVEGHAIQGKPK.QEEVIDYGDVAVIMPGLIDVHVHLNEPG
GmALN 3 59 VTPQGIISGSVEINEGKIIISVVEKGYSKQGKSK.QEKIIDYGGAVVMPGLIDVHVHLDEPG
GmALN 4 59 VTPQGIISGSVEINEGKIIISVVEKGYSKQGKSK.QEKIIDYGDVAVVMPGLIDVHVHLDEPG
AtALN 53 VTPNGLISGSVEVKGGLIISVVEKVDWHKSORSRVKVIDYGEAVLMPGLIDVHVHLDPG
OsALN 55 VTLGRVGPAAVEVKGGLINAVG DYRSFLLR..RPVVDYGDVAVIMPGLIDVHAHLDEPG
EcALN 13 ILENEARVVDIAVKGKIAAIGQDLG.....DAKEVMDASGLVSPGMVDAHTHISEPG

```

```

GmALN 1 118 RTEWEGFDTGTRAAAAGGVTTVVDMP LN NYPTTVSKEK LKLDAAEDKIYVDVGFWGGL
GmALN 2 118 RTEWEGFDTGTRAAAAGGVTTVVDMP LNCYPTTVSKEK LKLDAAEDKIYVDVGFWGGL
GmALN 3 118 RTAWEGFDTGTRAAAAGGVTTVVDMP LN NHPTTVSRETLK LKLEAAENKIYVDVGFWGGL
GmALN 4 118 RTAWEGFDTGTRAAASAGGVTTVVDMP LN NHPTTVSKETL KLEAAENKIYVDVGFWGGL
AtALN 113 RSEWEGFSPSGTKAAAAGGITTTVVDMP LN SFPTVSPETL KLEAAKNRIHVDVGFWGGL
OsALN 113 RAEWEGFSTGTRAAAAGGITTTVVDMP LN SYPTVSEETL KLDAAKDLHVDVGFWGGL
EcALN 67 RSHWEGYETGTRAAAKGGITTTMIEMPLNQLPATVDRASIELKFDAAKGLTIDAAQLGGL

```

```

GmALN 1 178 IPENALNTSILEGLLSAGV LGMKSFMCPSG.....INDFPMTTIDHIKAGLPVLAKYKRPI
GmALN 2 178 IPENALNTSILDGLLSAGV LGMKSFMCPSG.....IDDFPMATIDHIKAGLSVLAKYRRPI
GmALN 3 178 IPENAHNTSILEGLLSAGV LGLKSFMCPSG.....ISDFPLTTIHHIKEGLSVLAKYRRPL
GmALN 4 178 IPENAHNTSILEGLLSAGV LGLKSFMCSSG.....ISDFPLTTIHHIKEGLSVLAKYRRPL
AtALN 173 VPDNALNSSALESILLDAGV LGLKSFMCPSG.....INDFPMTNIITHIKEGLSVLAKYKRPL
OsALN 173 VPENALNPSALESILNAGV LGLKSFMCPSG.....INDFPMTNSTHIIEGLVTLAKYKRPL
EcALN 127 VSYNIDR...LHELDDEVGVGFKCFVATCGDRGIDNDFRDVNDWQFFKGAQKLGELGQPV

```

```

GmALN 1 234 LVHAEVQQDFENHLELNEDNLDPRAYLTYLNARPPSWEEAAIKQLVGVTKDTRKGGPLEG
GmALN 2 234 LVHAEIQQDFENHLELNEDNLDPRAYLTYLNTRPPSWEEAAIKQLVSVTKDTRKGGPLEG
GmALN 3 234 LVHSEIQQHSKKHLELNDK.GGPRAYLTYLHTRPPSWEEAAIKELVGVTKDTRKGGPLEG
GmALN 4 234 LVHSEIQQHSKKHLELNDK.GGPRAYLTYLHTRPPSWEEAAIKELVGVTKDTRKGGPLEG
AtALN 229 LVHAEIERDLEIEDGSEND...PRSYLTYLKRTPTSWEEGAIRNLLSVTENTRIGGSAEG
OsALN 229 LIHAERIPDVONEDGIDGELDPKAYTTYLKSRRPAWEEAAIKDLORAMKDTEIGRSEG
EcALN 184 LVHCENALICDELGEAKR.EGRVTAHDYVASRPFVTEVEAIRRVLYLAKVA.....G

```

```

GmALN 1 294 AHVHIVHLS DSSASLDLIKEAKSRGDSISVETCPHYLAFSSEEIPNGDTRFKCSPPIRDA
GmALN 2 294 AHVHIVHLS DSSASLDLIKEAKSHGDSISVETCPHYLAFITSEEIPNGDTRFKCSPPIRDA
GmALN 3 293 AHVHVHLS DSSASLDLIKEAKRRGDSISVETCPHYLAFSSEEIPNGDTRFKCSPPIRDA
GmALN 4 293 AHVHIVHLS DSSASLDLIKEAKSRGDSISVETCPHYLAFSSEEIPNGDTRFKCSPPIRDA
AtALN 286 AHLHIVHLS DASSSLDLIKEAKGKGDSVTVETCPHYLAFSAEEIPEGDTRFKCSPPIRDA
OsALN 288 AHTHIVHLS DAKTSLGLKDAKONGARVSVETCPHYLAFSAEEVDPGDTRFKCAPPIRDS
EcALN 236 CRHIVCHVSPEC.VEEVTRARQEGQDVTCE SCPHYFVLDTDQFEEIGTLAKCSPPIRDL

```

```

GmALN 1 354 YNREKLWCAVLEGHIDLLSSDHSPTVPELKLMEEGDFLKAWGGISSLQFNLPVTWSYGK.
GmALN 2 354 YNKDKLWEAVLEGHIDLLSDHSPTVPELKLMEEGDFLKAWGGISSLQFNLPVTWSYGK.
GmALN 3 353 YNREKLWCAVLEGHIDLLSSDHSPTVPOLKLEEGDFLKAWGGVTSLQFDLPVTWSYGK.
GmALN 4 353 YNREKLWCAVLEGHIDLLSSDHSPTVPOLKLEEGDFLKAWGGVTSLQFDLPVTWSYGK.
AtALN 346 ANREKLWEALMECDIDMLSSDHSPTKPELKLMSDGNFLKAWGGISSLQFVLPVTWSYGK.
OsALN 348 TNRDNLWEALLDGHIDMLSSDHSAPSAPDLKMEEGNFLRAWGGISSLQFVLPVTWSHGK.
EcALN 295 ENQKGMWEKLFNGEIDCLVSDHSPPPEMKAG...NIMKAWGGIAGLQSCMDVMFDEAVQ

```

```

GmALN 1 413 KYGLTLEQLSLLWSKKPATLAGLESKGATAVGNHADVWQPELEFDLDDYPVFIKHSE
GmALN 2 413 KYGLTLEQLSLLWSKKPATLAGLESKGTIAVGNHADVWQPELEFDLDDYPVFIKHSE
GmALN 3 412 KHGLTLEQLSLLWSKKPATLAGLESKGATAVGNHADVWQPEVEFDLNEDYPVFLKHPS
GmALN 4 412 KHGLTLEQLSLLWSKKPATLAGLESKGATAVGNHADVWQPEVEFDLNEDYPVFLKHPS
AtALN 405 KYGVTLEQVTSWWSDRPSKLAGLHSGAVTVGKHADVWVEPEAEFDVDEDHPIHFKHPS
OsALN 407 KYGISLNQLASWWSERPAMLAGLKKKGAVLPGYRADVWQPEAQFHLDDSHPVYHKHRN
EcALN 352 KRGMSLPMFGKLMATNAADIFGLQOKGRVAPGKDADFVFIQPNSSYVLTNDLEYR..HK

GmALN 1 473 LSAYMGRRLSGKVLETFVRGNLVFKDGKHAPAPCGVQILAK...
GmALN 2 473 LSAYMGRRLSGKVLETFVRGNLVFKDGKHAPAPCGVQILAK...
GmALN 3 472 LSAYMGRRLSGKVLETFVRGNLVFKDGKHAPSACGVPIILAK...
GmALN 4 472 LSAYMGRRLSGKVLETFVRGNLVFKDGKHAAACGVPIILAK...
AtALN 465 ISAYLGRRLSGKVSTFVRGNLVFEGGKHASDACCGLQLATT..
OsALN 467 ISAYLGRRLSGKILSTFVGGNLVFAEDKHAKAACGAPILAK...
EcALN 410 VSPYVGRITGARITKTIILRGDVIYDIEQGFVAPKGFILKHQQ

```

Abbildung 48 – Proteinsequenzvergleich der Allantoinasen.

Aminosäuren sind lila (in allen Sequenzen identisch), schwarz (in fast allen Sequenzen identisch), grau (konservativer Aminosäureaustausch), rot (in der Kristallstruktur als wichtig identifizierte Aminosäure (Kim *et al.*, 2009)) und grün (durch SignalP vorhergesagtes N-terminales Signalpeptid/Signalanker) unterlegt. Rot markierte Aminosäuren weisen auf einen Aminosäureaustausch einzelner Sojabohnenenzyme in sehr hoch konservierten Bereichen hin. Der Proteinsequenzvergleich wurde mit AlignX erstellt und mit Boxshade schwarz und grau unterlegt.

<i>GmAAH</i>	1	1MS	SATASNTFFLHSCFLLFCLLSAPSCVSMFSGIE
<i>GmAAH</i>	2	1M	SATASNTFFLHSCFLLFCLLSAPSCVSMFSGIE
<i>AtAAH</i>		1	MAVPH	SSSSSRSHPFLLSHVYHTSFHHHHHHPSLVLFWCFLVFSLLSPLALS
<i>OsAAH</i>		1M	ALLSYPRRHPSIHLILLISAYALFLLPILDG.....LE
<i>EcAAH</i>		1
<i>GmAAH</i>	1	36	TG.....	DLEKRDDLFPQILRDEAVARLYELGKVS
<i>GmAAH</i>	2	36	TG.....	DLEKRDDLFPQILRDEAVARLYELGKVS
<i>AtAAH</i>		61	SSSDSSSSSSSHISL	GIGETEGTKHDLHQAILRDEAVARLHELQVSDAATHLERTFMSP
<i>OsAAH</i>		35	LG.....	GDGLYREILRDETVLRLKELGKISDCEGYLERTFLSP
<i>EcAAH</i>		1	MITHFRQAIETLPWLSFG..ADPAGGMTRLLYSP
<i>GmAAH</i>	1	79	ASMR	AINLIRKWMEDAGLRTWVDQMGNVHGRVDGANANA
<i>GmAAH</i>	2	79	ASMK	AIDLIRKWMEDAGLRTWVDQMGNVHGRVDGANENAE
<i>AtAAH</i>		121	ASTRA	IPLIRGWMEDAGLSTWVDYMGNVHGRVPEKNGSSQ
<i>OsAAH</i>		74	ASTRA	SAVILISWMDAGLTTWIDQMGNIHGRFEPNSTKE
<i>EcAAH</i>		35	EWLET	QQQFKKRMASGLETRFDEVGNLYGRINGTEYPOE
<i>GmAAH</i>	1	139	LGIV	SAISALKAMHVNGKLOKLRPVEVIAFSDEEGVRF
<i>GmAAH</i>	2	139	LGIV	SAISAVKAMHVNGKLOKLRPVEVIAFSDEEGVRF
<i>AtAAH</i>		181	LGII	SAISALKVVKIDGRLGELKLRPVEVIAFSDEEGVRF
<i>OsAAH</i>		134	LGII	SAISALKVVKVTGRLQRLTRPVEVIAFSDEEGVRF
<i>EcAAH</i>		95	FGAL	AAWLADWLKT..QYGAPLRTVEVVA
<i>GmAAH</i>	1	198	ISDK	REVMIKDFLKENSIDITEESLLKLYDPKSVWGY
<i>GmAAH</i>	2	198	ISDK	REVMIKDFLKENSMDITEESLLKLYDPKSVWGY
<i>AtAAH</i>		240	VTDK	SGISVQDALKENSIDITDENLMQLKYDPASVWGY
<i>OsAAH</i>		193	VSDK	SGITVQDVLKLSLEGLANALGEVRYSPESVGSY
<i>EcAAH</i>		153	ICDA	KNSFVDAMKACGFTLPNAPLTPRQD...IKAF
<i>GmAAH</i>	1	258	GIAG	QTRLKVTVRGSQGHAGTVPMSMRQDPM
<i>GmAAH</i>	2	258	GIAG	QTRLKVTVRGSQGHAGTVPMSMRQDPM
<i>AtAAH</i>		300	GIAG	QTRLKVTVRGSQGHAGTVPMSMRQDPM
<i>OsAAH</i>		253	GIAG	QTRLKVTVRGSQGHAGTVPMSMRQDPM
<i>EcAAH</i>		209	AIVG	QRRTVTLNGESNHAGTTPMGYRRD
<i>GmAAH</i>	1	318	STVK	SLSTSLVCTVGEISTWPSASNVIPGQVTY
<i>GmAAH</i>	2	318	STVK	SLSSSLVCTVGEISTWPSASNVIPGQVTY
<i>AtAAH</i>		360	DTVE	SLANSLSVCTVGEISTWPSASNVIPGQVTY
<i>OsAAH</i>		313	FTEE	SLAG.LVCTVGEILLWPSASNVIPGQVNF
<i>EcAAH</i>		256	MCDPLVLTFCVKEPRENTVNVVPGKTF
<i>GmAAH</i>	1	378	DKRS	VSCIIEHKHDAGAVICSDLSSQLKSAAYS
<i>GmAAH</i>	2	378	DKRS	VSCIIEHKHDAGAVICSDLSSQLKSAAYS
<i>AtAAH</i>		420	DKRS	LLCSIERKHDADAVMSDPQLSLQKSAQS
<i>OsAAH</i>		372	DDRL	VDCAVEQKHAATAPCDAELTSRLERATRST
<i>EcAAH</i>		311	DEMD	IGIDIDLWMDPEEPPMKNELVATLTELCE
<i>GmAAH</i>	1	435	AMAT	SHLTKVGMFLVRCRGGISHSPOEHVLDNDV
<i>GmAAH</i>	2	435	AMAT	SHLTKVGMFLVRCRGGISHSPOEHVLDNDV
<i>AtAAH</i>		477	AMAMA	HLTKVGMFLVRCRGGISHSPA
<i>OsAAH</i>		432	AMAMA	RLTKVGMFLVRCRGGVSHSPEESVMDD
<i>EcAAH</i>		360	AQIF	APRVPTCMFTIPSINGISHNPAERTNITD

Abbildung 49 – Proteinsequenzvergleich der Allantoat Amidohydrolasen.

Aminosäuren sind lila (in allen Sequenzen identisch), schwarz (in fast allen Sequenzen identisch), grau (konservativer Aminosäureaustausch), rot (in der Kristallstruktur als wichtig identifizierte Aminosäure (Agarwal *et al.*, 2007)) und grün (durch SignalP vorhergesagtes N-terminales Signalpeptid/Signalanker) unterlegt. Der Proteinsequenzvergleich wurde mit AlignX erstellt und mit Boxshade schwarz und grau unterlegt.

<i>GmUGlyAH</i>	1	1MRSIF.VL.LVLGLK.YAFAE.EGFCAPSAP....SESKS...KPLYWKVDNPTLS
<i>GmUGlyAH</i>	2	1MRTIFGLL.LVLGLK.YAFAQ.EGFCAPSAP....SESKS...KPLYWKVDNPTLS
<i>AtUGlyAH</i>		1MRSLY.LIV.FIVISLVK.SKSDDGFCAPSIVESDEKT...NPTIYWKATNPTLS
<i>OsUGlyAH</i>		1	VMLPRLL.LLV.VASALPLASVAAGAVGVGEGFCSAEPASAASGGCSGVRPPLYWKATNPTLA
<i>EcUGlyAH</i>		1MGYLNNV
<i>GmUGlyAH</i>	1	46	PIHLQDLPGFTRSVYKSNHALVSPESHVYGPLPDWIDTSGAYLISPESHVYVYMYLAKLK
<i>GmUGlyAH</i>	2	47	PIHLQDLPGFTRSVYKSNHALISPESHVYGPLPDWINTLGTLYLISPESHVYVYMYLAKLK
<i>AtUGlyAH</i>		51	PSHLQDLPGFTRSVYKRDHALITPESHVYSPLPDWINTLGTLYLISPESHVYVYMYLAKMK
<i>OsUGlyAH</i>		61	PAHLQDLPGFTRSVYKRDHALITPESHVYSPLPDWINTLGTLYLISPESHVYVYMYLAKMH
<i>EcUGlyAH</i>		8	TGYREDLLANRAIVKHGNEFALITPDGLVKNITPGFENC DATILSTPKLGASFVDYLVTLH
<i>GmUGlyAH</i>	1	106	EK..SKSGLPLPGVERFIFVLOGAVTLTNAAGVSQLKLVDSYAYFPPN..FEHSIECDTP
<i>GmUGlyAH</i>	2	107	EN..SKSGLPLPGVERFIFVLOGAVTLTNAAGVSQLKLVDSYAYFPPN..FEHSIECDAP
<i>AtUGlyAH</i>		111	EM..SSSGLPPQDIERLIFVVEGAVTLTNTSSSSKKLTVDSYAYLPPN..FHHSLCDVES
<i>OsUGlyAH</i>		121	DG..SKSALPPKGVRLIFVLOGSILLSEESGNHTHTLLVDSYAYLPAN..MKHSVISDEV
<i>EcUGlyAH</i>		68	QNGGNQQFGGEGITFLYVLSGNITAK.AEGKTFALSEGGYLYCPEGSLMTFVNAQAED
<i>GmUGlyAH</i>	1	162	ATIVVFERRYSPLNHIPEPLVVGSTDKQPLLETPG.EIFELRKLIPSTSLAYDFNIHIMDF
<i>GmUGlyAH</i>	2	163	ATIVLIERRYSPLNHIPEPLVVGSTDKQPLLETPG.EIFELRKLIPSTSLAYDFNIHIMDF
<i>AtUGlyAH</i>		167	ATIVVFERRYEYLGSHTELVVGSTDKQPLLETPG.EVFELRKLIPMSVAYDFNIHTMDF
<i>OsUGlyAH</i>		177	TTIVLIERRYTTIEGYHPDLVVGSTDKQPLLETPG.EVFELRKLIPSTSLAYDFNIHIMDF
<i>EcUGlyAH</i>		127	SQLFLYKRRYVPEGYAPWLVSGNASELERIHYEGMDDVILLDFLPKELGFDMMHILSF
<i>GmUGlyAH</i>	1	221	QPGEFLNVKEVHYNOHGLLLLEGGIYRLGDSWYPVQAGDVIWMAFVPOWYAALG.KTR
<i>GmUGlyAH</i>	2	222	QPGEFLNVKEVHYNOHGLLLLEGGIYRLGDSWYPVQAGDVIWMAFVPOWYAALG.KTR
<i>AtUGlyAH</i>		226	QPGEFLNVKEVHYNOHGLLLLEGGIYRLGDNWYPVQAGDVIWMAFVPOWYAALG.KTR
<i>OsUGlyAH</i>		236	QPGEFLNVKEVHYNOHGLLLLEGGIYRLGDSWYPVQSGDTIWMAFVPOWYAALG.KTK
<i>EcUGlyAH</i>		187	APGASHGYIETHVQEHGAYILSGGGVYNLDNNWIPVKKGDYIFMGAYSLQAGYGVGRGEA
<i>GmUGlyAH</i>	1	280	TRYLLYKDANRSPL.
<i>GmUGlyAH</i>	2	281	TRYLLYKDANRSPL.
<i>AtUGlyAH</i>		285	SRYLLYKDVNRNPL.
<i>OsUGlyAH</i>		295	TRYLLYKDVNRDPLI
<i>EcUGlyAH</i>		247	FSYIYSKDCNRDVEI

Abbildung 50 – Proteinsequenzvergleich der Ureidoglycin Aminohydrolasen.

Aminosäuren sind lila (in allen Sequenzen identisch), schwarz (in fast allen Sequenzen identisch), grau (konservativer Aminosäureaustausch), rot (in der Kristallstruktur als wichtig identifizierte Aminosäure (Shin *et al.*, 2012)) und grün (durch SignalP vorhergesagtes N-terminales Signalpeptid/Signalanker) unterlegt. Rot markierte Aminosäuren weisen auf einen Aminosäureaustausch eines Sojabohnenenzym in sehr hoch konservierten Bereichen hin. Der Proteinsequenzvergleich wurde mit AlignX erstellt und mit Boxshade schwarz und grau unterlegt.

GmUAH 1	1MVHSLLLLLLLLLLTATSAQHGDG..PSITATMEQFSGYKIHEPHSFQP
GmUAH 2	1MIHSLLLLFLLI AVSAQQHQHDD..PSITATME*FSGYTIHEPHSS..
AtUAH	1MESLKRFLCSIALLLISLILPSLAQQQQ..HESIRTMEDFSGYPIHEPGQFGS
OsUAH	1	MATSAAARFLAALAGAAVLLVLLCGAAGAVVGHDDDDAAAARRTMEEFAGFPASDYRGDGG
GmUAH 1	47	S....S..LSVDAQALQNQIDELAAAFSDSPAPSVTRVLYTDKDVLGRRYVKTQMELAGLS
GmUAH 2	44LSVDAQALQNQIDELAAAFSDSPAPSVTRVLYTDKDVLGRRYVKTQMELAGLS
AtUAH	53	INLASS..LSVDAPGLQNQIDELSSFSDAFSPAPSVTRVLYTDKDVSAARYVKNLMALAGLT
OsUAH	61	GGSCGSSPFYVSDGLQRQIDELASFSDSPVPSVTRVLYSDKVQARYIKGIMNQLGLS
GmUAH 1	101	VREDAVGNIFGRWDGLEPELAAVATGSHIDAIPYSGKYDGVVGLGAEAIRVLRKRSQFK
GmUAH 2	96	VREDAVGNIFGRWDGVEPELAAVATGSHIDAIPYSGKYDGVIGVLGAEAIRVLRKRSQFK
AtUAH	111	VREDAVGNIFGRWDGLEPMLPAVATGSHIDAIPYSGKYDGVVGLGAEAINVLRKRSQFK
OsUAH	121	IREDAVGNIFGRWEGSEAGLGA VATGSHVDAIPFSGKYDGVVGLGALEAIRMLKRSQFK
GmUAH 1	161	PRRPLEVILSFTSEEPTRFGIGCLGSRLLAGSEDLANSLKTS.TDIQNISFLDAAGSAGYS
GmUAH 2	156	PRRSLEVILSFTSEEPTRFGIGSLGSRLLAGSEDLANSLKTT.TDIQNISFLDAARSAGYS
AtUAH	171	PKRSLEIILSFTSEEPTRFGISCLGSRLLAGSKELAEALKTTVVVDGQNVSFIEAARSAGYA
OsUAH	181	PKRSLEVIMFTSEEPTRFGISCLGSRLMAGSEELARSLKET.VDNQNVSFDAADSAGYK
GmUAH 1	220	KN.EDDLSSVFLKKGTYSAFVELHIEQGPILEDEGISIGIVTAIAAPASLTVFEFEGNGGH
GmUAH 2	215	KN.EDDLSSVFLKKGTYSAFVELHIEQGPILEDEGISIGIVTAIAAPASLTVFEFEGNGGH
AtUAH	231	EDKDDDLSSVFLKKGSYFAFVELHIEQGPILEDEGLDIGVVTAIAAPASLKVFEFEGNGGH
OsUAH	240	MH.PEELHNVFLKDDYFAFVELHIEQGPILEKEGKIGVVTAIAAPASIKVFEFEGNGGH
GmUAH 1	279	AGAAALMPNRNDAGLAASELALAVRHHVLDSSGSDTVGTVGILELHPGAINSIPSKSHLEI
GmUAH 2	274	AGAVLMPNRNDAGLAASELALAVRHHVLDSSGSDTVGTVGILELHPGAINSIPSKSHLEI
AtUAH	291	AGAVLMPYRNDAGLAAAELALAVEKHVLESESDTVGTVGILELHPGAINSIPSKSHLEI
OsUAH	299	AGAVLMPARNDAGLAAAELALAVEKHVLESGSDTVGTVGILQLHPGAINSIPSKSHVEI
GmUAH 1	339	DTRDIDEERRNKVVEKIHQSAIKITKTRGVKLSDFRVINQDPPALSDEAVIKAVETATKE
GmUAH 2	334	DTRDIDEERRNKVVEKIHQSAIKITKTRGVKLSDFHVINQDPPALSDEAVIKAVETATKE
AtUAH	351	DTRDIDEARRNTVVKKIQESANTAKKRVKLSDFKIVNQDPPALSCLKVKKMAEAAATE
OsUAH	359	DVRDIDEKRRNNVIEKVHQSATIEISKNRGVLLSEFKIINQDPPALSCLKSVISAMEFAAKQ
GmUAH 1	399	LNLTSKLMISRAYHDSLFMARLSPMGMIFPCYKGYSHKPEEFATIEDMSNGVKVLALTL
GmUAH 2	394	LNLTSKLMISRAYHDSLFMARLSPMGMIFPCYKGYSHKPEEFATI QDMSNGVKVLTLTL
AtUAH	411	LNLSHKMMISRAYHDSLFMARLSPMGMIFPCYKGYSHKPEEYSSPEDMANGVKVLSLTL
OsUAH	419	LNLLEYKLMISRAYHDSLFMARLSPMGMIFPCYKGYSHKPEEYASPEDMANGVKVLALAM
GmUAH 1	459	AKLSSQ
GmUAH 2	454	AKLSSH
AtUAH	471	AKLSLD
OsUAH	479	ARLSLQ

Abbildung 51 – Proteinsequenzvergleich der Ureidoglykolat Amidohydrolasen.

Aminosäuren sind lila (in allen Sequenzen identisch), schwarz (in fast allen Sequenzen identisch), grau (konservativer Aminosäureaustausch) und grün (durch SignalP vorhergesagtes N-terminales Signalpeptid/Signalanker) unterlegt. Der Translationsstop der *GmUAH 2* ist gelb unterlegt. Rot markierte Aminosäuren weisen auf einen Aminosäureaustausch eines Sojabohnenenzym in sehr hoch konservierten Bereichen hin. Gelb markierte Aminosäuren weisen auf Aminosäuren hin, die auch im fern verwandten Moos *Phycomitrella patens* konserviert sind. Der Proteinsequenzvergleich wurde mit AlignX erstellt und mit Boxshade schwarz und grau unterlegt.

Tabelle 20: Proteinsequenzanalyse der pflanzlichen Enzyme des Ureidabbaus.

Protein	annotierte Größe (+N / -Tag)	Signalsequenz-vorhersage	Schnittstellen- & Lokalisations-vorhersage	native Größe (-N / -Tag)	transgene Größe (-N / + HASTrep)
AtALN	507 AS 55,64 kDa	Signalpeptid mit 0,905 Signalanker mit 0,094	AS 33-34 mit 0,396 ER mit 0,91-Rang 1	474 AS 51,61 kDa	498 AS 54,23 kDa
GmALN 1	513 AS 56,75 kDa	Signalpeptid mit 0,127 Signalanker mit 0,861	AS 29-30 mit 0,057 ER mit 0,97-Rang 1	484 AS 53,18 kDa	508 AS 55,80 kDa
GmALN 2	513 AS 56,84 kDa	Signalpeptid mit 0,167 Signalanker mit 0,820	AS 29-30 mit 0,089 ER mit 0,84-Rang 1	484 AS 53,18 kDa	508 AS 55,80 kDa
GmALN 3	512 AS 56,73 kDa	Signalpeptid mit 0,129 Signalanker mit 0,862	AS 32-33 mit 0,044 ER mit 0,87-Rang 1	480 AS 52,71 kDa	504 AS 55,33 kDa
GmALN 4	512 AS 56,69 kDa	Signalpeptid mit 0,086 Signalanker mit 0,911	AS 32-33 mit 0,029 ER mit 0,86-Rang 1	480 AS 52,67 kDa	504 AS 55,29 kDa
AtAAH	525 AS 56,52 kDa	Signalpeptid mit 0,655 Signalanker mit 0,388	AS 53-54 mit 0,285 nicht ER (Zellkern)	472 AS 50,50 kDa	496 AS 53,11 kDa
GmAAH 1	483 AS 52,46 kDa	Signalpeptid mit 0,995 Signalanker mit 0,004	AS 29-30 mit 0,714 ER mit 0,16-Rang 2	454 AS 49,28 kDa	478 AS 51,90 kDa
GmAAH 2	483 AS 52,50 kDa	Signalpeptid mit 0,996 Signalanker mit 0,004	AS 29-30 mit 0,680 ER mit 0,20-Rang 1	454 AS 49,27 kDa	478 AS 51,89 kDa
OsAAH	491 AS 52,82 kDa	Signalpeptid mit 0,908 Signalanker mit 0,091	AS 32-33 mit 0,898 nicht ER (PM)	459 AS 49,11 kDa	483 AS 51,73 kDa
AtUGlyAH	298 AS 33,78 kDa	Signalpeptid mit 0,995 Signalanker mit 0,000	AS 17-18 mit 0,741 ER mit 0,21 Rang 2	281 AS 31,83 kDa	305 AS 34,34 kDa
GmUGlyAH 1	293 AS 33,15 kDa	Signalpeptid mit 1,000 Signalanker mit 0,000	AS 19-20 mit 0,994 ER mit 0,42-Rang 2	274 AS 30,85 kDa	298 AS 33,47 kDa
GmUGlyAH 2	295 AS 33,27 kDa	Signalpeptid mit 1,000 Signalanker mit 0,000	AS 20-21 mit 0,995 ER mit 0,31-Rang 1	275 AS 31,00 kDa	299 AS 33,62 kDa
OsUGlyAH	310 AS 34,21 kDa	Signalpeptid mit 1,000 Signalanker mit 0,000	AS 22-23 mit 0,495 ER mit 0,33-Rang 2	288 AS 31,98 kDa	312 AS 34,60 kDa
AtUAH	476 AS 51,48 kDa	Signalpeptid mit 0,999 Signalanker mit 0,001	AS 25-26 mit 0,933 ER mit 0,23-Rang 2	451 AS 48,77 kDa	475 AS 51,39 kDa
GmUAH 1	464 AS 49,85 kDa	Signalpeptid mit 1,000 Signalanker mit 0,000	AS 19-20 mit 0,948 ER mit 0,21-Rang 1	445 AS 47,85 kDa	469 AS 50,58 kDa
GmUAH 2		Signalpeptid mit 1,000 Signalanker mit 0,000	AS 16-17 mit 0,737 ER mit 0,23-Rang 1		
OsUAH	484 AS 51,82 kDa	Signalpeptid mit 1,000 Signalanker mit 0,000	AS 28-29 mit 0,833 ER mit 0,17-Rang 3	456 AS 49,31 kDa	480 AS 51,93 kDa

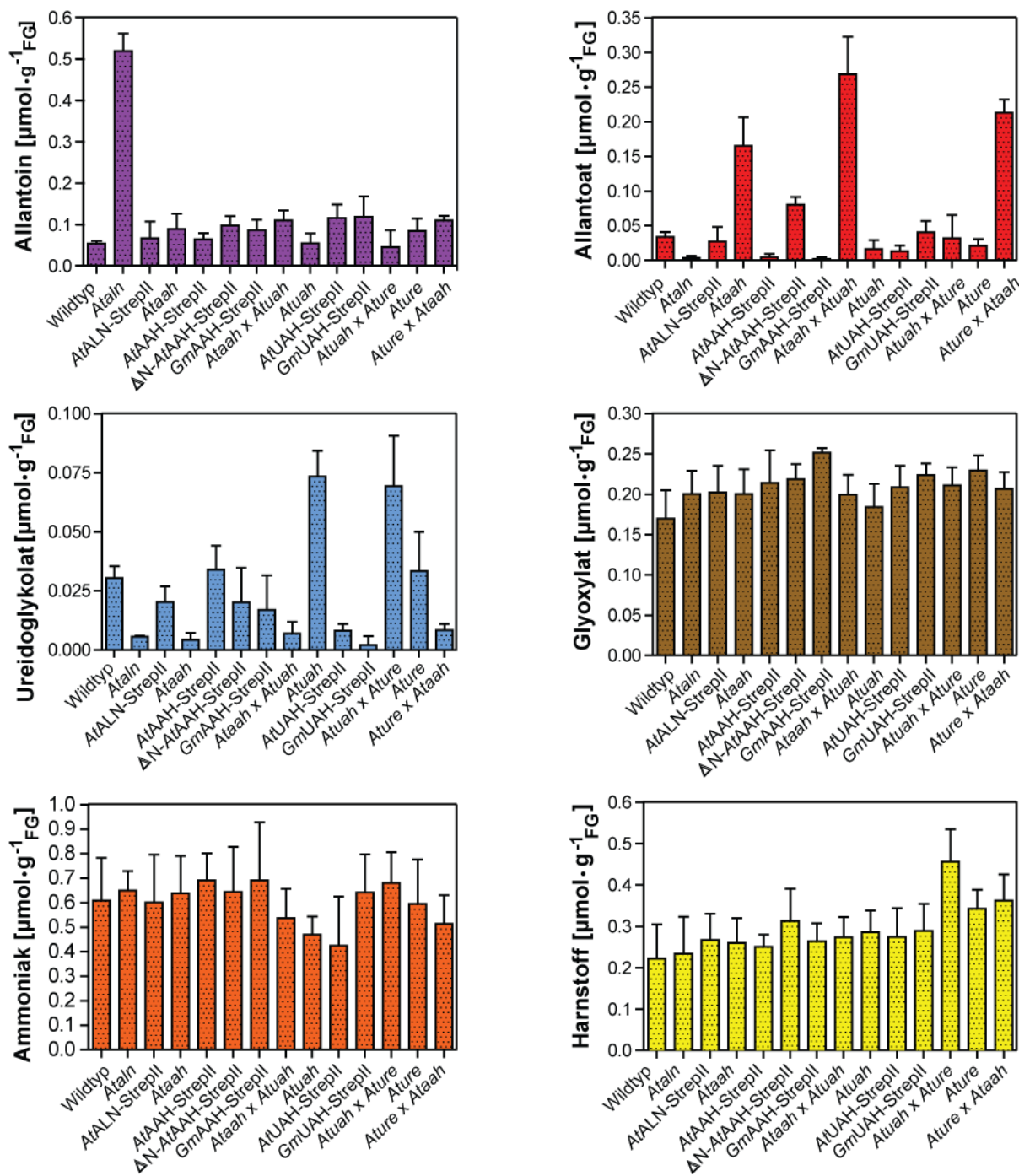


Abbildung 52 – graphische Darstellung der Metabolitanalyse der verschiedenen Arabidopsislinien, welche getrennt gezeigt wird in Abbildung 30 und Abbildung 38.
 Werte sind Mittelwerte ($n=5$) mit Standardabweichung.

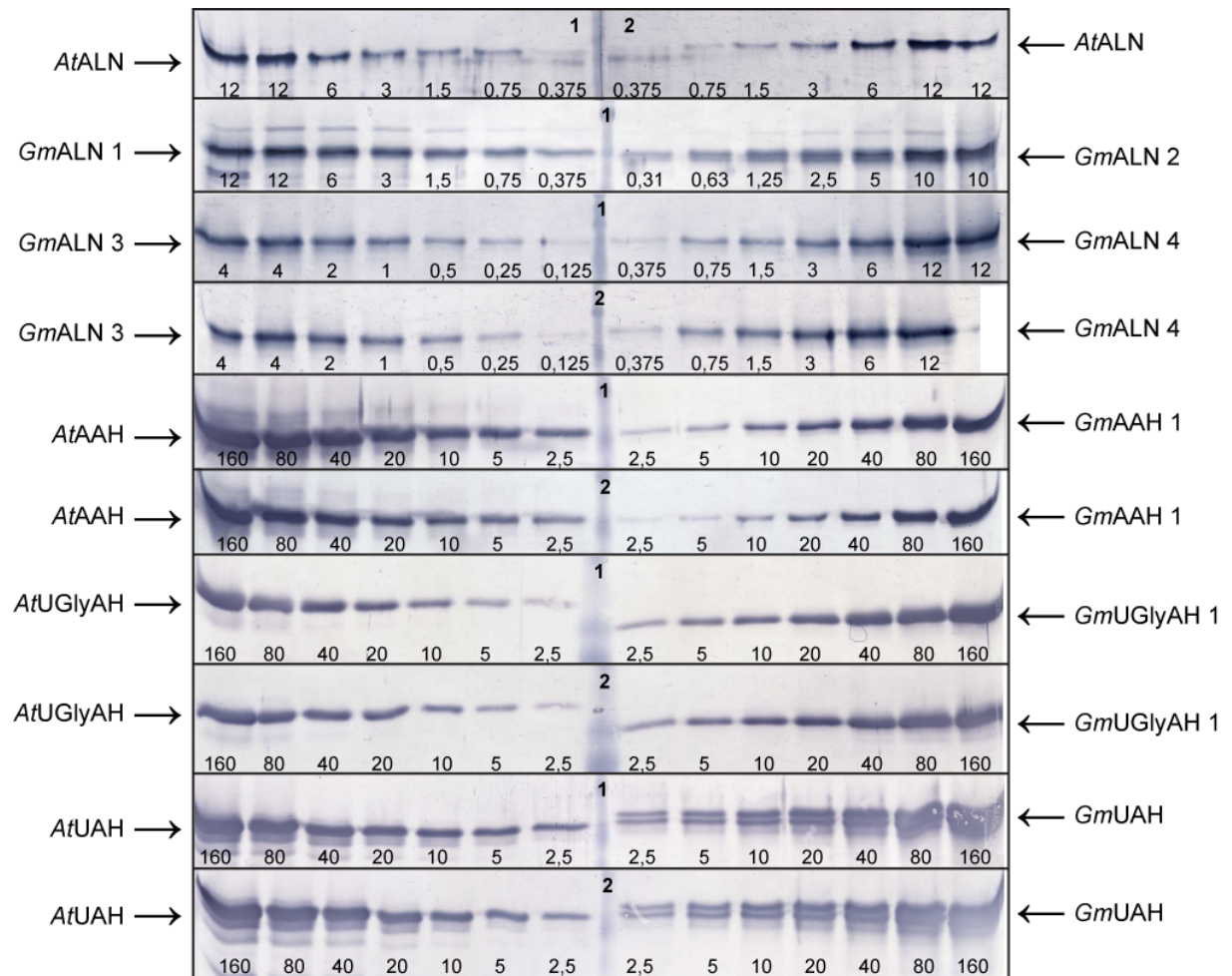


Abbildung 53 – Quantifizierung der Antikörperdetektionsgrenzen.

Getestet wurden die Antiseren 1 und 2 mit den jeweiligen aufgereinigten Enzymen (ausser *GmALN 1* und *GmALN 2*). Die Zahlen an den unteren Bloträndern geben den Proteingehalt in ng pro Bande an.

<i>GmUAH</i> 1	1	ATGTTCACTCTCTGCTCCTACTTCTTCTCCTCCT...CACTCTCACTGCAACCTCTGCTC
<i>GmUAH</i> 2	1	ATGATTCACCTCTCTGCTCCTACTTTTCTTCTCATTGCAGTCTCAGCTCAGCAACA...TC
<i>GmUAH</i> 1	59	AACATGACCGCCCTTCGATCACAGCCACCATGGAGCAATTCTCCGGTTACA AAATCCAGG
<i>GmUAH</i> 2	59	AACATGATGACCCCTTCGATCACAGCCACCATGGAGTGAATTCTCCGGTTACA CAATCCAGG
<i>GmUAH</i> 1	119	AACCTCACTCTTTCCAACCTCTTCACTCTCCGTTGATGCTCAGGCTCTTCAGAACCAGA
<i>GmUAH</i> 2	119	AACCTCACTCTT.....CACTTTCCGTTGATGCTCAGGCTCTGCAGAACCAGA
<i>GmUAH</i> 1	179	TTGATGAGCTTGCAGCGTTTTCTGACTCACCTGCTCCATCAGTAAC CAGGGTCTTGTATA
<i>GmUAH</i> 2	167	TAGATGAGCTTGCAGCGTTTTCTGACTCTCCTGCTCCATCAGTAACA AGGGTCTTGTATA
<i>GmUAH</i> 1	239	CTGACAAGGATGTTTTAGGTGCGAGGTATGTAAAAACCCAGATGGAACCTTGCTGGCCTAT
<i>GmUAH</i> 2	227	CTGACAAGGATGTTTTAGGTGCGAGGTATGTAAAAACCCAGATGGAACCTTGCTGGTCTAT
<i>GmUAH</i> 1	299	CTGTGAGAGAGGATGCTGTTGGTAAACATATTTGGTCGTTGGGATGGCC TTGAACCTGAGC
<i>GmUAH</i> 2	287	CTGTGAGAGAGGATGCTGTTGGTAAACATATTTGGTCGTTGGGATGGCG TTGAACCTGAGC
<i>GmUAH</i> 1	359	TTGCTGCAGTTGCAACAGGTTGCGACATTGATGCTATACCTTACTCGGGAAAATATGATG
<i>GmUAH</i> 2	347	TTGCTGCAGTTGCAACAGGTTGCGACATTGATGCTATACCTTACTCTGGAAAATATGATG
<i>GmUAH</i> 1	419	GAGTTCTTGGTGTTTTAGGTGCTATTGAAGCCATCAGAGTCC TGAAAAGGTCTGGTTTTA
<i>GmUAH</i> 2	407	GAGTTATTGGTGTTTTAGGTGCTATTGAAGCCATCAGAGTCC TGAAAAGGTCTGGTTTTA
<i>GmUAH</i> 1	479	AACCTAGAAGACCATTTGGAAGTCATATCATTCACATCAGAAGAACCAACACGCTTTGGAA
<i>GmUAH</i> 2	467	AACCTAGAAGATCATTTGGAAGTCATATTATTCACATCAGAAGAACCAACACGCTTTGGAA
<i>GmUAH</i> 1	539	TAGGTGCTTGGGAAGCCGCTATTGGCTGGAAGTGAGGATCTTGCAAATTC TCTAAAGA
<i>GmUAH</i> 2	527	TAGGTAGCTTGGGAAGCCGCTATTGGCTGGAAGTGAGGATCTTGCAAATTC TCTAAAGA
<i>GmUAH</i> 1	599	CATCAACTGATATTCAAACATATCTTTCC TAGATGCTGC CGATCTGCTGGGTATTCAA
<i>GmUAH</i> 2	587	CAACAACCTGATATTCAAACATATCTTTCC TAGATGCTGC CGATCTGCTGGGTATTCAA
<i>GmUAH</i> 1	659	AAAATGAGATGACTTATCCAGTGATTTTTTAAAGAAAGGAACATATTCTGCTTTTGTAG
<i>GmUAH</i> 2	647	AAAATGAGATGACTTATCCAGTGATTTTTTAAAGAAAGGAACATATTCTGCTTTTGTAG
<i>GmUAH</i> 1	719	AACTGCACATAGAACAAGGACCTATTTCTGGAAGATGAAGGTATATCTATAGGCATAGTTA
<i>GmUAH</i> 2	707	AACTGCACATAGAACAAGGACCTATTTCTGGAAGATGAAGGTATATCTATAGGCATAGTCA
<i>GmUAH</i> 1	779	CTGCCATTGCAGCTCCAGCAA GTCTAACGGTTGAATTTGAAGGCAATGGTGGCCATGCGG
<i>GmUAH</i> 2	767	CTGCCATTGCAGCTCCAGCAA GTCTAACAGTTGAATTTGAAGGCAATGGTGGCCATGCGG
<i>GmUAH</i> 1	839	GTGCTGCCTTATGCCTAACAGAAATGATGCTGGTCTGGCTGCTTCTGAATTAGCCCTGG
<i>GmUAH</i> 2	827	GTGCTGTCCTTATGCCTAACAGAAATGATGCTGGTCTGGCTGCTTCTGAATTAGCCCTGG
<i>GmUAH</i> 1	899	CTGTAGAGAGGCATGTGTTGGATTCTGGTTCAATTGATACTGTTGGCACTGT CGGTATCC

GmUAH 2 887 CTGTAGAGAGGCATGTGTTGGATTCTGGTTCAATTGATACTGTTGGCACTGTTGGTATCC

GmUAH 1 959 TGGAACTGCATCCTGGAGCAATCAACAGCATCCCCAGCAAATCTCACCTAGAAATTGACA
GmUAH 2 947 TGGAACTGCATCCTGGAGCAATCAACAGCATCCCCAGCAAATCTCACCTAGAAATTGACA

GmUAH 1 1019 CAAGAGACATTGATGAGGAAAGAAGAAATAAAGTGGTTGAGAAAATTCATCAATCAGCAA
GmUAH 2 1007 CACGAGACATTGACGAGGAAAGAAGAAATAAAGTGGTTGAGAAAATTCACCAATCAGCAA

GmUAH 1 1079 TTAAAAATAACCAAAACACGAGGTGTCAAGCTCTCTGATTTCCGTGTCATCAATCAGGATC
GmUAH 2 1067 TTAAAAATAACCAAAACACGAGGTGTCAAGCTCTCTGATTTTCATGTCATCAATCAGGATC

GmUAH 1 1139 CACCAGCCATTTCTGATGAAGCAGTCATCAAGGCAGTAGAGACTGCAACAAAAGAACTAA
GmUAH 2 1127 CACCAGCCATTTCTGATGAAGCAATCATCAAGGCAGTAGAAACTGCAACAAAAGAACTAA

GmUAH 1 1199 ACTTGACAAGCAAGTTGATGATTAGTAGAGCCTATCATGATTCATTGTTTATGGCCAGGT
GmUAH 2 1187 ACTTGACAAGCAAGTTGATGATTAGTAGAGCCTATCATGATTCATTGTTTATGGCCAGGT

GmUAH 1 1259 TGTCTCCAATGGGCATGATTTTCATTCCATGTTACAAAGGGTACAGCCATAAGCCTGAAG
GmUAH 2 1247 TGTCTCCAATGGGCATGATTTTCATTCCATGTTACAAAGGGTACAGCCATAAGCCTGAAG

GmUAH 1 1319 AGTTTGCCACCATTCAAGATATGTCAAATGGTGTAAGGTATTGGCGCTCACCCCTAGCCA
GmUAH 2 1307 AGTTTGCCACCATTCAAGATATGTCAAATGGTGTAAGGTATTAACTCACCCCTAGCCA

GmUAH 1 1379 AATTGTCCAGTCAGTAA
GmUAH 2 1367 AATTGTCCAGTCAGTAA

Abbildung 54 – cDNA-Sequenzen der Ureidoglykolat Amidohydrolasen aus Sojabohne.

Nukleotide sind rot (DNA-Sequenz für siUAH-2R), grün (DNA-Sequenz für siUAH-3R) und blau (DNA-Sequenz für siUAH-1R) unterlegt. Die Nukleotide, die das Stopkodon der *GmUAH* 2 bilden, sind gelb unterlegt. Der cDNA-Sequenzvergleich wurde mit AlignX erstellt und mit Boxshade schwarz und grau unterlegt.

7 Literatur

- Agarwal R, Burley SK und Swaminathan S (2007) Structural analysis of a ternary complex of allantoin amidohydrolase from *Escherichia coli* reveals its mechanics. *Journal Of Molecular Biology* 368: 450-463.
- Alonso JM, Stepanova AN, Leisse TJ, Kim CJ, Chen HM *et al.*, (2003) Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301(5633): 653-657.
- Atkins C (2000) Biochemical aspects of assimilate transfers along the phloem path: N-solutes in lupins. *Australian Journal Of Plant Physiology* 27(6): 531-537.
- Atkins CA, Rainbird R und Pate JS (1980) Evidence for a purine pathway of ureide synthesis in N₂-fixing nodules of cowpea [*Vigna unguiculata* (L) walp]. *Zeitschrift Für Pflanzenphysiologie* 97(3): 249-260.
- Atkins CA, Pate JS, Ritchie A und Peoples MB (1982) Metabolism and translocation of allantoin in ureide-producing grain legumes. *Plant Physiology* 70(2): 476-482.
- Bacanamwo M und Harper JE (1997) The feedback mechanism of nitrate inhibition of nitrogenase activity in soybean may involve asparagine and/or products of its metabolism. *Physiologia Plantarum* 100(2): 371-377.
- Bachrach U (1957) The aerobic breakdown of uric acid by certain pseudomonads. *Journal Of General Microbiology* 17(1): 1-11.
- Batoko H, Zheng HQ, Hawes C und Moore I (2000) A Rab1 GTPase is required for transport between the endoplasmic reticulum and golgi apparatus and for normal golgi movement in plants. *Plant Cell* 12(11): 2201-2217.
- Bell JA und Webb MA (1995) Immunoaffinity purification and comparison of allantoinases from soybean root-nodules and cotyledons. *Plant Physiology* 107(2): 435-441.
- Bertani G (1951) Studies on lysogenesis.1. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*. *Journal Of Bacteriology* 62(3): 293-300.
- Brychkova G, Alikulov Z, Fiuhr R und Sagi M (2008) A critical role for ureides in dark and senescence-induced purine remobilization is unmasked in the *AtXDHI* arabidopsis mutant. *Plant Journal* 54(3): 496-509.
- Buckholz RG und Cooper TG (1991) The allantoinase (*Dal1*) gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7(9): 913-923.
- Campbell LL (1954) The mechanism of allantoin degradation by a pseudomonas. *Journal Of Bacteriology* 68(5): 598-603.
- Campbell LL (1955) Oxidative degradation of uric acid by cell extracts of a pseudomonas. *Biochimica Et Biophysica Acta* 18(1): 160-161.
- Cendron L, Berni R, Folli C, Ramazzina I, Percudani R *et al.*, (2007) The structure of 2-oxo-4-hydroxy-4-carboxy-5-ureidoimidazoline decarboxylase provides insights into the mechanism of uric acid degradation. *The Journal Of Biological Chemistry* 282(25): 18182-18189.
- Choi KS, Lee KW und Roush AH (1966) Assay of yeast ureidoglycolatase. *Analytical Biochemistry* 17(3): 413-422.
- Clough SJ und Bent AF (1998) Floral dip: A simplified method for agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16(6): 735-743.
- Coker GT und Schaefer J (1985) N-15 and C-13 NMR determination of allantoin metabolism in developing soybean cotyledons. *Plant Physiology* 77(1): 129-135.

- Costigan SA, Franceschi VR und Ku MSB (1987)** Allantoinase activity and ureide content of mesophyll and paravenous mesophyll of soybean leaves. *Plant Science* 50(3): 179-187.
- Cusa E, Obradors N, Baldoma L, Badia J und Aguilar J (1999)** Genetic analysis of a chromosomal region containing genes required for assimilation of allantoin nitrogen and linked glyoxylate metabolism in *Escherichia coli*. *Journal Of Bacteriology* 181(24): 7479-84.
- Desimone M, Catoni E, Ludewig U, Hilpert M, Schneider A et al., (2002)** A novel superfamily of transporters for allantoin and other oxo derivatives of nitrogen heterocyclic compounds in arabidopsis. *Plant Cell* 14(4): 847-56.
- Ellis RJ (2001)** Macromolecular crowding: Obvious but underappreciated. *Trends In Biochemical Sciences* 26(10): 597-604.
- Fisher DK und Gultinan MJ (1995)** Rapid, efficient production of homozygous transgenic tobacco plants with *Agrobacterium tumefaciens* - a seed-to-seed protocol. *Plant Molecular Biology Reporter* 13(3): 278-289.
- Franke W und Hahn GE (1955)** [Studies on bacterial purine degradation. I. Uric acid degradation by *Pseudomonas aeruginosa*]. *Hoppe-Seyler's Zeitschrift Für Physiologische Chemie* 299(1): 15-38.
- French JB und Ealick SE (2010)** Biochemical and structural characterization of a ureidoglycine aminotransferase in the *Klebsiella pneumoniae* uric acid catabolic pathway. *Biochemistry* 49(29): 5975-5977.
- Glinski M, Romeis T, Witte CP, Wienkoop S und Weckwerth W (2003)** Stable isotope labeling of phosphopeptides for multiparallel kinase target analysis and identification of phosphorylation sites. *Rapid Communications In Mass Spectrometry* 17(14): 1579-1584.
- Gravenmade EJ, Vogels GD und Van der Drift C (1970)** Hydrolysis, racemization and absolute configuration of ureidoglycolate, a substrate of allantoinase. *Biochimica Et Biophysica Acta* 198(3): 569-82.
- Gutschick VP (1980)**. Energy flows in the nitrogen cycle, especially in fixation. Nitrogen fixation, Vol. I. N W.E. und O-J W.H. Baltimore, University Park Press: 17-27.
- Hanks JF, Tolbert NE und Schubert KR (1981)** Localization of enzymes of ureide biosynthesis in peroxisomes and microsomes of nodules. *Plant Physiology* 68(1): 65-69.
- Herridge DF, Atkins CA, Pate JS und Rainbird RM (1978)** Allantoin and allantoinic acid in nitrogen economy of cowpea (*Vigna unguiculata* [L] walp). *Plant Physiology* 62(4): 495-498.
- Hesberg C, Hansch R, Mendel RR und Bittner F (2004)** Tandem orientation of duplicated xanthine dehydrogenase genes from *Arabidopsis thaliana*: Differential gene expression and enzyme activities. *The Journal Of Biological Chemistry* 279(14): 13547-13554.
- Kahn K, Serfozo P und Tipton PA (1997)** Identification of the true product of the urate oxidase reaction. *Journal Of The American Chemical Society* 119(23): 5435-5442.
- Kahn K und Tipton PA (1998)** Spectroscopic characterization of intermediates in the urate oxidase reaction. *Biochemistry* 37(33): 11651-11659.
- Kawaguchi R und Bailey-Serres J (2005)** mRNA sequence features that contribute to translational regulation in arabidopsis. *Nucleic Acids Research* 33(3): 955-965.
- Kim K, Kim MI, Chung J, Ahn JH und Rhee S (2009)** Crystal structure of metal-dependent allantoinase from *Escherichia coli*. *Journal Of Molecular Biology* 387(5): 1067-1074.

- Koncz C und Schell J (1986)** The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissue-specific expression of chimeric genes carried by a novel type of agrobacterium binary vector. *Molecular & General Genetics* 204(3): 383-396.
- Kuzma MM, Hunt S und Layzell DB (1993)** Role of oxygen in the limitation and inhibition of nitrogenase activity and respiration rate in individual soybean nodules. *Plant Physiology* 101(1): 161-169.
- Laemmli UK (1970)** Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage-T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Lamberto I, Percudani R, Gatti R, Folli C und Petrucco S (2010)** Conserved alternative splicing of arabidopsis transthyretin-like determines protein localization and S-allantoin synthesis in peroxisomes. *Plant Cell* 22(5): 1564-1574.
- Layzell DB und LaRue TA (1982)** Modeling C and N transport to developing soybean fruits. *Plant Physiology* 70(5): 1290-1298.
- Lee H, Fu YH und Marzluf GA (1990)** Nucleotide-sequence and DNA recognition elements of *ALC*, the structural gene which encodes allantoinase, a purine catabolic enzyme of *Neurospora crassa*. *Biochemistry* 29(37): 8779-8787.
- Lee KW und Roush AH (1964)** Allantoinase assays + their application to yeast + soybean allantoinases. *Archives Of Biochemistry And Biophysics* 108(3): 460-467.
- Lee NG, Stein B, Suzuki H und Verma DPS (1993)** Expression of antisense nodulin-35 RNA in *Vigna aconitifolia* transgenic root-nodules retards peroxisome development and affects nitrogen availability to the plant. *Plant Journal* 3(4): 599-606.
- Leulliot N, Quevillon-Cheruel S, Sorel I, Graille M, Meyer P et al., (2004)** Crystal structure of yeast allantoinase reveals a repeated jelly roll motif. *Journal Of Biological Chemistry* 279(22): 23447-23452.
- Linka N und Weber APM (2010)** Intracellular metabolite transporters in plants. *Molecular Plant* 3(1): 21-53.
- Logemann E, Birkenbihl RP, Uelker B und Somssich IE (2006)** An improved method for preparing agrobacterium cells that simplifies the arabidopsis transformation protocol. *Plant Methods* 2.
- Lukaszewski KM, Blevins DG und Randall DD (1992)** Asparagine and boric acid cause allantoate accumulation in soybean leaves by inhibiting manganese-dependent allantoate amidohydrolase. *Plant Physiology* 99(4): 1670-1676.
- Matsumoto T, Yatazawa M und Yamamoto Y (1977)** Distribution and change in contents of allantoin and allantoinic acid in developing nodulating and non-nodulating soybean plants. *Plant And Cell Physiology* 18(2): 353-359.
- McCartney AW, Greenwood JS, Fabian MR, White KA und Mullen RT (2005)** Localization of the tomato bushy stunt virus replication protein P33 reveals a peroxisome-to-endoplasmic reticulum sorting pathway. *Plant Cell* 17(12): 3513-3531.
- McClure PR und Israel DW (1979)** Transport of nitrogen in the xylem of soybean plants. *Plant Physiology* 64(3): 411-416.
- McClure PR, Israel DW und Volk RJ (1980)** Evaluation of the relative ureide content of xylem sap as an indicator of N₂ fixation in soybeans - greenhouse studies. *Plant Physiology* 66(4): 720-725.
- McIninch JK, McIninch JD und May SW (2003)** Catalysis, stereochemistry, and inhibition of ureidoglycolate lyase. *Journal Of Biological Chemistry* 278(50): 50091-50100.
- Modric N, Derome AE, Ashcroft SJH und Poje M (1992)** Tracing and identification of uricase reaction intermediates - a direct C-13-NMR isotope-labeling evidence. *Tetrahedron Letters* 33(44): 6691-6694.

- Moehlmann T, Bernard C, Hach S und Neuhaus HE (2010)** Nucleoside transport and associated metabolism. *Plant Biology* 12: 26-34.
- Mullen RT und Trelease RN (2006)** The ER-peroxisome connection in plants: Development of the "ER semi-autonomous peroxisome maturation and replication" model for plant peroxisome biogenesis. *Biochimica Et Biophysica Acta-Molecular Cell Research* 1763(12): 1655-1668.
- Mulrooney SB und Hausinger RP (2003)** Metal ion dependence of recombinant *Escherichia coli* allantoinase. *Journal Of Bacteriology* 185(1): 126-134.
- Munoz A, Piedras P, Aguilar M und Pineda M (2001)** Urea is a product of ureidoglycolate degradation in chickpea. Purification and characterization of the ureidoglycolate urea-lyase. *Plant Physiology* 125(2): 828-834.
- Munoz A, Raso MJ, Pineda M und Piedras P (2006)** Degradation of ureidoglycolate in french bean (*Phaseolus vulgaris*) is catalysed by a ubiquitous ureidoglycolate urea-lyase. *Planta* 224(1): 175-184.
- Munoz A, Bannenberg GL, Montero O, Miguel Cabello-Diaz J, Piedras P et al., (2011)** An alternative pathway for ureide usage in legumes: Enzymatic formation of a ureidoglycolate adduct in *Cicer arietinum* and *Phaseolus vulgaris*. *Journal Of Experimental Botany* 62(1): 307-318.
- Murashige T und Skoog F (1962)** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497.
- Newcomb EH und Tandon SR (1981)** Uninfected cells of soybean root-nodules - ultrastructure suggests key role in ureide production. *Science* 212(4501): 1394-1396.
- Oldroyd GED und Downie JM (2008)**. Coordinating nodule morphogenesis with rhizobial infection in legumes. *Annual review of plant biology*. Palo Alto, Annual Reviews. **59**: 519-546.
- Pate JS, Atkins CA, White ST, Rainbird RM und Woo KC (1980)** Nitrogen nutrition and xylem transport of nitrogen in ureide-producing grain legumes. *Plant Physiology* 65(5): 961-965.
- Pelissier HC, Frerich A, Desimone M, Schumacher K und Tegeder M (2004)** PvUPS1, an allantoin transporter in nodulated roots of french bean. *Plant Physiology* 134(2): 664-675.
- Pelissier HC und Tegeder M (2007)** PvUPS1 plays a role in source-sink transport of allantoin in french bean (*Phaseolus vulgaris*). *Functional Plant Biology* 34(4): 282-291.
- Polacco JC, Thomas AL und Bledsoe PJ (1982)** A soybean seed urease-null produces urease in cell-culture. *Plant Physiology* 69(5): 1233-1240.
- Przybycin MA (2008)** Identifizierung und Charakterisierung der Ureidoglykolat Amidohydrolase aus *Arabidopsis thaliana* und *Glycine max*. *Diplomarbeit* Biochemie der Pflanzen, Freie Universität, Berlin
- Rainbird RM, Thorne JH und Hardy RW (1984)** Role of amides, amino acids, and ureides in the nutrition of developing soybean seeds. *Plant Physiology* 74(2): 329-334.
- Ramazzina I, Folli C, Secchi A, Berni R und Percudani R (2006)** Completing the uric acid degradation pathway through phylogenetic comparison of whole genomes. *Nature Chemical Biology* 2(3): 144-148.
- Ramazzina I, Costa R, Cendron L, Berni R, Peracchi A et al., (2010)** An aminotransferase branch point connects purine catabolism to amino acid recycling. *Nature Chemical Biology* 6(11): 801-806.

- Ramos J und Bisseling T (2004).** Symbiotic nitrogen fixation. Nitrogen Acquisition and Assimilation in Higher Plants. A Sara und S Ineke. Dordrecht, Kluwer Academic Publishers. **3**: 99-131.
- Raychaudhuri A und Tipton PA (2002)** Cloning and expression of the gene for soybean hydroxymethylglutaryl-CoA lyase. Localization and implications for function and mechanism. *Plant Physiology* 130(4): 2061-2068.
- Raymond S, Tocilj A, Ajamian E, Li Y, Hung MN et al., (2005)** Crystal structure of ureidoglycolate hydrolase (AllA) from *Escherichia coli* o157:H7. *Proteins* 61(2): 454-459.
- Regensburger B und Hennecke H (1983)** RNA-polymerase from *Rhizobium japonicum*. *Archives Of Microbiology* 135(2): 103-109.
- Reinbothe H und Mothes K (1962)** Urea, ureides, and guanidines in plants. *Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology* 13: 129-149.
- Rentsch D, Schmidt S und Tegeder M (2007)** Transporters for uptake and allocation of organic nitrogen compounds in plants. *Febs Letters* 581(12): 2281-2289.
- Sadowsky MJ, Tully RE, Cregan PB und Keyser HH (1987)** Genetic diversity in *Bradyrhizobium japonicum* serogroup-123 and its relation to genotype-specific nodulation of soybean. *Applied And Environmental Microbiology* 53(11): 2624-2630.
- Sambrook J, Fritsch EF und Maniatis T (1989)** Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York, NY Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarma AD, Serfozo P, Kahn K und Tipton PA (1999)** Identification and purification of hydroxymethylglutaryl-CoA lyase, a novel ureide-metabolizing enzyme. *The Journal Of Biological Chemistry* 274(48): 33863-33865.
- Schmutz J, Cannon SB, Schlueter J, Ma J, Mitros T et al., (2010)** Genome sequence of the palaeopolyploid soybean. *Nature* 463(7278): 178-183.
- Schubert KR (1986)** Products of biological nitrogen-fixation in higher-plants - synthesis, transport, and metabolism. *Annual Review Of Plant Physiology And Plant Molecular Biology* 37: 539-574.
- Serraj R, Vadez V, Denison RF und Sinclair TR (1999)** Involvement of ureides in nitrogen fixation inhibition in soybean. *Plant Physiology* 119(1): 289-296.
- Serventi F, Ramazzina I, Lamberto I, Puggioni V, Gatti R et al., (2010)** Chemical basis of nitrogen recovery through the ureide pathway: Formation and hydrolysis of S-ureidoglycine in plants and bacteria. *ACS Chemical Biology* 5(2): 203-214.
- Sessions A, Burke E, Presting G, Aux G, McElver J et al., (2002)** A high-throughput arabidopsis reverse genetics system. *Plant Cell* 14(12): 2985-2994.
- Shelp BJ und Ireland RJ (1985)** Ureide metabolism in leaves of nitrogen-fixing soybean plants. *Plant Physiology* 77(3): 779-783.
- Shin I, Percudani R und Rhee S (2012)** Structural and functional insights into (S)-ureidoglycine aminohydrolase, key enzyme of purine catabolism in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal Of Biological Chemistry* 287(22): 18796-18805.
- Sinclair AM, Trobacher CP, Mathur N, Greenwood JS und Mathur J (2009)** Peroxule extension over ER-defined paths constitutes a rapid subcellular response to hydroxyl stress. *Plant Journal* 59(2): 231-242.
- Smith PM und Atkins CA (2002)** Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiology* 128(3): 793-802.
- Stahlhut RW und Widholm JM (1989)** Ureide catabolism by soybean [*Glycine-max* (l) merrill] cell-suspension cultures.1. Urea is not an intermediate in allantoin degradation. *Journal Of Plant Physiology* 134(1): 85-89.

- Stebbins NE und Polacco JC (1995)** Urease is not essential for ureide degradation in soybean. *Plant Physiology* 109(1): 169-175.
- Thomas RJ und Schrader LE (1981)** Ureide metabolism in higher-plants. *Phytochemistry* 20(3): 361-371.
- Thomas RJ, Meyers SP und Schrader LE (1983)** Allantoinase from shoot tissues of soybeans. *Phytochemistry* 22(5): 1117-1120.
- Todd CD und Polacco JC (2004)** Soybean cultivars 'Williams 82' and 'Maple arrow' produce both urea and ammonia during ureide degradation. *Journal Of Experimental Botany* 55(398): 867-877.
- Todd CD und Polacco JC (2006)** *AtAAH* encodes a protein with allantoate amidohydrolase activity from *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 223(5): 1108-1113.
- Todd CD, Tipton PA, Blevins DG, Piedras P, Pineda M et al., (2006)** Update on ureide degradation in legumes. *Journal Of Experimental Botany* 57(1): 5-12.
- Trijbels F und Vogels GD (1966a)** Degradation of allantoin by *Pseudomonas acidovorans*. *Biochimica Et Biophysica Acta* 113(2): 292-301.
- Trijbels F und Vogels GD (1966b)** Allantoicase and ureidoglycolase in pseudomonas and penicillium species. *Biochimica Et Biophysica Acta* 118(2): 387-395.
- Trijbels F und Vogels GD (1967)** Allantoate and ureidoglycolate degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochimica Et Biophysica Acta* 132(1): 115-126.
- Vadez V und Sinclair TR (2000)** Ureide degradation pathways in intact soybean leaves. *Journal Of Experimental Botany* 51(349): 1459-1465.
- Vadez V, Sinclair TR und Serraj R (2000)** Asparagine and ureide accumulation in nodules and shoots as feedback inhibitors of N₂ fixation in soybean. *Physiologia Plantarum* 110(2): 215-223.
- Valentine RC und Wolfe RS (1961)** Glyoxylurea. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 5: 305-308.
- van den Bosch KA und Newcomb EH (1986)** Immunogold localization of nodule-specific uricase in developing soybean root-nodules. *Planta* 167(4): 425-436.
- van der Drift C und Vogels GD (1967)** Activation and inactivation of allantoate amidohydrolase. *Biochimica Et Biophysica Acta* 139(1): 162-168.
- van der Drift C und Vogels GD (1969)** Allantoate amidohydrolase. I. PH- and anion-dependent activation. *Enzymologia* 36(4): 269-277.
- van der Drift C, de Windt FE und Vogels GD (1970)** Allantoate hydrolysis by allantoate amidohydrolase. *Archives Of Biochemistry And Biophysics* 136(1): 273-279.
- Vance CP, Heichel GH und Phillips DA (1988)**. Nodulation and symbiotic dinitrogen fixation. *Alfalfa and Alfalfa Improvement*. AA Hanson. Madison, American Society of Agronomy: 229-257.
- Vogels GD (1966)** Reversible activation of allantoate amidohydrolase by acid-pretreatment and other properties of enzyme. *Biochimica Et Biophysica Acta* 113(2): 277-291.
- Vogels GD und van der Drift C (1966)** Allantoinases from bacterial plant and animal sources.2. Effect of bivalent cations and reducing substances on enzymic activity. *Biochimica Et Biophysica Acta* 122(3): 497-509.
- Vogels GD und van der Drift C (1970)** Differential analyses of glyoxylate derivatives. *Analytical Biochemistry* 33(1): 143-157.
- Voinnet O, Rivas S, Mestre P und Baulcombe D (2003)** An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. *Plant Journal* 33(5): 949-956.
- von Mering C, Jensen LJ, Kuhn M, Chaffron S, Doerks T et al., (2007)** String 7 - recent developments in the integration and prediction of protein interactions. *Nucleic Acids Research* 35: D358-D362.

- Watanabe S, Nakagawa A, Izumi S, Shimada H und Sakamoto A (2010)** RNA interference-mediated suppression of xanthine dehydrogenase reveals the role of purine metabolism in drought tolerance in arabidopsis. *FEBS Letters* 584(6): 1181-1186.
- Wells XE und Lees EM (1991)** Ureidoglycolate amidohydrolase from developing french bean fruits (*Phaseolus-vulgaris* [1]). *Archives Of Biochemistry And Biophysics* 287(1): 151-159.
- Werner A (2007)** Charakterisierung der Allantoat-Amidohydrolasen aus *Arabidopsis thaliana* und Sojabohne (*Glycine max*). *Diplomarbeit* Biochemie der Pflanzen, Freie Universität, Berlin
- Werner AK, Sparkes IA, Romeis T und Witte CP (2008)** Identification, biochemical characterization, and subcellular localization of allantoate amidohydrolases from arabidopsis and soybean. *Plant Physiology* 146(2): 418-430.
- Werner AK, Romeis T und Witte CP (2010)** Ureide catabolism in *Arabidopsis thaliana* and *Escherichia coli*. *Nature Chemical Biology* 6(1): 19-21.
- Werner AK und Witte CP (2011)** The biochemistry of nitrogen mobilization: Purine ring catabolism. *Trends In Plant Science* 16(7): 381-387.
- Winkler RG, Polacco JC, Blevins DG und Randall DD (1985)** Enzymic degradation of allantoate in developing soybeans. *Plant Physiology* 79(3): 787-793.
- Winkler RG, Blevins DG, Polacco JC und Randall DD (1987)** Ureide catabolism of soybeans.2. Pathway of catabolism in intact leaf tissue. *Plant Physiology* 83(3): 585-591.
- Winkler RG, Blevins DG, Polacco JC und Randall DD (1988a)** Ureide catabolism in nitrogen-fixing legumes. *Trends In Biochemical Sciences* 13(3): 97-100.
- Winkler RG, Blevins DG und Randall DD (1988b)** Ureide catabolism in soybeans: III. Ureidoglycolate amidohydrolase and allantoate amidohydrolase are activities of an allantoate degrading enzyme complex. *Plant Physiology* 86(4): 1084-1088.
- Witte CP und Medina Escobar N (2001)** In-gel detection of urease with nitroblue tetrazolium and quantification of the enzyme from different crop plants using the indophenol reaction. *Analytical Biochemistry* 290(1): 102-107.
- Witte CP, Noel LD, Gielbert J, Parker JE und Romeis T (2004)** Rapid one-step protein purification from plant material using the eight-amino acid strepII epitope. *Plant Molecular Biology* 55(1): 135-147.
- Witte CP, Rosso MG und Romeis T (2005)** Identification of three urease accessory proteins that are required for urease activation in arabidopsis. *Plant Physiology* 139(3): 1155-1162.
- Witte CP (2011)** Urea metabolism in plants. *Plant Science* 180(3): 431-438.
- Wu CH, Eisenbra.Ej und Gaudy ET (1970)** Enzymatic degradation of ureidoglycine by *Pseudomonas acidovorans*. *Biochemical And Biophysical Research Communications* 39(5): 976-982.
- Xu QP, Schwarzenbacher R, Page R, Sims E, Abdubek P et al., (2004)** Crystal structure of an allantoicase (YIR029W) from *Saccharomyces cerevisiae* at 2.4 Angstrom resolution. *Proteins-Structure Function And Bioinformatics* 56(3): 619-624.
- Xu Z, de Windt FE und van der Drift C (1995)** Purification and characterization of allantoate amidohydrolase from *Bacillus fastidiosus*. *Archives Of Biochemistry And Biophysics* 324(1): 99-104.
- Yang J und Han KH (2004)** Functional characterization of allantoinase genes from arabidopsis and a nonureide-type legume black locust. *Plant Physiology* 134(3): 1039-1049.

- Yoo HS, Genbauffe FS und Cooper TG (1985)** Identification of the ureidoglycolate hydrolase gene in the *DAL* gene cluster of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular And Cellular Biology* 5(9): 2279-2288.
- Yoo HS und Cooper TG (1991)** The ureidoglycollate hydrolase (*DAL3*) gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 7(7): 693-698.
- Zhang C, Yang C, Whitham SA und Hill JH (2009)** Development and use of an efficient DNA-based viral gene silencing vector for soybean. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 22(2): 123-131.
- Zhang C, Bradshaw JD, Whitham SA und Hill JH (2010)** The development of an efficient multipurpose bean pod mottle virus viral vector set for foreign gene expression and RNA silencing. *Plant Physiology* 153(1): 52-65.
- Zrenner R, Stitt M, Sonnewald U und Boldt R (2006)** Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *Annual Review Of Plant Biology* 57: 805-836.

Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version
aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten

Publikationen und Kongresse

Publikationen

* Publikationen, die aus der Doktorarbeit hervorgegangen sind bzw. Daten dieser enthalten.

- **Werner AK, Sparkes IA, Romeis T und Witte CP (2008)**
Identification, biochemical characterization, and subcellular localization of allantoate amidohydrolases from *Arabidopsis* and soybean.
Plant Physiology 146(2): 418-430.
- **Werner AK, Romeis T und Witte CP (2010) ***
Ureide catabolism in *Arabidopsis thaliana* and *Escherichia coli*.
Nature Chemical Biology 6(1): 19-21.
- **Cao FQ, Werner AK, Dahncke K, Romeis T, Liu LH und Witte CP (2010)**
Identification and characterization of proteins involved in rice urea and arginine catabolism.
Plant Physiology 154(1): 98-108.
- **Werner AK und Witte CP (2011) ***
The biochemistry of nitrogen mobilization: purine ring catabolism.
Trends in Plant Science 16(7): 381-387.
- **IBA Strep-tag II Application Note *:**
Strep-tag®II for Protein Purification from Plant Material

Kongresse

- **2009** 22. Tagung Molekularbiologie der Pflanzen (Dabringhausen)
Poster: *Stickstoffrecycling in Pflanzen : Identifizierung und Charakterisierung von Enzymen des Purinabbaus in Arabidopsis*
- **2010** Havel-Spree-Colloquium (Berlin)
Organisation
- **2011** Botanikertagung (Berlin)
Poster: *Nitrogen recycling in plants : Identification and characterisation of enzymes of the purine degradation pathway in Arabidopsis*
- **2012** The 23rd International Conference on *Arabidopsis* Research-ICAR
Poster: *Nitrogen Turnover Of The Purine Ring System: Identification Of Ureide Degrading Enzymes From Arabidopsis And Soybean*

Danksagung

An erster Stelle möchte ich dem Betreuer meiner Doktorarbeit Dr. Claus-Peter Witte danken. Er ermöglichte es mir, mein Projekt der Diplomarbeit weiterzuführen, was ich mit Begeisterung und großer Freude tat. Durch die langjährige Zusammenarbeit und eine klare Aufgabenteilung war es uns möglich, ein effizientes und auch erfolgreiches Team zu bilden. Sein Vertrauen erlaubte mir nicht nur ein hohes Maß an Eigenständigkeit und Freiraum, sondern gestattete es mir auch, viele Erfahrungen in Bezug auf Organisation, Betreuung und Verantwortung zu sammeln.

Ich danke Frau Prof. Dr. Tina Romeis für die Übernahme des Zweitgutachtens und dafür, dass sie mich damals in ihre Arbeitsgruppe aufgenommen hat und mir somit den enormen Wissenszuwachs ermöglichte, den ich in dieser Zeit erlangte.

Zu großem Dank bin ich Dr. Nieves Medina Escobar verpflichtet. Ich bin sehr froh, dass wir das Sojabohnenprojekt gemeinsam bearbeiten, denn unsere verschiedenen experimentellen Stärken bei gleicher Arbeitsweise und -einstellung haben eine großartige Zusammenarbeit ermöglicht, die nicht nur sehr freundschaftlich und ausgeglichen ist, sondern auch effektiv und fruchtbar. Ich bin sehr froh über die Zeit, in der wir zusammen arbeiteten und auch zukünftig noch miteinander arbeiten werden und würde jeder Zeit wieder ein Projekt mit ihr beginnen. Sie schaffte es stets, mir ein Lächeln ins Gesicht zu zaubern und mir mit ihrer ruhigen Art zu vermitteln, dass kein Problem so schlimm ist, wie es zunächst scheint.

Ich danke den Kooperationspartnern Dr. Andreas Schäfer von der Organischen Chemie der FU Berlin und Dr. Imogen Sparkes von der Oxford Brookes University für die gute Zusammenarbeit.

Als nächstes möchte ich den beiden ehemaligen Mit-Doktorandinnen Jana Scharnberg und Feng Qiu Cao danken, die für mich zu sehr guten Freundinnen wurden und mit denen ich eine großartige Zeit im Labor verbrachte.

Des Weiteren möchte ich meinen Mit-Doktoranden Benjamin Wellner, Kathleen Dahncke, Oliver Hauck und Till Myrach für die vielen Gespräche und das gute Zusammenspiel im Labor danken.

Darüber hinaus bin ich auch „meinen“ Studenten zu großem Dank verpflichtet, die von mir im Rahmen eines Laborpraktikums betreut wurden und an meinen Projekten mitgearbeitet haben. Durch ihre Hilfe konnten einige Experimente schneller und besser bearbeitet werden und das vor allem in freundschaftlicher Gesellschaft. Zu ihnen gehören: Anna Schuster, Fred Koch, Jennifer von Keyserlingk, Miriam Baradari, Karina Maldonado Hernandez und Anne Taraschewski.

Besonders dankbar bin ich für die Freundschaft zu den beiden Doktoranden Guido Durian und Eileen Kommander. Die gemeinsam verbrachten Pausen und Abende habe ich sehr genossen. Es war immer lustig und wir hatten viele anregenden Gespräche, die mir des Öfteren einen anderen Blickwinkel ermöglichten.

Ich danke allen weiteren Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Romeis für die interessante und abwechslungsreiche Zeit. Im Besonderen danke ich Dr. Silke Schilling für ihre Hilfe und die guten Gespräche.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei den Technischen Assistentinnen, Spülfrauen, Gärtnern und Mitarbeitern der Werkstatt bedanken.

Renate Grünau, Gabriele Erzigkeit (ehemalig), Karla Dünnbier und Ruth Lintermann sind die „guten Feen“ des Labors, die für den reibungslosen Ablauf der grundsätzlichen Labor-Prozesse unersetzlich sind.

Auch die Mitarbeiterinnen der Spülküchen: Frau Kirschke (ehemalig), Frau Niklas und Frau Meisner leisten stets einen wichtigen Beitrag zum allgemeinen Laborprozess.

Die sehr gute Arbeit von Bernd Richter und Reinhard Broz ermöglicht ein gleichbleibend gutes Wachstum der Pflanzen und die kontinuierliche Verfügbarkeit von ausreichend Arbeitsmaterial.

Harry Lenz, Gerhard Kiske und Dedo Koppitz als Mitarbeiter der Werkstatt kümmerten sich stets um jedes handwerkliche Problem, eine Tatsache, die mir schon des Öfteren sehr geholfen hat. Vielen Dank.