

Identifizierung und Charakterisierung der
Ribohydrolase-(RH)-Familie aus dem Laubmoos
Physcomitrella patens (Hedw.) B.S.G. und ihr
funktioneller *knockout*

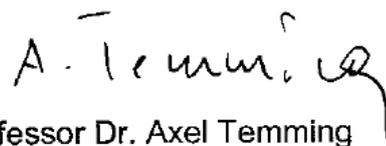
Dissertation im Department Biologie
der Fakultät Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg

von Hanna Turčinov

Hamburg im April 2011

Genehmigt vom Fachbereich Biologie
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften
an der Universität Hamburg
auf Antrag von Prof. Dr. R. LIEBEREI
Weiterer Gutachter der Dissertation:
Priv.-Doz. Dr. K. von SCHWARTZENBERG
Tag der Disputation: 24. Juni 2011

Hamburg, den 10. Juni 2011

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'A. Temming' with a stylized flourish at the end.

Professor Dr. Axel Temming
Leiter des Fachbereichs Biologie

Inhaltsverzeichnis

ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	3
1 EINLEITUNG	5
1.1 Purin/Pyrimidin-Stoffwechsel	5
1.1.1 <i>De novo</i> Synthese von Purin-Nukleotiden	6
1.1.2 Recycling von Purinen	6
1.1.3 Purin-Katabolismus	8
1.1.4 Molekulare Studien zum Purin-Metabolismus	9
1.1.5 Transport von Purinen	10
1.1.6 Physiologische Rolle des Purin/Pyrimidin-Metabolismus bei Pflanzen	11
1.2 Ribohydrolasen	12
1.3 Cytokinine	15
1.4 Der Modellorganismus <i>Physcomitrella patens</i>	16
1.5 Zielsetzung der Arbeit	19
2 MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 Chemikalien	20
2.2 Pflanzenmaterial	20
2.2.1 <i>Physcomitrella</i> Kultivierung unter Standardbedingungen	20
2.2.2 Kultivierungsbedingungen zur Bestimmung endogener Purine und Pyrimidine	22
2.2.3 Gewebeernte aus <i>Physcomitrella</i> Flüssigkulturen und Gewichtsbestimmung	22
2.2.4 Extraktion intrazellulärer Purin-, Pyrimidin- und Cytokinin-Metabolite mit Bialeski-Reagenz	23
2.2.5 Herstellung von Gewebeextrakten für die LC-MS/MS-basierte Purin/Pyrimidin-Analytik	23
2.2.6 Protoplasten-Isolierung aus <i>Physcomitrella</i> Flüssigkulturen	24
2.2.7 Transformation von <i>Physcomitrella</i>	24
2.2.8 <i>In vivo</i> Markierungsexperimente mit radioaktiv-markierten Substanzen	25
2.3 Molekularbiologie	26
2.3.1 <i>E. coli</i> -Stämme	26
2.3.2 DNA-Plasmide	27
2.3.3 Primer	27
2.3.4 PCR	29
2.3.5 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten	29
2.3.6 Aufreinigung und Isolierung von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen	30
2.3.7 Isolierung von Plasmid-DNA	30
2.3.8 Restriktionsverdau von DNA	30
2.3.9 Herstellung und Transformation von chemisch-kompetenten <i>E. coli</i> -Zellen	30
2.3.10 Ligation von DNA-Fragmenten	31
2.3.11 TOPO [®] cloning	31
2.3.12 Kryokonservierung von Bakterienstämmen	31
2.3.13 Isolierung genomischer DNA aus <i>Physcomitrella</i>	32
2.3.14 Isolierung von RNA aus <i>Physcomitrella</i>	32
2.3.15 DNase-Behandlung und reverse Transkription (RT) von RNA	33
2.3.16 Sequenzierung	33
2.3.17 Gensynthese	33
2.4 Proteinbiochemie	33
2.4.1 Herstellung von Proteinextrakten aus <i>Physcomitrella</i>	33
2.4.2 Überexpression rekombinanter RH in <i>E. coli</i>	34
2.4.3 Aufreinigung rekombinanter RH aus <i>E. coli</i> über Affinitätschromatografie	35
2.4.4 Expression von PpRH3 im Champion [™] pET SUMO Protein Expression System	35

2.4.5	Bestimmung der Proteinkonzentration	35
2.4.6	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	36
2.4.7	Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Native PAGE)	36
2.4.8	Colloidal-Coomassie-Färbung	37
2.4.9	Western Blot	37
2.4.10	Gelfiltration über FPLC	38
2.4.11	Enzym-Assays	38
2.5	RP-HPLC zur Trennung von Purin-Ribosiden und -Basen sowie Cytokinin-Ribosiden und -Basen	39
2.6	Quantifizierung von Tritium-markierten Metaboliten	40
2.7	LC-MS/MS-basierte Messungen zur Bestimmung von Purinen und Pyrimidinen	40
2.8	Kristallisierungsansätze	41
2.9	Durchlicht- und Fluoreszenz-Mikroskopie	41
2.10	Biolistische Transformation	41
2.11	Durchflusszytometrie	41
2.12	Sequenzanalysen	42
2.12.1	Sequenzsuche und -vergleiche	42
2.12.2	Bestimmung von Proteineigenschaften	42
2.12.3	Multiple Alignments und Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen	42
3	ERGEBNISSE	44
3.1	<i>In vivo</i> RH-Aktivität bei <i>Physcomitrella</i>	44
3.2	Identifizierung und Charakterisierung der RH-Genfamilie aus <i>Physcomitrella</i>	45
3.2.1	Aminosäure-Sequenzvergleiche von PpRH1, -2 und -3	47
3.3	Herstellung rekombinanter PpRHs in <i>E. coli</i>	48
3.3.1	Klonierung von <i>PpRH1</i>	48
3.3.2	Gensynthesen von <i>PpRH2</i> und -3	48
3.3.3	Heterologe Expression von PpRH1, -2 und -3 in <i>E. coli</i>	49
3.4	Charakterisierung rekombinanter PpRHs	50
3.4.1	Quartärstruktur von PpRH1	50
3.4.2	Ansätze zur Kristallisierung von PpRH1	51
3.4.3	Aktivitätsnachweis rekombinanter PpRHs	52
3.4.4	Ermittlung enzymkinetischer Parameter rekombinanter PpRHs	54
3.5	Studien zur subzellulären Lokalisierung von PpRHs	59
3.6	Gezielter <i>knockout</i> von <i>PpRH1</i>, -2 und -3 in <i>Physcomitrella</i>	61
3.6.1	Herstellung von <i>PpRH-knockout</i> Linien	61
3.6.2	Molekulare Analyse der <i>PpRH-knockout</i> Linien	62
3.6.3	<i>In vitro</i> RH-Aktivität bei <i>PpRH1-KO #29</i>	67
3.6.4	Analyse des Purin- und Cytokinin-Metabolismus bei <i>PpRH-knockout</i> Linien	68
3.6.5	Analyse der Gehalte von Purinen und Pyrimidinen in Wildtyp und <i>PpRH-knockout</i> Linien	76
4	DISKUSSION	81
4.1	<i>In vivo</i> und <i>in vitro</i> RH-Aktivität in <i>Physcomitrella</i>	81
4.2	Phylogenie von RHs	82
4.3	Validierung des Genmodells von <i>PpRH3</i>	85
4.4	Genomische Organisation von pflanzlichen RHs	86
4.5	Funktioneller Nachweis für PpRH1 und PpRH2 als RHs	88
4.5.1	Methodendiskussion der eingesetzten Enzym-Assays - Spektrophotometrischer Assay versus HPLC-basierter Assay	88
4.5.2	Charakterisierung von PpRH1	89
4.5.3	Charakterisierung von PpRH2	93
4.6	Sequenz-basierte Klassifizierung von RHs aus <i>Physcomitrella</i>	94

4.7	Hypothetische 3D-Struktur von PpRH1 und Hinweise auf katalytisch wichtige Aminosäuren	95
4.8	Charakterisierung des Purin-Metabolismus beim Wildtyp	99
4.8.1	<i>In vivo</i> Metabolismusstudien	99
4.8.2	Vorkommen von Purinen und Pyrimidinen beim Wildtyp	101
4.9	Subzelluläre Lokalisierung von PpRHs	103
4.10	Funktionelle Untersuchungen zu RHs anhand von <i>knockout</i> Mutanten	103
4.10.1	Veränderungen der RH-Aktivität nach <i>PpRH1-knockout</i>	104
4.10.2	Beeinflussung des Purin- und Cytokinin-Stoffwechsels nach <i>PpRH-knockout</i>	104
4.11	Zusammenfassende Schlüsse auf mögliche Funktionen von RHs bei <i>Physcomitrella</i>	108
4.12	Perspektiven	114
5	LITERATURVERZEICHNIS	115
6	ANHANG	125
6.1	Abkürzungsverzeichnis	125
6.2	Ergänzende Daten	127
6.2.1	Aminosäure-Sequenz von PpRH1	127
6.2.2	Aminosäure-Sequenzen von PpRH2	127
6.2.3	Aminosäure- und Nukleotid-Sequenzen von PpRH3	127
6.2.4	Ergänzende Daten zum Markierungsexperiment mit ³ H-iPR	129
6.2.5	Ergänzende Daten zu den LC-MS/MS Messungen endogener Gehalte an Purinen und Pyrimidinen	131

Zusammenfassung

Der Metabolismus von Purinen und Pyrimidinen ist von zentraler Bedeutung für das pflanzliche Wachstum und die Entwicklung, da die zugehörigen Nucleotide Bestandteile und Vorstufen zahlreicher wichtiger Substanzen sind. Hierzu zählen u.a. Nucleinsäuren, Energieträger wie ATP, Co-Enzyme wie NAD sowie Alkaloide und Cytokinine. Ein Schlüsselenzym des Purin- und Pyrimidin-Metabolismus ist das Enzym Ribohydrolase (RH), das die hydrolytische Spaltung von Ribosiden in Basen und Ribose katalysiert und darüber den Übergang von Recycling zum Katabolismus von Purin- und Pyrimidin-Metaboliten kontrolliert. In Mikroorganismen wurden RHs detailliert charakterisiert, RHs aus Pflanzen sind hingegen in der Literatur kaum beschrieben.

Ziel dieser Arbeit war eine umfassende Charakterisierung und Funktionsanalyse von RHs aus der basalen Landpflanze *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G.. *In vivo* und *in vitro* Messungen von RH-Aktivität sowie Markierungsexperimente mit ^3H -Purin-Ribosiden zeigten, dass *Physcomitrella* RH-Aktivität besitzt. Über bioinformatische Methoden wurde die RH-Genfamilie identifiziert, die aus drei Mitgliedern besteht (*PpRH1*, -2 und -3). Phylogenetische Analysen zur Erstellung eines Stammbaumes ergaben zwei Hauptgruppen für pflanzliche RHs, wobei die meisten Spezies je einen Vertreter in beiden Gruppen besitzen. Vergleiche der genomischen Organisation zeigten, dass *PpRHs* eine hoch konservierte Intron/Exon-Struktur mit den meisten pflanzlichen *RHs* teilen. Für einen funktionellen Nachweis und die Untersuchung der enzymkinetischen Parameter von *PpRHs* erfolgte die heterologe Expression in *E. coli*. Messungen der Substratspezifität identifizierten *PpRH1* als eine Purin-bevorzugende RH, die neben dem Hauptsubstrat Inosin auch Aktivität an Adenosin, Guanosin, Xanthosin sowie dem Pyrimidin Uridin und dem Cytokinin Isopentenyladenosin (iPR) zeigt. Die optimalen Reaktionsbedingungen für *PpRH1* für den Umsatz von Inosin waren bei 35 °C und einem pH von 7,5-8,0 gegeben. Gelfiltration über FPLC zeigte, dass *PpRH1* als Quartärstruktur Dimere bildet, aber bei hohen Konzentrationen auch als Tetramer vorliegen kann. *PpRH2* weist eine insgesamt niedrigere katalytische Aktivität als *PpRH1* auf und setzt vorrangig das Pyrimidin Uridin um. Versuche, rekombinantes *PpRH3* Protein zu erhalten blieben trotz zahlreicher experimenteller Varianten erfolglos. Zur Entschlüsselung der 3D-Struktur von *PpRH1* wurden erste Kristallisierungsansätze mit rekombinantem Protein realisiert. Die Bedeutung katalytisch wichtiger Aminosäuren wird anhand von *site directed mutagenesis* Experimenten diskutiert. Studien zur Expression von *PpRH*-GFP-Fusionsproteinen in *Physcomitrella* Protoplasten zeigten übereinstimmend eine cytoplasmatische Lokalisierung für *PpRH1*, -2 und -3 auf.

Um Gehalte von Purinen und Pyrimidinen im Gewebe von *Physcomitrella* zu erfassen, wurden LC-MS/MS-basierte Messungen vorgenommen. Das hierbei erstellte Purin/Pyrimidin-Profil umfasst 15 verschiedene Purin- und Pyrimidin-Metabolite, die in nmolaren Mengen im Gewebe detektiert wurden. Darüberhinaus konnten Purine und Pyrimidine auch im Kulturmedium nachgewiesen werden.

Zur Untersuchung der physiologischen Relevanz von RHs wurden *single-knockout* Linien von *PpRH1*, -2 und -3 hergestellt. *Knockout* Linien von *PpRH1* zeigten in *in vitro* Enzym-Assays keine Rest-Aktivität an Inosin. Die Inosin-Hydrolyse erfolgt demnach in *Physcomitrella* mit hoher Wahrscheinlichkeit ausschließlich *PpRH1*-abhängig. Anhand von HPLC-basierten *in vivo* Metabolismusstudien mit

radioaktiv-markierten Purinen und Cytokininen, sowie LC-MS/MS-basierten Messungen von *steady state* Gehalten von Purinen und Pyrimidinen, wurden die Folgen der verschiedenen *RH-knockouts* analysiert: Während der *knockout* von *PpRH3* kaum Auswirkungen zeigte, wurde nach dem *knockout* von *PpRH2* intrazellulär eine Akkumulation des Ribosids Uridin festgestellt. Beim *PpRH1-KO* waren die *KO*-bedingten Effekte am stärksten ausgeprägt: Hier führte der *knockout* zu einer beschleunigten Aufnahme von extern applizierten Ribosiden (Inosin, Adenosin, iPR) aus dem Kulturmedium. Die LC-MS/MS-basierten Messungen wiesen außerdem eine generelle Akkumulation von Ribosiden im Gewebe nach (vorrangig Xanthosin, Inosin, Uridin, Guanosin). Zur Aufklärung der Bedeutung von *PpRH3* sind weitere Experimente nötig. Aus den zu *PpRH1* und *PpRH2* erhobenen Daten werden folgende Schlüsse abgeleitet: *PpRH2* repräsentiert eine *RH*-Nebenaktivität, die vorrangig auf die Hydrolyse von Pyrimidinen einwirkt und vermutlich hauptsächlich im Entwicklungsstadium des Gametophors von Bedeutung ist. *PpRH1* übernimmt hingegen eine essentielle Funktion im Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsel, da es die *RH*-Hauptaktivität zum Abbau von Purin- und Pyrimidin-Ribosiden darstellt. Für einen funktionierenden Katabolismus von Ribosiden und der damit verbundenen Rückführung von Stickstoff ist *Physcomitrella* auf *PpRH1*-Aktivität angewiesen. Neben der Beteiligung am Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsel wird auch eine Rolle von *PpRHs* beim Cytokinin-Stoffwechsel diskutiert.

Die vorliegenden Daten liefern einen Beitrag zur der bisher kaum untersuchten physiologischen Funktion von *RHs* im pflanzlichen Stoffwechsel und unterstreichen die Bedeutung von *RHs* für die Balance zwischen Katabolismus und Recycling von Purinen und Pyrimidinen. Aufgrund der phylogenetischen Stellung von *Physcomitrella* werden die bei der Charakterisierung der *PpRH*-Genfamilie erhobenen Daten genutzt, die physiologische Rolle von *RHs* unter evolutionsbiologischen Aspekten zu beleuchten.

Summary

Purine and pyrimidine metabolism is of central importance for the growth and development of plants since the corresponding nucleotides represent building blocks of nucleic acids, major energy carriers, and are components of essential coenzymes such as NAD, as well as being precursors of alkaloids and cytokinins. A key enzyme associated with purine and pyrimidine metabolism is ribohydrolase (RH) that catalyzes the hydrolytic cleavage of nucleosides to the corresponding bases and ribose, and thereby balances salvage and catabolism of purines and pyrimidines. RHs have been well characterized in microorganisms but relatively little is known about their contributions to plant metabolism.

This work aimed to comprehensively characterize RHs in the basal land plant *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. *In vivo* and *in vitro* measurement of RH activity as well as feeding studies with radiolabeled purines demonstrated that *Physcomitrella* exhibits RH activity. The three member *RH* gene family of *Physcomitrella*, *PpRH1*, -2 and -3, was identified using bioinformatic tools. Phylogenetic analysis of plant RHs revealed that they mainly cluster in two groups; for those species with multiple *RHs* genes, at least one resided in each group. Comparison of the genomic organization of *PpRHs* with other plant *RHs* demonstrated that they share a highly conserved intron/exon structure. The biochemical characteristics of *PpRHs* were estimated using recombinant protein produced in *E. coli*. Measurements of substrate specificity revealed *PpRH1* to be a purine-preferring RH with the highest affinity for inosine. In addition, *PpRH1* accepted adenosine, guanosine and xanthosine as well as the pyrimidine uridine and the cytokinin isopentenyladenosine (iPR) as substrates; however, the efficiency of substrate conversions varied widely. Optimal reaction conditions for the conversion of inosine were achieved at pH 7,5-8,0 and 35°C. Gel filtration using FPLC indicated dimer formation and at higher concentrations tetramer formation of *PpRH1*. *PpRH2* possessed a much lower catalytic activity as compared to *PpRH1*. The highest catalytic activity of *PpRH2* was measured for uridine as a substrate. Preliminary crystallization experiments with *PpRH1* supported the conclusion that it forms homodimers; site-directed mutagenesis studies provided insight into key amino acids responsible for substrate specificity. The localization of *PpRHs* was studied by expression of GFP fusion proteins in protoplasts of *Physcomitrella* and consistently showed a cytoplasmic localization for *PpRH1*, -2 and -3.

A complementary study involved the measurement of purines and pyrimidines in *Physcomitrella* tissue using LC-MS/MS. The established profile comprised 15 different purine and pyrimidine metabolites each occurring in the nmolar range. Furthermore, purines and pyrimidines were detected in culture media.

To elucidate the physiological relevance of RHs, single knockouts for *PpRH1*, -2 and -3 were generated. *In vitro* enzyme assays using *PpRH1* knockout lines showed no residual activity for inosine leading to the conclusion that inosine hydrolysis is mainly mediated by *PpRH1*. HPLC-based *in vivo* metabolism studies with tritiated purines and cytokinins as well as LC-MS/MS based measurements of steady state levels of purines and pyrimidines were used to analyze the impact of each *RH* knockout. Whereas the knockout of *PpRH3* caused only slight changes, knockout of *PpRH2* led to an intracellular accumulation of the riboside uridine. The knockout of *PpRH1* had the strongest

physiological impact showing an accelerated uptake of external supplied ribosides from the culture media (inosine, adenosine, iPR). In addition, LC-MS/MS based measurements revealed an overall accumulation of ribosides in *PpRH1*-KO tissue, with particular increases in xanthosine, inosine, uridine and guanosine. Although the role of PpRH3 was not resolved, the data obtained from the *PpRH1* and *PpRH2* knockout lines led the following conclusions: PpRH2 represents a minor RH activity mainly involved in the hydrolysis of pyrimidines and is most probably primarily active at the gametophore stage. In contrast, PpRH1 has an essential function in cellular metabolism by providing the main activity for hydrolysis of purine and pyrimidine ribosides. *Physcomitrella* relies on PpRH1 activity for the maintenance of riboside catabolism and the associated nitrogen recycling. Besides their contribution to purine and pyrimidine metabolism PpRHs may also be involved in cytokinin metabolism.

These data contribute to the understanding of the physiological role of RHs in plant metabolism and underline their significance for the balancing of purine and pyrimidine catabolism and salvage. The physiological significance of RHs in plants is interpreted with respect to the phylogenetic position of *Physcomitrella* in the plant kingdom.

1 Einleitung

1.1 Purin/Pyrimidin-Stoffwechsel

Purin- und Pyrimidin-Nukleotide besitzen vielfältige Funktionen im Stoffwechsel von Pflanzen. Daher sind Biosynthese und Metabolismus von Purinen und Pyrimidinen von essentieller Bedeutung für pflanzliches Wachstum und Entwicklung. Purin- und Pyrimidin-Nukleotide setzen sich aus einer heterozyklischen Purin- oder Pyrimidin-Base zusammen, die über eine *N*-glykosidische Bindung mit dem *C1*-Atom der Ribose verknüpft ist. Je nach Energiezustand erfolgt die Veresterung der Hydroxy-Gruppe am *C5*-Atom der Ribose mit ein bis drei Phosphatgruppen. Durch Abspaltung der Phosphatgruppen durch Phosphatasen bzw. Nukleotidasen entstehen die korrespondierenden Nucleoside, auch Riboside genannt. Wird die *N*-glykosidische Bindung gespalten, liegt die freie Base vor. Zentrale Vertreter der Purin-Basen sind Adenin, Hypoxanthin, Xanthin und Guanin, wichtige Pyrimidin-Basen stellen Uracil, Cytosin und Thymin dar.

Zu den Nucleotid-Derivaten mit einer wichtigen Funktion im pflanzlichen Stoffwechsel zählen unter anderem Desoxyribonucleotide und Ribonucleotide, die die Grundbausteine für Nucleinsäuren bilden. Das Adenosin-Derivat Adenosintriphosphat (ATP) stellt einen universellen Energieüberträger bei biochemischen Reaktionen dar. ATP wird darüberhinaus genutzt, um aktivierte Vorstufen zur Synthese vieler Makromoleküle zu bilden. So werden Adenosinmonophosphat-(AMP)-aktivierte Aminosäuren zur Proteinbiosynthese benötigt und aktivierte Adenosindiphosphat-(ADP)-Glucose wird bei der Synthese von Polysacchariden wie Saccharose oder Stärke eingesetzt. Desweiteren wird angenommen, dass extrazelluläres ATP (eATP) bei Pflanzen eine Rolle als Signalmolekül bei Stressreaktionen und Wachstumsprozessen übernimmt (Song *et al.* 2006). Auch Pyrimidin-Nucleotide übernehmen in Pflanzen wichtige Funktionen. UTP, UDP und UDP-Glucose stellen Co-Substrate bzw. energiereiche Vorstufen für den Sucrose-Metabolismus und die Bildung von Cellulose sowie anderen Matrixkomponenten der Zellwand dar. Nucleotide bilden außerdem die direkten Vorstufen zur Synthese von essentiellen Co-Enzymen wie Nikotinamiddinucleotid (NAD), Flavinadeninnucleotid (FAD) oder *S*-Adenosylmethionin (SAM). Diese spielen eine entscheidende Rolle bei zahlreichen biochemischen Reaktionen wie beispielsweise der Synthese von Phospholipiden. Auch für die Bildung von Vitaminen der B-Gruppe wie Thiamin, Riboflavin werden Nucleotide als Vorstufen benötigt. Eine weitere wichtige Aufgabe kommt den Nucleotiden als Vorläufermolekülen von Sekundärmetaboliten wie Alkaloiden sowie den Phytohormonen Cytokinine zu, die einen entscheidenden Einfluss auf Wachstum und Entwicklung der Pflanzen haben. Berücksichtigt man die Anzahl und Vielfalt der Reaktionen an denen Nucleotide beteiligt sind, so repräsentieren sie nach Kohlehydraten, Proteinen und Lipiden die nächstgrößte Gruppe an wichtigen zellulären Komponenten.

Grundlegende Kenntnisse zum Nucleotid-Stoffwechsel wurden vor allem durch Studien an Mikroorganismen und Tieren gewonnen (Rolfes 2006, Zalkin und Nygaard 1996, Henderson und Paterson 1973). Bei Pflanzen sind trotz der zentralen Bedeutung von Nucleotiden viele biochemische Aspekte des Nucleotid-Stoffwechsels noch unklar. Dies hängt vermutlich mit der Komplexität der zahlreichen biochemischen Reaktionen zusammen, die zur *de novo* Synthese, zum Katabolismus und zum Recycling von Nucleotiden, Ribosiden und Basen nötig sind. Die meisten Arbeiten zum

pflanzlichen Nukleotid-Metabolismus beschäftigen sich vorrangig mit den enzymatischen Reaktionen zur Verstoffwechslung von Nukleotiden (Moffatt und Ashihara 2002, Wagner und Backer 1992). Weitere Arbeiten befassen sich mit angrenzenden Themen wie dem Stoffwechsel von Nukleinsäuren (Sugiura und Takeda 2000) oder dem Caffein-Metabolismus (Ashihara und Suzuki 2004). Physiologische und biochemische Zusammenhänge sowie molekulare Details des Nukleotid-Stoffwechsels wurden bisher nur in geringem Umfang untersucht (Zrenner *et al.* 2006, Stasolla *et al.* 2003). Im Folgenden werden die verschiedenen Aspekte des Nukleotid-Stoffwechsels dargestellt, wobei vorrangig auf den Stoffwechsel von Purinen eingegangen wird.

1.1.1 *De novo* Synthese von Purin-Nukleotiden

In Pflanzen erfolgt die Bereitstellung von Nukleotiden auf unterschiedlichen Wegen (Abb. 1.1). Einerseits können Nukleotide *de novo* hergestellt werden, andererseits ist eine Rückgewinnung von Nukleotiden aus Ribosiden und Basen über Recycling-Reaktionen möglich. Die *de novo* Synthese von Purinen erfolgt ausgehend von der aktivierten Ribose-Vorstufe 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat (PRPP), den Aminosäuren Glutamin, Glycin und Aspartat sowie 10-Formyltetrahydrofolat und Hydrogencarbonat (HCO_3^-). Aus diesen Grundbausteinen wird in einer 10stufigen Reaktionsfolge unter Verbrauch von mehreren Molekülen ATP das erste Purin, Inosinmonophosphat (IMP), gebildet. Nach der Bildung von IMP spaltet sich die *de novo* Synthese in zwei Wege auf, der eine Weg führt zur Bildung von AMP, der andere zur Bildung von GMP. Die enzymatischen Reaktionen der *de novo* Synthese laufen hauptsächlich in den Plastiden ab. In der Literatur existieren aber auch Nachweise der entsprechenden Enzym-Aktivitäten in Mitochondrien (Wagner und Backer 1992, Le Floch und Lafleuriel 1983) wie beispielsweise für einige in den Tropen vorkommende Stickstoff-fixierende Fabaceen beschrieben wurde (Atkins *et al.* 1997).

1.1.2 Recycling von Purinen

Neben der zuvor beschriebenen *de novo* Synthese von Nukleotiden können Pflanzenzellen auch anfallende Nukleotid-Abbauprodukte wie Riboside und Basen über Recycling-Reaktionen zu Nukleotiden umwandeln. Die für das Recycling erforderlichen Reaktionen werden auch unter dem Begriff *Salvage* zusammengefasst. Freie Riboside und Basen entstehen bei verschiedenen katabolischen Prozessen in der Zelle wie beispielsweise beim Abbau von Nukleinsäuren oder bei der Mobilisierung von Speicherprodukten während der Keimung. Adenin und Adenosin werden außerdem bei der Methionin- und Ethylen-Synthese freigesetzt. Die Rückführung von Ribosiden und Basen ist energetisch für die Pflanze deutlich günstiger als die *de novo* Synthese von Nukleotiden. Während die *de novo* Synthese von Purinen fünf Moleküle ATP verbraucht, wird für das Recycling lediglich in einem enzymatischen Schritt Energie in Form von ATP benötigt (Moffatt und Ashihara 2002). Im Gegensatz zu den Reaktionen der *de novo* Synthese, die einen hohen Konservierungsgrad in verschiedenen Eukaryoten aufweisen, sind die Reaktionen des Recyclings von Purinen weitaus komplexer und bisher noch nicht vollständig verstanden (Möhlmann *et al.* 2010, Katahira und Ashihara 2006, Sugiura und Takeda 2000).

Zum Recycling werden Purin-Riboside durch Kinasen unter ATP-Verbrauch in das korrespondierende Nucleosidmonophosphat überführt (Abb. 1.1). Analog hierzu werden die Purin-Basen dem Nucleosidmonophosphat-Pool durch Aktivität von Phosphoribosyltransferasen wieder zugeführt.

Purin-Metabolismus

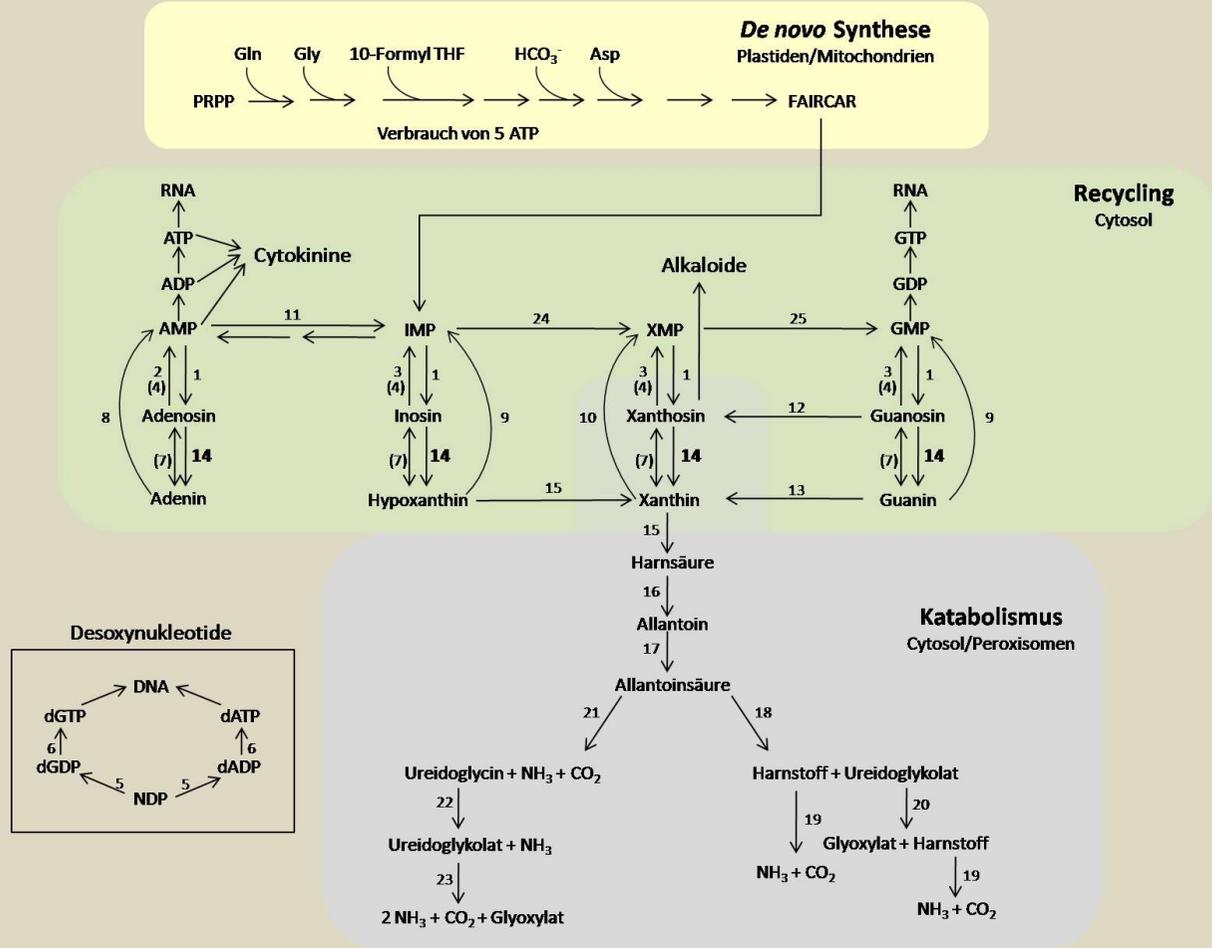


Abb. 1.1 Schematischer Überblick über den pflanzlichen Purin-Stoffwechsel. PRPP – 5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat; Gln – Glutamin; Gly – Glycin, 10-Formyl THF – 10-Formyltetrahydrofolat; Asp – Aspartat; FAIRCAR – 5-Formaminoimidazol-4-carboxamidribonukleotid; AMP, (d)ADP, (d)ATP – (Desoxy-)Adenosinmono-, -di- und -triphosphat; GMP, (d)GDP, (d)GTP – (Desoxy-)Guanosinmono-, -di- und -triphosphat; IMP – Inosinmonophosphat; XMP – Xanthosinmonophosphat; NDP – Nukleosiddiphosphat. Beteiligte Enzyme: 1 – 5'-Nukleotidase; 2 – Adenosinkinase (ADK); 3 – Inosin/Guanosinkinase; 4 – Nukleosid-Phosphotransferasen; 5 – Ribonukleotid-Reduktase; 6 – Nukleosiddiphosphatkinase; 7 – Purin-Nukleosid-Phosphorylase; 8 – Adeninphosphoribosyltransferase (APRT); 9 – Hypoxanthin/Guaninphosphoribosyltransferase; 10 – Xanthinphosphoribosyltransferase; 11 – AMP-Deaminase; 12 – Guanosin-Deaminase; 13 – Guanin-Deaminase; 14 – Ribohydrolase (RH)/Nukleosid-Hydrolase; 15 – Xanthin-Dehydrogenase (XDH); 16 – Uricase; 17 – Allantoinase; 18 – Allantoicase; 19 – Urease; 20 – Ureidoglykolat-Lyase; 21 – Allantoinsäure-Deaminase; 22 – Ureidoglycinamidohydrolase; 23 – Ureidoglykolat-Hydrolase; 24 – IMP-Dehydrogenase; 25 – GMP-Synthase. Schema modifiziert nach Katahira und Ashihara (2006) und Zrenner *et al.* (2006).

5'-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat (PRPP) dient dabei als Quelle für Ribose-1-phosphat. Weitere an Recycling-Reaktionen beteiligte Enzyme sind Ribohydrolasen (siehe auch 1.2), die die Basen in Riboside überführen. Diesen Enzymen kommt insofern eine Schlüsselrolle zu, als dass die katalysierten Reaktionen am Übergang zwischen Recycling und Katabolismus der Purin-Metabolite stehen. Purin-Nukleosid-Phosphorylasen, die Basen unter Verbrauch von Ribose-1-phosphat in Riboside umwandeln sowie Nukleosid-Phosphotransferasen, die Riboside in Nukleotide überführen, scheinen in Pflanzen eine eher untergeordnete Rolle zu spielen (Wagner und Backer 1992).

Einige der in das Purin-Recycling involvierten Enzyme aus Pflanzen wurden bereits auf molekularer Ebene charakterisiert (Stasolla *et al.* 2003). Hierzu zählen u.a. Adenosinkinase (ADK, Moffatt *et al.* 2000), Adeninphosphoribosyltransferase (APRT, Moffatt *et al.* 1994) sowie Hypoxanthin/Guaninphosphoribosyltransferase (Liu *et al.* 2007). Die enorme Wichtigkeit eines funktionierenden Recyclings von Purinen wurde an entsprechenden *Arabidopsis* Mutanten demonstriert. *ADK-knockout*-Mutanten waren in ihrer Fähigkeit Methylierungsreaktionen vorzunehmen limitiert und zeigten in der Folge eine verminderte Fertilität sowie ein stark reduziertes Blattwachstum (Moffatt *et al.* 2002). *Arabidopsis* Pflanzen mit verminderter APRT-Aktivität verloren hingegen die Fähigkeit fertile Pollen zu produzieren (Moffatt und Somerville 1988). Neben der zentralen Bedeutung im Purin-Recycling wurde darüber hinaus nachgewiesen, dass ADK und APRT auch bei der Interkonversion von Cytokinin eine wichtige Rolle spielen. Diese Enzyme scheinen also durch ihre Beteiligung im Purin- und Cytokinin-Stoffwechsel eine duale Funktion zu übernehmen (Allen *et al.* 2002, Moffatt *et al.* 2000).

1.1.3 Purin-Katabolismus

Der Abbau von Purinen spielt eine wichtige Rolle im Stickstoff-Metabolismus der Pflanzen. Während bei vielen Tieren, insbesondere höheren Primaten, Harnsäure das Endprodukt des Purin-Katabolismus bildet und exkretiert wird, sind Pflanzen auf eine effiziente Stickstoff-Wiederverwertung angewiesen. In den meisten Pflanzen erfolgt daher die oxidative Degradierung von Purinen über Allantoin und Harnstoff zu CO₂ und NH₃, das dann über den GS/GOGAT-Zyklus reassimiliert werden kann. Eine Schlüsselkomponente des Purin-Katabolismus stellt Xanthin dar (Abb. 1.1). Alle abzubauenen Purin-Metabolite werden daher zunächst zu Xanthin umgewandelt bevor der eigentliche Abbau des Purin-Rings stattfindet. Hierzu erfolgen Deaminierung, Dephosphorylierung sowie die Spaltung von glykosidischen Bindungen. Ausgehend von AMP wird zunächst die Amino-Gruppe durch AMP-Deaminase entfernt, wodurch IMP gebildet wird. Der

anschließende Abbau von IMP kann auf zwei unterschiedlichen Wegen erfolgen: Entweder wird IMP über eine 5'-Nukleotidase (oder Phosphatase) zu dem entsprechenden Ribosid Inosin umgesetzt oder IMP wird durch eine IMP-Dehydrogenase zu XMP umgewandelt, das im Anschluss zu Xanthosin dephosphoryliert wird. Von den entstandenen Ribosiden, Inosin bzw. Xanthosin, wird durch Aktivität einer Ribohydrolase (siehe auch 1.2) die Ribose abgespalten, so dass die Basen Hypoxanthin bzw. Xanthin entstehen. Diese werden spezifisch von Xanthin-Dehydrogenase über Xanthin zu Harnsäure oxidiert. Harnsäure wird über Uricase in Allantoin umgewandelt, welches wiederum zu Allantoinsäure *via* Allantoinase umgesetzt wird. Allantoin und Allantoinsäure stellen wichtige Stickstoff-Speicher- und -Transportkomponenten bei einigen tropischen Fabaceen dar (Smith und Atkins 2002). Für die weitere Verstoffwechslung von Allantoinsäure zu CO₂ und NH₃ wurden verschiedene Wege in Pflanzen beschrieben (Zrenner *et al.* 2006, Stasolla *et al.* 2003, Moffatt und Ashihara 2002). Über den klassischen „Allantoicase-Weg“ wird Allantoinsäure über Harnstoff und Ureidoglykolat zu CO₂, NH₃ und Glyoxylat abgebaut. Der „Allantoinsäure-Deaminase-Weg“ führt hingegen zur Hydrolyse von Allantoinsäure zu CO₂, NH₃ und Ureidoglycin (Zrenner *et al.* 2006, Moffatt und Ashihara 2002, Winkler *et al.* 1988). Ureidoglycin ist instabil und wird in Ureidoglykolat umgewandelt. Das entstandene Ureidoglykolat wird anschließend zu Glyoxylat, CO₂ und NH₃ umgesetzt. Das gebildete Ammonium kann wieder in Aminosäuren eingebaut werden.

Die bei Tieren wichtigen Enzyme des Purin-Katabolismus Adenin-/Adenosin-Deaminasen konnten in Pflanzen bisher nicht eindeutig nachgewiesen werden (Zrenner *et al.* 2006). Pospíšilová *et al.* (2008) konnten zwar ein homologes Gen mit putativer Funktion in *Arabidopsis* identifizieren, die Aktivität an Adenosin und Adenin war aber sehr gering. Der Abbau von Adenin-Nukleotiden erfolgt in Pflanzen somit hauptsächlich über die Aktivität von AMP-Deaminase. Guanosin-Deaminase-Aktivität wurde hingegen in Pflanzen nachgewiesen (Ashihara *et al.* 1997). Der Katabolismus von Guanin-Nukleotiden ist somit auch über eine Dephosphorylierung zu Guanosin, das zu Xanthosin deaminiert wird, möglich.

Neben dem Recycling von Stickstoff spielen Teile des Purin-Katabolismus auch eine wichtige Rolle bei der Synthese von Alkaloiden, da diese ausgehend von Xanthosin gebildet werden (Ashihara und Suzuki 2004).

Für einen optimalen Energiehaushalt ist ein ausbalanciertes Gleichgewicht zwischen den zuvor beschriebenen Abbau- und Recycling-Prozessen von enormer Bedeutung für Pflanzen. Wie wichtig diese Möglichkeit zur Regulation ist, konnte eindrucksvoll von Geigenberger *et al.* (2005) an *Solanum tuberosum* demonstriert werden: Die reduzierte Expression von UMP-Synthase, einem wichtigen Enzym aus der Pyrimidin *de novo* Synthese, führte zu einer kompensatorischen Stimulation von den energetisch günstigeren Recycling-Prozessen.

1.1.4 Molekulare Studien zum Purin-Metabolismus

Zu den molekularen Mechanismen die den Purin-Nukleotid-Metabolismus in Pflanzen regulieren, liegen bis heute nur wenige Informationen vor. In letzter Zeit wurde aber eine immer größere Zahl an beteiligten Enzymen auf molekularer Ebene identifiziert und hinsichtlich ihrer Funktion charakterisiert, wobei dies hauptsächlich an *Arabidopsis* erfolgte.

Aus der Purin *de novo* Synthese wurde beispielsweise die Genfamilie der PRPP-Synthetase aus *Arabidopsis* von Boldt und Messutat (2003) beschrieben. Die Genfamilie besteht aus drei Isoformen

die eine differentielle Expression in verschiedenen Geweben zeigen. Senecoff und Meagher (1993) identifizierten ein 5-Aminoimidazolribonukleotid-(AIR)-Synthetase-kodierendes Gen in *Arabidopsis*. Weiterhin wurde aus *Arabidopsis* von Senecoff *et al.* (1996) eine für 5-Aminoimidazol-4-*N*-succinocarboxyamidribonukleotid-(SAICAR)-Synthetase kodierende cDNA kloniert. In das Recycling involvierte Enzyme wurden hauptsächlich aus den am Adenin-Recycling beteiligten Prozessen charakterisiert, da diese u.a. auch eine wichtige Rolle im Cytokinin-Stoffwechsel spielen (Mok und Mok 2001). Für die beiden zentralen Enzyme des Adenin-Recyclings, APRT und ADK, wurden umfangreiche Studien mit *Arabidopsis* durchgeführt (Moffatt und Ashihara 2002). APRT wird von einer Multigenfamilie mit fünf Isoformen repräsentiert, wobei die zugehörigen Transkripte nicht für alle Isoformen nachgewiesen werden konnten (Moffatt und Ashihara 2002). ADK wird in *Arabidopsis* durch zwei Gene kodiert, die beide konstitutiv exprimiert sind. Daten aus Microarray-Analysen weisen darauf hin, dass ADK auch an Transmethylierungsreaktionen zur Pektin-Synthese beteiligt ist. Gene, die für Enzyme kodieren, die am Abbau von Purinen beteiligt sind, wurden erst kürzlich identifiziert. Hierzu zählen AMP-Deaminase, Xanthin-Dehydrogenase, Uricase und Allantoinase (Zrenner *et al.* 2006). Anhand von T-DNA-Insertionsmutanten sowie der Mutagenese des AMP-Deaminase-kodierenden Gens wurde gezeigt, dass dieses Protein unter anderem wichtig für die Entwicklung der Zygote bei *Arabidopsis* ist (Xu *et al.* 2005). Die Familie der Xanthin-Dehydrogenase aus *Arabidopsis* besteht aus zwei Mitgliedern. Während *XDH2* konstitutiv exprimiert wird, scheint die Expression von *XDH1* unter Stressbedingungen aktiviert zu werden (Yesbergenova *et al.* 2005). Für Allantoinase wurde lediglich ein Gen in *Arabidopsis* nachgewiesen (Yang und Han 2004). Das korrespondierende Protein enthält ein N-terminales Signalpeptid zum Eintritt in den sekretorischen Weg. Biochemische Daten weisen auf eine Lokalisierung der Allantoinase in Peroxisomen oder im endoplasmatischen Retikulum hin. Eine eindeutige subzelluläre Lokalisierung aller Komponenten des Purin-Katabolismus steht allerdings noch aus.

1.1.5 Transport von Purinen

Die Reaktionen des Purin-Metabolismus erfolgen in unterschiedlichen Zellkompartimenten, so dass die Pflanze ein effizientes Transportsystem benötigt, um beispielsweise in den Plastiden synthetisierte Purin-Metabolite ins Cytoplasma zu überführen, wo eine weitere Verstoffwechslung der Substanzen erfolgt. Darüberhinaus muss das beim Recycling entstehende Grundgerüst von Purin- oder Pyrimidin-Nukleotiden in andere Gewebe transportiert werden, um beispielsweise den erhöhten Nukleotidbedarf von Kotyledonen oder embryonalem Gewebe decken zu können (Stasolla *et al.* 2003). In *Arabidopsis* wurden verschiedene Transporter-Familien zum Transport von Purin-Ribosiden und -Basen identifiziert (zusammengefasst von Möhlmann *et al.* 2010).

Purin-Permeasen (PUP) vermitteln den Transport von Purin- und Pyrimidin-Basen entlang eines Protonengradienten (Gillissen *et al.* 2000). Darüberhinaus wurde auch der Transport von strukturell verwandten Substanzen wie Cytokinin und dem Alkaloid Koffein für die PUP Proteine nachgewiesen (Bürkle *et al.* 2003, Gillissen *et al.* 2000). Weitere Nukleobasen-Transporter stellen die Ureid-Permeasen (UPS, Desimone *et al.* 2002) und die Nukleobase-Ascorbat-Transporter (NAT, Maurino *et al.* 2006) dar, deren detaillierte Charakterisierung allerdings noch aussteht.

Die erste Beschreibung eines pflanzlichen Nukleosid-Transporters erfolgte 2001. Möhlmann *et al.* (2001) identifizierten in *Arabidopsis* ein zur *equilibrative nucleoside transporter*-(ENT)-Familie gehörendes Transportprotein. ENTs kommen weit verbreitet in allen Organismen vor. Die Familie der

ENT Proteine aus *Arabidopsis* wurde nach heterologer Überexpression in Hefe und *Xenopus*-Oocyten eingehend charakterisiert (Wormit *et al.* 2004, Li *et al.* 2003, Möhlmann *et al.* 2001). Für alle analysierten ENT-Proteine wurde ein breites Substratspektrum gemessen, da sowohl Purine als auch Pyrimidine über einen Protonen-gekoppelten Mechanismus transportiert werden. Hirose *et al.* (2005) identifizierten ENT-Homologe in *Oryza sativa* und konnten zeigen, dass auch ein Transport von Cytokininen durch diese Transportproteine vermittelt wird. Eine weitere Gruppe von Transportern, die *concentrative nucleoside transporters* (CNTs), wurden in Säugetieren, Bakterien, *Drosophila melanogaster* und *Caenorhabditis elegans* identifiziert, scheinen in Pflanzen jedoch nicht vorzukommen.

Welche Transportsysteme den intrazellulären Transport von Purin- und Pyrimidin-Metaboliten übernehmen, ist bisher nur vereinzelt beschrieben worden. Für den Nukleosid-Transporter *AtENT1* wurde eine Lokalisierung in der Vakuolenmembran nachgewiesen, was eine mögliche Funktion von *AtENT1* im Transport von beim RNA-Abbau entstehenden Ribosiden aus der Vakuole ins Cytoplasma nahelegt (Möhlmann *et al.* 2010). Dem *Brittle 1* Transportprotein aus *Arabidopsis* (*AtBT1*), einem plastidären Nukleotid-Carrier, wurde von Kirchberger *et al.* (2008) eine Rolle beim Export von Adenylaten aus der *de novo* Synthese vom Plastiden ins Cytoplasma zugeordnet.

1.1.6 Physiologische Rolle des Purin/Pyrimidin-Metabolismus bei Pflanzen

Neben der Beschreibung von Synthesewegen und Abbau- oder Recycling-Prozessen zielen einige Studien auch auf die Aufklärung der physiologischen Bedeutung des Nukleotid-Metabolismus bei Pflanzen (zusammengefasst von Stasolla *et al.* 2003).

Untersuchungen des Nukleotid-Metabolismus während der Embryogenese von *Picea glauca* zeigten, dass während der Embryonalentwicklung sowohl die Stoffwechselwege des Recyclings als auch des Katabolismus aktiv sind. Zu Beginn der Embryo-Entwicklung, die von einer ausgeprägten Zellproliferation begleitet wird, werden große Mengen an Nukleotiden für die Nukleinsäure-Synthese benötigt. Diese werden über Recycling-Reaktionen bereitgestellt. Mit fortschreitender Embryo-Entwicklung nimmt die Zellproliferation zusammen mit der Recycling-Aktivität deutlich ab. Die Reaktionen des Katabolismus scheinen hingegen keinen zeitlichen Änderungen zu unterliegen (Ashihara *et al.* 2001).

Auch während der Keimung und dem damit verbundenen erhöhten Bedarf an Nukleotiden zur Nukleinsäure-Synthese spielt der Purin- und Pyrimidin-Metabolismus eine entscheidende Rolle. Die effektive Regulation von *de novo* Synthese, Recycling und Abbau von Purinen und Pyrimidinen stellt daher einen kritischen Faktor dar. Das dem Purin-Metabolismus während der Keimung zugrunde liegende Muster kann bei *Phaseolus mungo* laut Ashihara (1983) in drei Phasen unterschieden werden: (1) Unmetabolische Phase, (2) Recycling Phase, (3) Phase der Ureid-Bildung. Zu Beginn der Keimung, wenn das Gewebe noch nicht vollständig hydriert ist, ist der Purin-Metabolismus noch nicht funktional und extern applizierte Purine werden kaum metabolisiert. Nach Hydratisierung des Gewebes steigt der Bedarf an Nukleotiden, die über das Recycling von Ribosiden und Basen gewonnen werden. Für Enzyme des Recyclings wie ADK und APRT konnte daher bei verschiedenen Spezies während dieser Phase eine erhöhte Aktivität nachgewiesen werden (Stasolla *et al.* 2001, Guranowski und Barankiewicz 1979, Price und Murray 1969). Während der anschließenden

metabolischen Phase werden dann hauptsächlich Ureide gebildet, die eine wichtige Stickstoff-Quelle insbesondere während der frühen Phase der Keimung darstellen.

Einige Pflanzenspezies durchlaufen während ihres Vegetationszyklus Ruhephasen. Die Aufhebung dieser Ruhephasen wird von einer erhöhten Recycling-Aktivität für Adenosin und Adenin begleitet. Nach externer Applikation von Adenosin konnten dementsprechend hohe Konzentrationen an Nukleotiden wie ATP, GTP gemessen werden (Robert *et al.* 1997).

In wachsenden Kartoffelknollen konnte eine hohe *de novo* Synthese-Aktivität für Purin- und Pyrimidin-Nukleotide festgestellt werden. Parallel dazu wurde eine hohe Recycling-Aktivität vermutlich aufgrund des schnellen *turnovers* von Nukleotiden gemessen. *De novo* Synthese und Recycling tragen demnach beide dazu bei, genügend Bausteine zur Synthese von Zellwandbestandteilen und Stärke sowie einen ausreichenden Energievorrat in Form von ATP bereitzustellen (Katahira und Ashihara 2002).

Der Einfluss von Salzstress auf die Nukleotid-Biosynthese wurde von Ashihara *et al.* (2003) beschrieben: Die Autoren untersuchten den Adenosin-Stoffwechsel bei einigen Mangrovearten und konnten eine hohe Adenosin-Recycling-Aktivität als Grundlage für die ATP-Regeneration nachweisen. Generell ist bekannt, dass hohe Salzkonzentrationen einen Einfluss auf den Nukleotid-Stoffwechsel haben: Salzstress führt zu einer Reduktion des Gesamtpools an Nukleotiden, der endogene ATP-Pool wird hingegen erhöht. Große Mengen an ATP werden benötigt, um die aufgenommenen Salze zu entfernen oder - zusammen mit anderen als kompatible Solute fungierenden Substanzen - in die Vakuole zu transportieren. Weretilnyk *et al.* (2001) beobachteten einen weiteren Einfluss von hohen Salzkonzentrationen auf den Purin-Stoffwechsel: Eine Aktivierung von ADK und Adenosin-Ribohydrolase erfolgte als Antwort auf Salzstress bei *Spinacia oleracea* und *Beta vulgaris* parallel mit der Synthese von Glycinbetain als ein kompatibles Solut. Die Glycinbetain-Synthese beinhaltet drei Methylierungsschritte, die *S*-Adenosylmethionin als Methyl donor verwenden. Die Entfernung von Adenosin scheint zwingend nötig für die Aufrechterhaltung der SAM-abhängigen Methyltransferase-Aktivität und damit der Glycinbetain-Synthese zu sein.

Auch wenn das Verständnis des Nukleotid-Metabolismus bei Pflanzen stetig zunimmt, sind nach wie vor viele Zusammenhänge unklar. Messungen der *de novo* Synthese- und Recycling-Raten zusammen mit Genexpressionstudien der beteiligten Enzyme könnten neue Einblicke in die Regulation des Nukleotid-Metabolismus während der pflanzlichen Entwicklung geben. Darüber hinaus wären Bestimmungen der Gehalte von Nukleotiden, Ribosiden und freien Basen und des Fluxes zwischen den verschiedenen Pools von Interesse, um diese bei verschiedenen Spezies, in unterschiedlichen Entwicklungsstadien oder unter verschiedenen Umweltbedingungen zu vergleichen. Versuche zur Erstellung eines Purin- und Pyrimidin-Profiles des Laubmooses *Physcomitrella patens* wurden im Rahmen dieser Arbeit realisiert. Außerdem wurde der Einfluss von Ribohydrolasen, die eine Schlüsselposition am Übergang von Katabolismus und Recycling von Purinen und Pyrimidinen besitzen, auf das Purin- und Pyrimidin-Profil untersucht.

1.2 Ribohydrolasen

Wie in den vorherigen Abschnitten beschrieben sind Pflanzen in der Lage, Riboside und Basen entweder zu recyceln oder abzubauen. Eine Schlüsselrolle bei der Kontrolle der Ratio zwischen Ribosid-Abbau und -Recycling wird dabei von den im Zentrum dieser Arbeit stehenden

Ribohydrolasen (RHs) eingenommen. In der Literatur finden sich verschiedene Bezeichnungen für diese Enzymklasse. In einer aktuellen Publikation von Jung *et al.* (2011) wird der Begriff Nukleosid-Hydrolase (NSH) verwendet, in der vorliegenden Arbeit werden diese Enzyme mit dem Synonym Ribohydrolase bezeichnet. RHs katalysieren die hydrolytische Spaltung von Ribosiden zu den jeweils korrespondierenden Basen und Ribose (EC 3.2.2.x, Abb. 1.2).

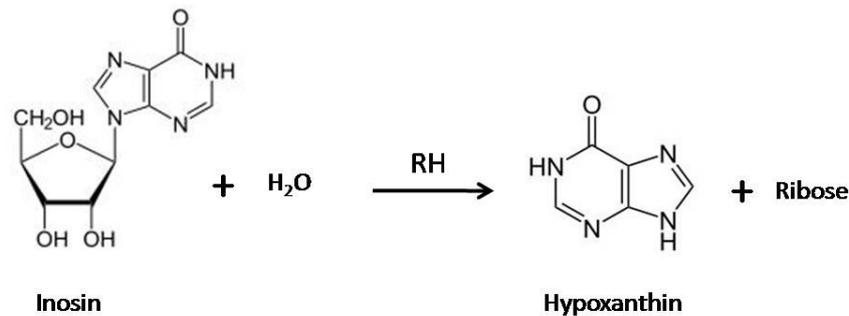


Abb. 1.2 Reaktionsmechanismus von Ribohydrolasen (RH, EC 3.2.2.x) am Beispiel von Inosin. Durch Hydrolyse der *N*-glykosidischen Bindung wird das Ribosid Inosin in die Base Hypoxanthin und Ribose gespalten.

RHs kommen weit verbreitet in der Natur vor: Sie wurden in Bakterien (Petersen und Møller 2001), Hefe (Kurtz *et al.* 2002), Pilzen, Protozoen (Parkin 1996), Pflanzen (Jung *et al.* 2009), Insekten (Ribeiro und Valenzuela 2003) und Mesozoen (Versées *et al.* 2003) nachgewiesen. Das meiste Verständnis über RHs stammt aus Arbeiten über parasitische Protozoen (Shi *et al.* 1999, Degano *et al.* 1996, Parkin 1996). Protozoen wie z.B. die humanpathogenen Vertreter *Trypanosoma brucei*, *Crithidia fasciculata* und *Leishmania major* sind obligat auf die Aktivität einer RH angewiesen, da sie die nötige enzymatische Ausstattung zur *de novo* Synthese von Purinen nicht besitzen (Parkin *et al.* 1991). Die aus dem Wirtsorganismus importierten Purin-Derivate werden daher zur Versorgung des Nukleotid-Stoffwechsels dem Recycling zugeführt. Aus diesem Grund können RHs in Protozoen als potentielle *Targets* für die Chemotherapie genutzt werden und die entsprechenden Enzyme wurden daher eingehend hinsichtlich ihrer Struktur und Substratspezifität untersucht. Alle bisher beschriebenen RHs besitzen ein N-terminales Sequenzmotiv bestehend aus vier Aspartat-Resten (DXDXXXDD), das als ein wichtiges Kennzeichen für RH-Aktivität gilt (Versées und Steyaert 2003). Kristallstrukturen wurden beispielsweise für RHs aus den Protisten *C. fasciculata* und *L. major* sowie dem Bakterium *E. coli* aufgeklärt (Giabbai und Degano 2004, Shi *et al.* 1999, Degano *et al.* 1996). Außerdem wurde eine Uridin-RH aus *Saccharomyces cerevisiae* hinsichtlich ihrer Eigenschaften und ihrer Funktion im Nukleotid-Recycling charakterisiert (Kurtz *et al.* 2002, Magni *et al.* 1975).

Da RHs bei Säugetieren nicht vorkommen, erfolgt der Abbau der Riboside hier über Nukleosid-Phosphorylasen, wobei neben der freien Base zusätzlich Ribose-1-phosphat entsteht. Unklarheit besteht hinsichtlich des Vorkommens von Nukleosid-Phosphorylasen bei Pflanzen. Eine der wenigen Veröffentlichungen über Nukleosid-Phosphorylasen bei Pflanzen stammt von Chen und Petschow (1978) und beschreibt Phosphorylase-Aktivität bei Weizenkeimlingen in Syntheserichtung anhand der Bildung von Adenosin bzw. dem Cytokinin N⁶-(Δ²-Isopentenyl)adenosin (iPR) aus den entsprechenden Basen. Der Großteil der Publikationen zum Purin-Metabolismus schließt jedoch die Existenz von Nukleosid-Phosphorylasen bei Pflanzen aus oder schreibt ihnen nur eine untergeordnete Bedeutung zu (Deng und Ashihara 2010, Katahira und Ashihara 2006, Stasolla *et al.* 2003).

Zu RHs bei Pflanzen sind bisher nur wenige Details bekannt. Die Aktivität dieser Enzyme wurde bereits für zahlreiche Pflanzenspezies nachgewiesen. Hierzu zählen beispielsweise Weizen (Chen und Kristopeit 1981), Gerste (Guranowski und Schneider 1977), Gelbe Lupine (Abusamhadneh *et al.* 2000), Jerusalem-Artischocke (Le Floc'h und Lafleuriel 1981), Tomate (Burch und Stuchbury 1986), Tee (Imagawa *et al.* 1979) und Kaffee (Campos *et al.* 2005). Die in diesen Arbeiten beschriebenen Enzyme unterschieden sich zumeist hinsichtlich ihrer Substratspezifität. Die physiologische Bedeutung von RHs für den pflanzlichen Stoffwechsel konnte bislang nicht eindeutig aufgeklärt werden. Durch die Beteiligung am Purin-Recycling wird RHs unter anderem eine Bedeutung bei der Mobilisierung der Stickstoff-Reserven in katabolisch-aktiven Geweben wie Kotyledonen beigemessen (Guranowski und Pawelkiewicz 1978). Leszczynska *et al.* (1984) wiesen für Hochleistungssorten einiger Baumarten (z.B. *Malus*-Arten) sogar eine dreifach höhere Adenosin-RH-Aktivität als im entsprechenden Wildtyp nach. Koshiishi *et al.* (2001) beschreiben einen neuen Synthese-Weg für Caffein in Blättern von *Camellia sinensis*, bei dem eine in Chloroplasten lokalisierte Adenosin-RH eine Rolle spielen soll.

Wie bereits erwähnt, kann der gesamte Purin-Metabolismus während der pflanzlichen Entwicklung starken Änderungen unterworfen sein oder zwischen verschiedenen Gewebetypen stark variieren (Deng und Ashihara 2010). In Übereinstimmung damit wurden auch veränderte RH-Aktivitäten beobachtet: Burch und Stuchbury (1986) wiesen beispielsweise in den Wurzeln von Tomatenpflanzen eine höhere RH-Aktivität als in Blättern nach. Leszczynska *et al.* (1984) konnten zeigen, dass bei einigen Baumarten wie z.B. *Fraxinus excelsior* die Adenosin-RH-Aktivität während der vegetativen Entwicklungsphase besonders hoch ist. Ferner wurden gesteigerte RH-Aktivitäten in Lupinensamen während der Keimung nachgewiesen, was als eine Folge des erhöhten Bedarfs an Purinen, insbesondere Adenin anzusehen ist. Im Gegensatz dazu wiesen getrocknete Samen keine Aktivität dieses Enzyms auf (Guranowski und Pawelkiewicz 1978).

Eine Beteiligung von RHs am Hormon-Stoffwechsel der Pflanzen wurde ebenfalls mehrfach postuliert. Bisherige Studien zur Substratspezifität zeigten, dass einige RHs in der Lage sind, neben Adenosin auch Cytokinin-Riboside umzusetzen (Jung *et al.* 2009, Chen und Kristopeit 1981). Für ADK beispielsweise wurde eine solche duale Funktion bereits nachgewiesen (Schwartzberg *et al.* 2003, Moffatt *et al.* 2000, Schwartzberg *et al.* 1998).

Trotz der zentralen Bedeutung von RHs und den zahlreichen Nachweisen der Enzym-Aktivität in Pflanzen, waren lange keine molekularen Daten zu pflanzlichen RHs bekannt. Erst kürzlich wurde erstmals die zugehörige RH-Genfamilie aus *Arabidopsis* beschrieben und charakterisiert (Jung *et al.* 2011, 2009). Neben der Charakterisierung von rekombinantem RH Protein, wurden auch entsprechende Mutanten analysiert, um Einblicke in die physiologische Bedeutung dieser Enzyme zu erhalten. Die drei identifizierten Isoformen scheinen in *Arabidopsis* unterschiedliche Funktionen zu übernehmen: Während AtNSH1 die RH-Hauptaktivität im Purin- und Pyrimidin-Katabolismus darstellt, spielt AtNSH2 eine wichtige Rolle in der späten Phase der Seneszenz und ist an der Hydrolyse von Inosin beteiligt. AtNSH3 hingegen wurde als eine extrazelluläre, Purin-spezifische RH identifiziert und ist vermutlich in den extrazellulären Abbau von Nukleotiden involviert und scheint außerdem eine Rolle bei der Pathogenantwort zu spielen. Um die physiologische Rolle von RHs unter evolutiven Gesichtspunkten zu charakterisieren, wurde in der vorliegenden Arbeit eine RH-

Genfamilie in der basalen Landpflanze *Physcomitrella patens* identifiziert und funktionell beschrieben.

1.3 Cytokinine

Wie im vorherigen Kapitel erwähnt, wurde auch der Umsatz von Cytokinin-Ribosiden durch RHs beschrieben (1.2). Cytokinine sind eine Klasse von Phytohormonen die eine Schlüsselrolle bei der Regulation der Differenzierung von Pflanzenzellen spielen und außerdem zahlreiche Wachstums- und Entwicklungsprozesse bei Pflanzen kontrollieren (Sakakibara 2006). Beeinflusste Prozesse und Phänomene sind die Zellteilung, die Apikaldominanz und die Verzögerung von Seneszenz, das Wurzelwachstum sowie die Etablierung von *Sink/Source*-Gewebe. Cytokinine sind Adenin-Derivate, bei denen das N6-Stickstoffatom einen unterschiedlich modifizierten Substituenten trägt. Natürlich vorkommend sind Isoprenoid- und aromatische Cytokinine, wobei in zahlreichen Pflanzen vornehmlich Isoprenoid-Cytokinine zu finden sind. Hierzu zählen N⁶-(Δ^2 -Isopentenyl)adenin (iP), *trans*-Zeatin (tZ), *cis*-Zeatin (cZ) und Dihydrozeatin (DHZ). Die Verteilung der Cytokinin-Formen kann je nach Pflanzenart, Gewebe oder Entwicklungsstufe variieren. Für das Laubmoos *Physcomitrella* wurden Cytokinine des cZ- und iP-Typs als vorherrschend identifiziert (Schwartzberg *et al.* 2007). Aromatische Cytokinine wie Benzyladenin (BA) oder *ortho*-Topolin (oT) wurden bisher nur in einigen wenigen Pflanzenarten nachgewiesen (Strnad 1997).

Perzeption und Biosynthese von Cytokininen

Die Perzeption von Cytokininen erfolgt über einen, dem bakteriellen Zwei-Komponenten-System ähnlichen Mechanismus, mittels sogenannter *multi step phosphorelays*. Der erste Cytokinin-Rezeptor AHK4/CRE1 wurde von Inoue *et al.* (2001) in *Arabidopsis* identifiziert. Die mittlerweile bekannten Cytokinin-Rezeptoren weisen eine hohe Ähnlichkeit auf und bestehen aus einer N-terminalen Transmembrandomäne, einer Histidinkinase-Domäne, einer Receiver-Domäne sowie einer CHASE-Domäne, an die die Cytokinine binden. *Downstream* von den Cytokinin-Rezeptoren sind Histidinphosphotransferproteine (HPTs, Suzuki *et al.* 2002) sowie Cytokinin Response Regulatoren (RRs) in die Signalweiterleitung involviert. Auch wenn das Verständnis zur Cytokinin-Perzeption in den letzten Jahren enorm erweitert wurde, sind viele Mechanismen der Signaltransduktion noch unverstanden (zusammengefasst von Pils und Heyl 2009, Heyl und Schmölling 2003).

Zur Biosynthese von Isoprenoid-Cytokininen sind zwei Wege beschrieben: Zum einen können Cytokinine über den sogenannten Adenylat-Isopentenyltransferase-Weg synthetisiert werden und zum anderen wurde ein tRNA-abhängiger Biosyntheseweg für Cytokinine beschrieben (zusammengefasst von Sakakibara 2006). Die Biosynthese von aromatischen Cytokininen ist hingegen in ihren Einzelheiten nicht verstanden.

Metabolisierung und Inaktivierung von Cytokininen

Die natürlich vorkommenden Cytokinine sind in Pflanzen neben der Basen-Form auch in Form ihrer korrespondierenden Riboside, Nukleotide und Glykoside zu finden, wobei sich die genannten Formen hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität unterscheiden. Ein weiterer Einfluss auf die Aktivität geht von der Art der Seitenkette aus. Allgemein gelten die Basen als die physiologisch aktivsten Formen. Die Regulierung der Level biologisch aktiver Cytokinine in Anpassung an externe und interne Faktoren trägt damit maßgeblich zur Steuerung der pflanzlichen Entwicklung bei.

Bei der Inaktivierung von Cytokinin werden hauptsächlich zwei Wege unterschieden: Während die reversible Inaktivierung von Cytokinin durch Umwandlung zu bestimmten Glykosiden erfolgt, kann auch eine irreversible Inaktivierung durch Abspaltung der Seitenkette durch Cytokininoxidasen/dehydrogenasen (CKX) erfolgen (Sakakibara 2007). Als Hauptsubstrate der CKX wurden die Cytokinin-Basen und -Riboside des iP- und Z-Typs identifiziert, wobei die Substratspezifität je nach Isoform variieren kann (Galuszka *et al.* 2007).

Interkonversionsreaktionen werden durch Enzyme des Purin-Stoffwechsels katalysiert. Diese besitzen zwar eine höhere Affinität für die entsprechenden Adenin-Metabolite, können aber auch Cytokinine als Adenin-Derivate umsetzen. Über 5'-Nukleotidasen wird die Umwandlung der Cytokinin-Monophosphate in Riboside katalysiert; Adenosinkinasen katalysieren die umgekehrte Reaktion. Adeninphosphoribosyltransferasen phosphoribosylieren die Basen direkt zu den entsprechenden Nukleotiden. Außerdem wurde aus Weizen eine Phosphorlyase isoliert, die die Base ins Ribosid überführt (Chen und Petschow 1978). Die generelle Existenz dieses Enzymes in Pflanzen ist allerdings umstritten.

Für die „Aktivierung“ von Cytokinin, d.h. die Bildung der physiologisch aktiveren Basen sind bisher zwei Wege für Pflanzen beschrieben worden: Zum einen kann die Bildung von Cytokinin-Basen aus den entsprechenden Ribosiden erfolgen. Dieser Weg wird vermutlich über RHs katalysiert, die in einem vorherigen Abschnitt bereits beschrieben wurden (1.2). Aktivität von RHs an Cytokinin wurde bereits nachgewiesen (z.B. Jung *et al.* 2009). Inwieweit dieser Weg *in planta* eine Rolle spielt, wurde bisher noch nicht untersucht. Ob möglicherweise bei *Physcomitrella* RHs in den Cytokinin-Stoffwechsel involviert sind, soll im Rahmen dieser Arbeit untersucht werden. Neben der Bildung der Cytokinin-Basen aus -Ribosiden *via* RH wurde in neueren Publikationen eine „Cytokinin-Aktivierung“ durch die direkte Umwandlung des Nukleotids in die aktive Basen-Form *via* 5'-Monophosphat-Phosphoribohydrolase (LOG) beschrieben (Kurakawa *et al.* 2007). Für *Arabidopsis* konnte von Kuroha *et al.* (2009) anhand von Überexpressionsmutanten gezeigt werden, dass der von LOG-katalysierte Weg zur Aktivierung von Cytokinin eine zentrale Rolle für Wachstum und Entwicklung bei *Arabidopsis* spielt. Die Gewichtung der beiden Cytokinin-Aktivierungswege über RHs und LOGs *in planta* ist bisher noch nicht eindeutig geklärt.

1.4 Der Modellorganismus *Physcomitrella patens*

Der in dieser Arbeit verwendete Modellorganismus, das Laubmoos *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G., gehört zur Familie der *Funariaceae*. Es handelt sich um einen monözischen, selbst-fertilen Organismus, der überwiegend in der nördlichen Hemisphäre auf nährstoffreichen Böden, bevorzugt auf trockengefallenen, offenen Flächen vorkommt (Frahm und Frey 2007). Vereinzelt wurden auch Vorkommen auf der Südhalbkugel beschrieben (<http://www.cosmoss.org/ecomap.content>).

Entwicklungszyklus

Physcomitrella zeigt den für Laubmoose typischen heteromorphen, heterophasischen Generationswechsel, bei dem die haploide Phase dominiert (Cove 2005, 2000). Der Entwicklungszyklus beginnt mit der Auskeimung der haploiden Spore in Anwesenheit von Licht und Wasser (Abb. 1.3). Diese wächst unter apikaler Zellteilung zum zweidimensionalen fädigen Protonema aus, das aus zwei Zelltypen besteht, dem Chloronema und dem Caulonema. Die Chloronemazellen enthalten zahlreiche Chloroplasten und besitzen senkrecht zur Achse stehende

Zellwände. Subapikale Chloronemazellen können sich teilen und Chloronemaverzweigungen bilden oder es kann unter Einfluss von Auxin (Ashton *et al.* 1979) das Caulonema entstehen. Die Zellen des Caulonemas sind im Vergleich zum Chloronema länger und dünner, enthalten wenige Chloroplasten und die Zellzwischenwände sind schräg zur Achse ausgerichtet. Unter Stress-Bedingungen oder durch die Applikation von ABA können weitere Zelltypen entstehen, die Brachyzyten und Tmema-Zellen.

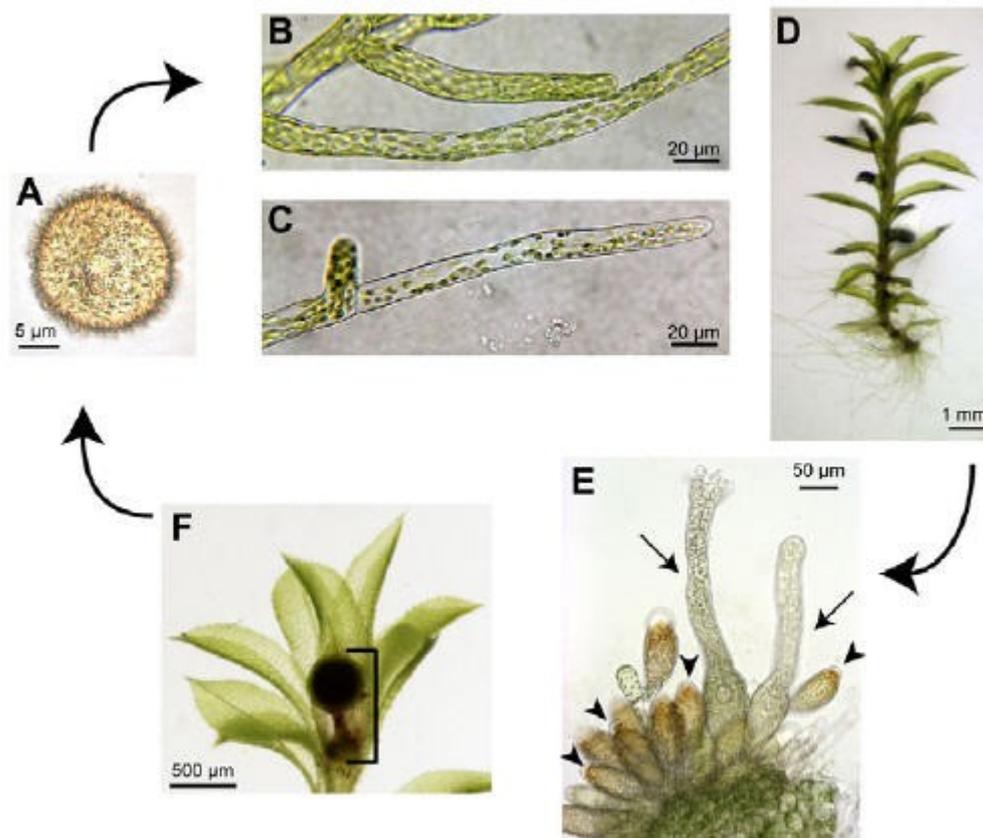


Abb. 1.3 Heteromorpher, heterophasischer Lebenszyklus von *Physcomitrella patens*: A: Auskeimende Spore (1n); B: Protonema mit Chloronemazellen; C: Protonema mit Caulonemazellen; D: Gametophor; E: Archegonien (lange Pfeile) und Antheridien (kurze Pfeile); F: Sporophyt (2n). Aus Prigge und Bezanilla (2010).

Bei den Brachyzyten handelt es sich um vegetative Dauersporen, die mit Hilfe der Tmema-Zellen verbreitet werden. Letztere dienen als Sollbruchstellen zur Fraktionierung des Chloronemafadens (Decker *et al.* 2006). Unter günstigen Umweltbedingungen und unter Einwirkungen von Cytokininen (Reski und Abel 1985) bilden sich dreidimensionale Knospen an Chloronema und Caulonema. Diese entwickeln sich weiter zu den Gametophoren, die aus Phylloid, Cauloid und Rhizoiden bestehen. Die Ausbildung der Gametophoren ist ebenfalls durch Cytokinine gesteuert. An der Spitze des Gametophoren bilden sich dann die männlichen und weiblichen Geschlechtsorgane (Antheridien und Archegonien). Nach Befruchtung der Eizelle entwickelt sich die Zygote zum diploiden Sporophyten, in dem unter Meiose die haploiden Sporen gebildet werden, die den 8 bis 10 wöchigen Lebenszyklus erneut einleiten.

***Physcomitrellas* Eigenschaften als Modellorganismus**

Der gesamte Generationszyklus von *Physcomitrella* kann *in vitro* kontrolliert werden. Zur Kultivierung werden Mineralmedien verwendet, die in der Regel weder Zucker noch andere organische Komponenten enthalten. Eine Addition von Hormonen ist nicht nötig. *Physcomitrella* wächst sowohl auf Fest- als auch in Flüssigmedium und zeichnet sich außerdem durch eine hohe Regenerationsfähigkeit aus, die ebenfalls unabhängig von der Zugabe von Wachstumshormonen erfolgt. Aufgrund dieser Eigenschaften kann *Physcomitrella* relativ einfach im Labor kultiviert werden.

Die dominierende haploide Phase bei *Physcomitrella* macht den Organismus außerdem interessant für genetische Studien, da sich rezessive Genmutationen direkt auf den Phänotyp auswirken, ohne dass aufwändige Kreuzungen nötig sind (Cove *et al.* 2006). Die Einbringung rekombinanter DNA erfolgt standardgemäß durch PEG-vermittelte Transformation von Protoplasten (Schaefer *et al.* 1991). Transgene *Physcomitrella* Pflanzen können aber auch über biolistische Transformation (Sawahel *et al.* 1992) oder *Agrobacterium*-vermittelte Transformation (Schaefer 2002) erzeugt werden. Ein weiteres besonderes Charakteristikum von *Physcomitrella* und möglicherweise weiteren Bryophyten ist, dass homologe Rekombination mit einer außerordentlich hohen Frequenz stattfindet, wie sie bisher für keine andere Pflanze beschrieben wurde (Schaefer 2001). Dies erlaubt das gezielte Ausschalten bzw. Regulieren von Genen und die Herstellung von entsprechenden *knockout* Pflanzen (*gene targeting*).

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass einzelne Gene oder Genfamilien auch über RNA Interferenz (RNAi) ausgeschaltet oder herunter reguliert werden können (Bezanilla *et al.* 2003). Khraiwesh *et al.* (2008) konnten nachweisen, dass eine Regulation der Genexpression ebenfalls über die Verwendung artifizierender microRNAs (amiRNAs) erfolgen kann, womit eine weitere Technik zur Modulation von Genexpression zur Verfügung steht.

Das haploide *Physcomitrella* Genom wurde als eines der ersten beiden von Nicht-Samenpflanzen vollständig sequenziert und veröffentlicht (Rensing *et al.* 2008). Es umfasst 480 Mbp, die auf 27 Chromosomen verteilt liegen. Die Sequenz beinhaltet 35938 vorhergesagte und annotierte Genmodelle (Rensing *et al.* 2008). Außerdem steht eine EST-Datenbank zur Verfügung, die mehr als 95 % des Transkriptoms umfasst (www.cosmoss.org, Rensing *et al.* 2002). Auch die Genome von Mitochondrien und Plastiden wurden sequenziert (Terasawa *et al.* 2007, Sugirua *et al.* 2003). Analysen des Genoms und der EST-Kollektionen zeigten, dass vor 45 Millionen Jahren mindestens eine Duplikation des Genoms erfolgte, *Physcomitrella* somit eine paleopolyploide Spezies darstellt (Rensing *et al.* 2008, 2007).

Als vor etwa 450 Millionen Jahren die Entwicklung der Landpflanzen begann, waren die Bryophyten die erste Gruppierung, die sich vor der Entwicklung zu den Gefäßpflanzen abspaltete (Rensing *et al.* 2008). Der Übergang vom Wasser- zum Landleben führte auf genomischer Ebene zum Verlust von Genen, die mit der aquatischen Lebensweise in Verbindung stehen. Gleichzeitig wurden neue Gene erworben, die die Toleranz gegenüber abiotischem Stress wie Hitze, Kälte und Trockenheit sowie die Entwicklung von Signalwegen zur Koordination von zellulären, physiologischen und regulatorischen Prozessen ermöglichen (Lang *et al.* 2008). Der Metabolismus von *Physcomitrella* stellt somit mit seiner Komplexität eine Besonderheit dar und enthält viele Stoffwechselwege, die in Samenpflanzen

nicht vorhanden sind (Rensing *et al.* 2007, Lang *et al.* 2005). Aufgrund der phylogenetischen Stellung wird *Physcomitrella* auch genutzt, um evolutionäre Veränderungen, die bei dem Übergang vom Wasser- zum Landleben erfolgten, zu untersuchen. Durch das Vorliegen des vollständig sequenzierten *Physcomitrella* Genoms können vergleichende Studien unter Einbeziehung der genomischen Daten von Samenpflanzen wie *Arabidopsis*, dem Moosfarn *Selaginella moellendorffii* und Grünalgen wie *Chlamydomonas reinhardtii* vorgenommen werden, um die evolutiven Prozesse während der Entwicklung der Landpflanzen zu rekonstruieren.

Aufgrund der zuvor genannten Eigenschaften ist das Laubmoos *Physcomitrella* mittlerweile zu einem gut etablierten Modellorganismus geworden, an dem evolutionäre Aspekte der pflanzlichen Entwicklung ebenso wie physiologische und metabolische Prozesse untersucht werden.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Wie bereits erwähnt liegen bisher nur in geringem Umfang Daten zu pflanzlichen Ribohydrolyasen vor. Auf molekularer Ebene wurde bisher nur eine Genfamilie von *RHs* in der Samenpflanze *Arabidopsis* beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *RH*-Genfamilie aus *Physcomitrella* identifiziert und eingehend charakterisiert. Hierfür wurden molekularbiologische, biochemische und physiologische Aspekte bearbeitet, die zur Beantwortung der folgenden Fragen dienen sollten:

- Wie ist die Genfamilie der *RHs* bei *Physcomitrella* beschaffen und wie unterscheidet sie sich von der Genfamilie aus *Arabidopsis*?
- In welche Gruppe der *RHs* gliedern sich *RHs* aus *Physcomitrella* ein?
- Welches sind die biochemischen Eigenschaften der *RHs* aus *Physcomitrella* und in wieweit unterscheiden sie sich voneinander?
- Welche Purine und Pyrimidine kommen bei *Physcomitrella* vor? Wie sieht das Profil des Purin-Stoffwechsels bei *Physcomitrella* aus und mit welchen Methoden kann dieser erfasst werden?
- Welche Folgen hat der *knockout* eines *RH*-Gens auf den Purin- und Cytokinin-Stoffwechsel sowie den Ablauf von Entwicklungsprozessen?

Die erhaltenen Ergebnisse sollen einen Beitrag zur Charakterisierung der bisher kaum beschriebenen Gruppe der *RHs* leisten und Rückschlüsse auf mögliche Funktionen von *RHs* ermöglichen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders angeführt, von den Firmen Fluka (Neu-Ulm, D), Merck (Darmstadt, D), Roth (Karlsruhe, D) Serva (Heidelberg, D) und Sigma-Aldrich (Taufkirchen, D) bezogen.

Folgende Isotopen-markierte Substanzen wurden in dieser Arbeit verwendet:

- Tritium-markiert: [2,8-³H]-Adenosin (Spezifische Aktivität: 15 Ci/mmol), [2,8-³H]-Inosin (Spezifische Aktivität: 29,3 Ci/mmol) (beide Hartmann Analytik, Braunschweig, D) und *N*⁶-Isopentenyl[2-³H]adenosin (Spezifische Aktivität: 32 Ci/mmol) (Institut für Experimentelle Botanik, Isotopen Labor, Prag, CZ).
- Deuterium-markiert: [D₃]S-Sulfocystein (S-Sulfo-DL-Cystein-2,3,3-D₃, C/D/N Isotopen über Dr. Ehrenstorfer, Augsburg, D) und [D₄]Thymin ([Methyl-D₃,6-D₁]-Thymin, Sigma-Aldrich).
- ¹⁵N-markiert: [¹⁵N₅]Desoxyadenosin, [¹⁵N₂]Harnsäure ([1,3-¹⁵N]-Harnsäure), [¹⁵N₄]Inosin und [¹⁵N₂]Orotsäure ([1,3-¹⁵N₂]-Orotsäure, alle von Cambridge Isotope Laboratories über EURISO-TOP, Saarbrücken, D), [¹⁵N₂]Uracil ([1,3-¹⁵N]-Uracil, Sigma-Aldrich).

Alle verwendeten Lösungen wurden mit MilliQ Wasser (Millipore, Schwabach, D) angesetzt. Für RNA-Experimente verwendete Lösungen wurden mit DEPC-behandeltem Wasser (Roth) angesetzt. Die Sterilisierung aller Lösungen erfolgte für 20 min bei 121 °C, 1,2 bar. Alternativ erfolgte die Sterilisierung über einen Filter mit 0,22 µm Porengröße (Volumen < 50 ml, Roth; Volumen > 50 ml Nalgene, Rochester, USA). Der pH-Wert aller Lösungen wurde mit dem pH-Meter 211 der Firma Hanna Instruments (Kehl am Rhein, D) eingestellt.

2.2 Pflanzenmaterial

In dieser Arbeit wurde Pflanzenmaterial des Laubmooses *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. benutzt. Der verwendete Wildtypstamm, WTL6, stammt aus der 6. Sporen-Generation des ursprünglich in Gransden Wood, Huntingdonshire (GB) von H.L.K Whitehouse 1968 gesammelten Stammes 16/14.

2.2.1 *Physcomitrella* Kultivierung unter Standardbedingungen

Zur *in vitro* Kultivierung von *Physcomitrella* wurden die folgenden Nährmedien verwendet:

A'BCD(N)TV, flüssig (modifiziert nach Wang *et al.* 1980)

A':	59 mg/l	Ca(NO ₃) ₂
B:	250 mg/l	MgSO ₄ *7H ₂ O
C:	250 mg/l	KH ₂ PO ₄
D:	1040 mg/l	KNO ₃
(N:	920 mg /l	di-NH ₄ -Tartrat)
T:	1 ml/l	TES Lösung (siehe unten)
V:	1 ml/l	je Vitamin (siehe unten)
	12,5 mg/l	FeSO ₄ *7H ₂ O

Die pH-Einstellung auf 6,5 erfolgte mit KOH.

ABC(N)TV, fest (modifiziert nach Knight *et al.* 1988)

A:	1118 mg/l	Ca(NO ₃) ₂ *4H ₂ O
B:	250 mg/l	MgSO ₄ *7H ₂ O
C:	250 mg/l	KH ₂ PO ₄
(N:	920 mg/l	di-NH ₄ -Tartrat)
T:	1 ml/l	TES Lösung (siehe unten)
V:	1 ml/l	je Vitamin (siehe unten)
	12,5 mg/l	FeSO ₄ *7H ₂ O
	13 g/l	Agar

Die pH-Einstellung auf 6,5 erfolgte mit KOH.

Die Zugabe von di-Ammoniumtartrat erfolgte nur in solchen Experimenten, wo keine Ausdifferenzierung des Gewebes gewünscht wurde.

TES (Spurenelement-Stammlösung) (1000x) (modifiziert nach Ashton und Cove 1977)

H ₃ BO ₃	614 mg/l
MnCl ₂ *4H ₂ O	389 mg/l
NiCl ₂ *6H ₂ O	59 mg/l
CoCl ₂ *6H ₂ O	55 mg/l
CuSO ₄ *5H ₂ O	55 mg/l
ZnSO ₄ *7H ₂ O	55 mg/l
Al(SO ₄) ₃ *18H ₂ O	38,6 mg/l
KBr	28 mg/l
KI	28 mg/l
LiCl	28 mg/l
SnCl ₂ *2H ₂ O	28 mg/l

Vitamin-Stammlösungen (1000x)

p-Aminobenzoesäure	0,25 g/l
Nicotinsäure	1 g/l
Thiamin/HCl	5 g/l

Physcomitrella wurde in Klimaschränken (RUMED Typ 1602+, Rubarth Apparate, Laatzten) bei 25 ±1 °C unter Weißlicht (Leuchtstoffröhren Philips TLM 18W/840) mit einer Beleuchtungsstärke von ca. 50 µmol m⁻² s⁻¹ unter Langtag-Bedingungen (16 h Licht, 8 h Dunkel) kultiviert.

Sterile Flüssigkulturen wurden in A'BCD(N)TV-Medium in 500 ml oder 1 l-Flaschen, die mit einem mit Aluminiumfolie umwickelten Wattestopfen abgedichtet waren, kultiviert. Die Belüftung und Durchmischung der Kulturen erfolgte über sterile, wasserdampfgesättigte Druckluft (ca. 600 ml/min), die über einen Glasstab in der Mitte des Wattestopfens, verbunden mit einem Silikonschlauch mit Filter (0,22 µm Porengröße, Roth), in die Kulturen gepumpt wurde. Zur Aufrechterhaltung von optimalen Wachstumsbedingungen, wurden die Kulturen alle 7 bis 10 Tage mit einem Dispergiergerät zerkleinert (Ultra-Turrax T25 basic, Typ S 25 N-18 G, IKA, Staufen, D). Das Gewebe wurde anschließend über ein Nylonsieb mit einer Porengröße von 50-100 µm (Wilson Siebe, Nottingham, GB) vom Medium getrennt, gründlich mit Medium gewaschen und mit frischem Kulturmedium versetzt.

Zur sterilen Kultivierung von *Physcomitrella* auf Festmedium wurden kleinere Gewebemengen aus Flüssigkulturen auf Agarplatten mit ABC(N)TV-Medium transferiert.

Für die sterile Anzucht von Flüssigkulturen wurde, ausgehend von einer auf Festmedium gewachsenen Kultur, Gewebe in frisches A'BCD(N)TV-Medium überführt, mechanisch mit einem Dispergiergerät zerkleinert und in CultiFlasks® (Sartorius AG, Göttingen, D) oder 100 ml Erlenmeyerkolben verschlossen mit einem Silikonstopfen, überführt. Zur Durchmischung wurden die Kulturen im Klimaschrank auf einem Schüttler bei ca. 100 rpm gehalten.

Die Sterilität der Flüssigkulturen wurde regelmäßig überprüft, indem kleine Mengen einer Flüssigkultur auf LB-Agarplatten (2.3.9) appliziert und dann bei 22 °C für 3 bis 5 Tage inkubiert wurden.

2.2.2 Kultivierungsbedingungen zur Bestimmung endogener Purine und Pyrimidine

Zur Bestimmung von endogenen Purinen und Pyrimidinen beim Wildtyp sowie den Transformanten *PpRH1-KO #29*, *PpRH2-KO #56* und *PpRH3-KO #7* wurde das Gewebe zunächst unter Standardbedingungen (2.2.1) in A'BCDNTV-Medium bei 25 °C herangezogen. Drei Tage vor Versuchsbeginn wurde die Kultur in A'BCDTV-Medium überführt. Für den Start des Versuchs wurde das Gewebe nochmals mit reichlich A'BCDTV-Medium gewaschen (ca. 400 ml), um im Medium vorhandene Purine und Pyrimidine zu entfernen. Die angesetzten Flüssigkulturen, bestehend aus 5 g Gewebe (FG) in 1 l frischem A'BCDTV-Medium, wurden bei 25 °C unter Standardbedingungen (2.2.1) für 21 Tage kultiviert. Die Probenahme erfolgte am Tag des Versuchsstarts (T_0) und nach 21 Tagen (T_{21}). Bei jeder Probenahme wurde ein Aliquot von ca. 100 ml Kultur für die Purin/Pyrimidin-Bestimmung abgewogen. Zur Trennung von Medium und Gewebe wurden die Proben über zwei Siebe (100 µm und 50 µm, Wilson-Siebe) filtriert. Das Gewebe wurde wie unter 2.2.3 beschrieben getrocknet und bis zur Gefriertrocknung bei -20 °C gelagert.

Die Gefriertrocknung der Gewebeproben erfolgte in der Alpha I-6 Anlage (Christ, Osterode am Harz, D). Nach der vollständigen Trocknung des Gewebes wurde das Gewicht bestimmt. Die lyophilisierten Proben wurden bis zu ihrer weiteren Aufarbeitung bei -20 °C gelagert. Zur Messung endogener Gehalte ausgewählter Purine und Pyrimidine mittels LC-MS/MS wurden die Proben zunächst mit Bielecki-Reagenz extrahiert (2.2.4) und wie in 2.2.5 beschrieben weiter behandelt.

2.2.3 Gewebeernte aus *Physcomitrella* Flüssigkulturen und Gewichtsbestimmung

Das Pflanzenmaterial wurde durch Filtration über ein Nylonsieb (Wilson-Siebe) mit 50-100 µm Maschenweite geerntet. Anschließend erfolgte die Entfernung des Mediums über eine Filtrationseinheit mit Celluloseacetat-Membranfiltern (0,45 µm Porengröße, Whatmann, Dassel, D) angeschlossen an eine Wasserstrahlpumpe. Das Gewicht wurde mittels Analysenwaage bestimmt.

Zur Herstellung von Proteinextrakten (2.4.1) erfolgte die Weiterverarbeitung des Gewebes direkt im Anschluss. Zur RNA-Extraktion verwendetes Gewebe (2.3.14) wurde vor der Weiterverarbeitung zunächst in flüssigem Stickstoff gefroren.

2.2.4 Extraktion intrazellulärer Purin-, Pyrimidin- und Cytokinin-Metabolite mit Bieleski-Reagenz

Der Aufschluss von Gewebeproben zur Extraktion von Purinen, Pyrimidinen und Cytokininen erfolgte mit Bieleski-Reagenz (Bieleski 1964). Hierfür wurde das zu analysierende Gewebe in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 500 µl Bieleski-Reagenz (zur Fixierung der Metabolite und Inhibierung von Phosphatasen) sowie optional 50 µg Seesand überführt. Mit einem Plastikpistill (schuett-biotec, Göttingen, D) wurde das Gewebe mechanisch zerkleinert und anschließend nochmals mit 500 µl Bieleski-Reagenz versetzt. Alternativ wurden zum Gewebeaufschluss 3-5 Glasperlen (Ø 1,7-2 mm) zugefügt und die Proben im FastPrep FP120 Homogenizer (Savant Instruments, New York, USA) für 3 x 20 s bei einer Intensität von 5 homogenisiert. Zur vollständigen Extraktion wurden die Proben anschließend für mindestens 12 Stunden bei -20 °C bis zur weiteren Aufarbeitung gelagert.

Die in Bieleski-Reagenz gelagerten Gewebeproben wurden zunächst zur Abtrennung von Geweberesten bei 15.000 x g für 10 min zentrifugiert (Biofuge pico, Heraeus über Kendro, Hanau, D). Das Pellet wurde 1-2 Mal mit 500 µl Bieleski-Reagenz re-extrahiert und die vereinigten Überstände mit ca. 600 µl Wasser versetzt. Nach erneuter Zentrifugation, 15.000 x g, 10 min, entstand eine Phasentrennung. Der wässrige Überstand, der die zu untersuchenden Metabolite enthält, wurde zur weiteren Aufarbeitung eingesetzt (2.2.5 für LC-MS/MS-basierte Messungen bzw. 2.2.8.1 für HPLC-basierte Messungen).

Bieleski-Reagenz

nach Bieleski (1964), modifiziert nach Schwartzberg *et al.* 2003

Methanol:Chloroform:Ameisensäure:Wasser, 12:5:1:2 (v/v)

vor Verwendung gut mischen, haltbar max. 3 Monate (-20 °C)

2.2.5 Herstellung von Gewebeextrakten für die LC-MS/MS-basierte Purin/Pyrimidin-Analytik

Die Gewebeproben wurden nach ihrer vollständigen Trocknung zunächst in Bieleski-Reagenz aufgeschlossen (2.2.4). Um mögliche Verluste bei der Extraktion erfassen zu können, wurde den Proben vor der Extraktion neben Bieleski-Reagenz ein interner Standard zugefügt (100 µl je Probe). Dieser enthielt [¹⁵N₅]Desoxyadenosin, [¹⁵N₄]Inosin, [¹⁵N₂]Orotsäure, [D₃]S-Sulfocystein, [D₄]Thymin und [¹⁵N₂]Uracil (jeweils 5 µM) sowie [¹⁵N₂]Harnsäure (20 µM) (vgl. 2.1). Zur Reduktion von Matrixeffekten durch im Extrakt vorhandene Sekundärstoffe, wurde der nach Extraktion mit Bieleski-Reagenz erhaltene wässrige Überstand weiter aufgearbeitet. Zunächst wurde der zu reinigende Extrakt über eine mit PVPP gefüllte Säule (aufgeschwemmt in 0,1 M Essigsäure/Natriumacetatpuffer pH 5,6; Säulenvolumen ca. 2 ml) gegeben. Der Durchfluss wurde auf einen Ethanolgehalt von 50 % gebracht und über eine mit 50 % Ethanol vorequilibriumierte C₁₈-Säule (Sep-Pak® Plus C₁₈ Säulen, 55-105 µm, Waters, Eschborn) gegeben. Nach vollständiger Trocknung im Rotations-Vakuumkonzentrator (Speed Vac SC110, Savant Instruments, New York, USA) wurden die Proben bis zur LC-MS/MS-Analytik (2.7) bei 4 °C gelagert.

0,1 M Essigsäure/Natriumacetatpuffer, pH 5,6

48 ml/l Essigsäure (0,2 M)

452 ml/l Natriumacetat (0,2 M)

2.2.6 Protoplasten-Isolierung aus *Physcomitrella* Flüssigkulturen

Pflanzenmaterial (4-5 g) einer 4-5 Tage alten A'BCDNTV-Flüssigkultur wurde über ein Nylonsieb mit 100 µm Maschenweite (Wilson-Siebe) geerntet, mit 0,5 M Mannitol gründlich gewaschen und in eine Petrischale (Ø 9 cm) überführt. Zum Zellwand-Verdau wurden 20 ml einer steril filtrierten 0,5 % Driselase Lösung zugegeben und für 2 Stunden im Dunklen unter vorsichtigem Schütteln (100 rpm, IKA) inkubiert. Zur Abtrennung der Protoplasten von noch unverdautem Material wurde die Protoplastenlösung nacheinander über ein Nylonsieb mit 100 und 50 µm Porengröße filtriert und im Anschluss bei 50 x g für 5 min zentrifugiert (Universal 16 A, Hettich, Tuttlingen, D). Die sedimentierten Protoplasten wurden 2 Mal mit 0,5 M Mannitol gewaschen (25 und 5 ml). Zur Bestimmung der Protoplastenanzahl wurde eine Neubauer-Zählkammer verwendet. Die Protoplasten wurden dann erneut zentrifugiert und in einem entsprechenden Volumen von 3M Medium (2.2.7) aufgenommen, dass eine Dichte von $1,2 \cdot 10^6$ Protoplasten/ml ergab.

0,5 M Mannitol Lösung

550-560 mOs

0,5 % Driselase Lösung (w/v)

in 0,5 M Mannitol Lösung
frisch angesetzt, steril filtriert

2.2.7 Transformation von *Physcomitrella*

Die Transformation von *Physcomitrella* Protoplasten erfolgte nach einer leicht modifizierten Methode von Schaefer *et al.* (1991). Der Transformationsansatz setzte sich aus 300 µl Protoplasten Suspension in 3M Medium (entspricht $4 \cdot 10^6$ Protoplasten), 300 µl PEG Lösung und 25 µg DNA zusammen. Während für stabile Transformationsansätze lineare DNA verwendet wurde, wurde bei angestrebter transienter Expression zirkuläre DNA eingesetzt. Nach einer 5 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur, wurden die Ansätze einem Hitzeschock bei 45 °C für 5 min ausgesetzt und nochmals für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Aufnahme in 3M Medium, wobei nach 5 min zunächst 1, 2, 3 und dann 4 ml 3M Medium vorsichtig zugegeben wurden. Die Protoplasten wurden nochmals bei 50 x g für 5 min zentrifugiert, in 2,5 ml REG Medium aufgenommen und in eine Petrischale (Ø 3 cm) überführt. In dieser erfolgte die Regeneration zunächst für 24 Stunden im Dunklen und anschließend unter Standardbedingungen für weitere 10 Tage.

Zur Abschätzung der Transformationseffizienz, wurde bei jeder Transformation parallel ein transienter Transformationsansatz mit dem Vektor pBAS-GFP (Tab. 2.2) durchgeführt. Nach 2 bis 3 Tagen Regeneration unter Standardbedingungen wurde dem Transformationsansatz ein Aliquot zur Beobachtung der GFP-Fluoreszenz entnommen (2.9). Transiente Transformationsansätze zur Untersuchung der subzellulären Lokalisierung von PpRH1-3 wurden nach 6 Tagen am Konfokal-Lasermikroskop Leica TCS SPE ausgewertet (2.9).

Zur Selektion stabiler Transformaten wurden die regenerierenden Protoplasten auf festes ABCNTV-Medium mit einem entsprechend dem Transformationskonstrukt ausgewähltem Antibiotikum (G418: 25 µg/ml, Hygromycin: 30 µg/ml, Zeocin: 100 µg/ml) auf eine sterile Cellophanfolie (Schütt, Hamburg, D) transferiert. Je nach Wachstumsrate erfolgte der Transfer nach 10 bis 14 Tagen. Auf diesem Medium wurden die Protoplasten für 2 bis 3 Wochen kultiviert. Im Anschluss an die erste Selektionsrunde, folgte eine etwa 2 bis 3 wöchige Wachstumsperiode unter nicht-selektiven Bedingungen (ABCNTV-Medium ohne Antibiotikum) durch Überführung kleiner Mengen an

Pflanzenmaterial auf das neue Medium. Dieser Wechsel von selektiven und nicht-selektiven Wachstumsbedingungen wurde insgesamt 3 Mal wiederholt. Pflanzen, die alle 3 Zyklen überlebten, wurden als stabile Transformanten angesehen.

3M Medium	PEG Lösung	REG Medium
15 mM MgCl ₂	40 % (w/v) PEG 4000	5 % (w/v) Glucose
0,1 % MES	0,1 M Ca(NO ₃) ₂	3 % (w/v) Mannitol
0,5 M Mannitol	gelöst in 3M Medium	gelöst in ABCTV
pH 5,6; 580-590 mOs	pH 5,6	pH 5,8; 540-580 mOs

Nach der Einstellung des pHs mit KOH wurden alle Lösungen steril filtriert.

2.2.8 *In vivo* Markierungsexperimente mit radioaktiv-markierten Substanzen

Zur Charakterisierung des Purin- und Cytokinin-Metabolismus von *Physcomitrella* Wildtyp und *PpRH-knockout* Mutanten, wurden *in vivo* Markierungsexperimente in Anlehnung an Schwartzberg *et al.* (2007, 2003) durchgeführt. Pflanzengewebe wurde mit radioaktiv-markierten Purinen (³H-Adenosin, ³H-Inosin) bzw. Cytokinen (³H-Isopentenlyadenosin) inkubiert und der Metabolismus über die Analyse entnommener Proben mittels HPLC-*online*-LSC (2.5) verfolgt. In Tab. 2.1 sind die durchgeführten Markierungsexperimente angegeben.

Tab. 2.1: Übersicht über die durchgeführten *in vivo* Metabolismusstudien mit radioaktiv-markierten Substraten.

	Konzentration	Inkubation	Probennahme Medium	Probennahme Gewebe	Genotypen
³ H-Adenosin	1 µM*	60 min	0; 10; 20; 30; 40; 50; 60 min	60 min	WT; <i>PpRH1-KO #29</i>
³ H-Inosin	1 µM*	60 min	0; 10; 20; 30; 40; 50; 60 min	60 min	WT; <i>PpRH1-KO #29</i>
³ H-iPR	30 nM	25 h	0; 7; 20; 25 h	20; 25 h	WT; <i>PpRH1-KO #29</i> ; <i>PpRH2-KO #56</i> ; <i>PpRH3-KO #7</i>

* isotopische Verdünnung, $\frac{1}{10}$ radioaktiv-markiertes Substrat

Die Experimente fanden bei Raumtemperatur unter konstanter Belichtung (ca. 30 µmol m⁻² s⁻¹, Leuchtröhre Osram L, 15 W) statt. Jeweils 1 g Gewebe (FG) wurde über ein Nylonsieb (Wilson-Sieb, Maschenweite 50-100 µm) aus einer Flüssigkultur gewonnen, mit frischem A'BCDNTV-Medium gewaschen (ca. 20 ml) und in einem 50 ml-Falcontube mit 4 ml frischem A'BCDNTV-Medium versetzt. Alle Ansätze wurden über eine mit Watte gestopfte Pasteurpipette, die an eine Pumpe angeschlossen war, mit befeuchteter Luft versorgt und durchmischt. Der Versuch wurde durch Zugabe des Substrates gestartet (T₀). In regelmäßigen Abständen wurden Proben aus dem Kulturmedium entnommen (50 µl, Tab. 2.1), die bis zur HPLC Vermessung (2.5) bei -20 °C gelagert wurden. Parallel wurden ebenfalls Mediumproben (2 x 5 µl) zur Bestimmung der Gesamtradioaktivität (2.6) entnommen.

Zur Analyse der intrazellulären Metabolite wurde das Gewebe zu den in Tab. 2.1 angegebenen Zeitpunkten geerntet. Über eine Vakuum-Filtrationseinheit (Vaccum Filtration Manifold, Model 1225, Millipore) mit Glasfaserfiltern (Porengröße 0,45 µm, Whatmann) erfolgte die Trennung des Gewebes vom Medium. Zur Entfernung extern anhaftender Metabolite wurde das Gewebe 3 x mit 20 ml MilliQ Wasser gewaschen. Anschließend wurde das Frischgewicht (FG) der Gewebeproben ermittelt. Für die

Extraktion der intrazellulären Metabolite wurde das Gewebe wie unter 2.2.4 beschrieben mit Bielecki-Reagenz aufgeschlossen und anschließend wie in 2.2.8.1 angegeben weiterbehandelt.

2.2.8.1 Herstellung von Gewebeextrakten zur Extraktion radioaktiv-markierter Metabolite

Der nach Extraktion mit Bielecki-Reagenz erhaltene, wässrige Überstand (2.2.4) wurde mit 100 μ M ATP (Absättigung von Phosphatasen) versetzt und am Rotationsverdampfer (Labo Rota SE 320, resona technics, Gossau, D) auf ca. 20-50 μ l eingeeengt. Die Resuspendierung der Metabolite erfolgte in 1 ml des entsprechenden Laufmittels A (Tab. 2.5). Die Messung der Gesamtradioaktivität in den Gewebeextrakten erfolgte anhand von Aliquots (2 x 10 μ l) wie unter 2.6 beschrieben. Zur Bestimmung der intrazellulären Metabolite wurden die Proben wie unter 2.5 beschrieben direkt mittels HPLC analysiert. Bei den Experimenten bei denen zusätzlich eine Phosphatase-Behandlung vorgenommen wurde, um phosphorylierte Metabolite zu bestimmen, wurde die Hälfte des Gewebeextraktes aufbewahrt und wie unter 2.2.8.2 beschrieben weiterbearbeitet.

2.2.8.2 Phosphatase-Behandlung

Zunächst wurden die aus 2.2.8.1 erhaltenen Gewebeextrakte am Rotationsverdampfer erneut auf ca. 20-50 μ l eingeeengt und anschließend in 450 μ l Wasser aufgenommen. Mit 1 M Tris-HCl pH 7,5 wurde der pH auf 7,5-8,0 eingestellt (Überprüfung mit pH-Papier, Macherey-Nagel, Düren, D). Zur Phosphatase-Behandlung wurden 5 U Alkalische Phosphatase (FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Fermentas, St. Leon-Rot, D) mit entsprechendem Puffer eingesetzt und der Ansatz für 3-5 Stunden bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Analyse der Proben *via* HPLC (2.5).

2.3 Molekularbiologie

2.3.1 *E. coli*-Stämme

Die folgenden *E. coli*-Stämme wurden für Klonierungen und Expressionsexperimente genutzt:

BL21(DE3) (Novagen über Merck)

F- ompT gal dcm lon hsdSB(rB⁻ mB⁻) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5])

BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL

F- ompT hsdS(rB⁻ mB⁻) dcm+ Tetr gal λ (DE3) endA Hte [argU proL Camr] [argU ileY leuW Strep/Specr]

BL21(DE3)pLysS (Novagen über Merck)

F⁻ompT gal dcm lon hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻) λ (DE3) pLysS(cm^R)

C41 (DE3) (Lucigen, Middleton, USA)

F- ompT gal dcm hsdS_B(r_B⁻ m_B⁻)(DE3)

DH5 α

F- endA1 glnV44 thi-1 recA1 relA1 gyrA96 deoR nupG Φ 80dlacZ Δ M15 Δ (lacZYA-argF)U169, hsdR17(r_K⁻ m_K⁺), λ -

ER2566 (NEB, Ipswich, USA)

F- λ - fhuA2 [lon] ompT lacZ::T7 gene 1 gal sulA11 Δ (mcrC-mrr)114::IS10 R(mcr-73::miniTn10-TetS)2 R(zgb-210::Tn10)(TetS) endA1 [dcm]

Rosetta(DE3)pLysS

F- ompT hsdSB(RB- mB-) gal dcm λ (DE3 [lacI lacUV5-T7 gene 1 ind1 sam7 nin5]) pLysSRARE (CamR)

TOP10 (Invitrogen, Karlsruhe, D)

F- mcrA Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC) ϕ 80lacZ Δ M15 Δ lacX74 deoR nupG recA1 araD139 Δ (ara-leu)7697 galE15 galK16 rpsL(StrR) endA1 λ -

XL1-Blue (Stratagene, La Jolla, USA)

endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 relA1 lac glnV44 F'[:Tn10 proAB+ lacIq Δ (lacZ)M15] hsdR17(rK- mK+)

2.3.2 DNA-Plasmide

Die folgenden Plasmide wurden für Klonierungen und Expressionsexperimente verwendet:

Tab. 2.2: Verwendete Plasmide.

Plasmid	Resistenz	Verwendung	Bezugsquelle
pCR [®] 4Blunt TOPO [®]	Ampicillin	Klonierung von <i>PpRH1</i> (3.3.1)	Invitrogen
pET28a	Kanamycin	Heterologe Expression rekombinanter PpRHs (3.3.3)	Novagen über Merck
pET-SUMO	Kanamycin	Heterologe Expression rekombinanter PpRH3 (3.3.3)	Invitrogen
pBAS-GFP	Ampicillin	Kontrollplasmid für Transformationen (2.2.7)	Zeidler <i>et al.</i> 1999
pLNU-GFP	Ampicillin	Lokalisierung von PpRHs (3.5)	DNA Cloning Service (Hamburg, D)
pBNR	Ampicillin	<i>Knockout</i> von <i>PpRH1</i> (3.6.1)	Fabien Nougé (INRA, Versailles, F)
pBHR	Ampicillin	<i>Knockout</i> von <i>PpRH2</i> (3.6.1)	Fabien Nougé (INRA)
pBZR	Ampicillin	<i>Knockout</i> von <i>PpRH3</i> (3.6.1)	Fabien Nougé (INRA)

2.3.3 Primer

Oligonukleotide wurden über die Firma Metabion (Martinsried, D) bezogen (Standard-Aufreinigung). Die in der PCR jeweils verwendeten Annealing-Temperaturen (T_a) wurden anhand der vom Hersteller angegebenen Schmelz-Temperaturen der jeweiligen Primer (T_m , Tab. 2.3) zunächst mit Hilfe des Programmes Clone Manager “ (SCI ED Software, Carry NC, USA) sowie des *online*-Programmes OligoAnalyzer (<http://eu.idtdna.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/>) bestimmt und eventuell experimentell noch optimiert.

In Tab. 2.3 sind die in dieser Arbeit verwendeten Primer einschließlich ihrer Schmelz-Temperaturen angeben.

Tab. 2.3: Verwendete Primer.

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	T_m [°C]	Verwendung
235	TATAGCGGCCGCATGGCGGTGCCTGAG	69,6	Klonierung <i>PpRH1</i>
239	CTTCCCAGATCTTCCAAATCCTTCCC	59,0	
238	ATATATGGCGACCCTGAAGC	54,5	
236	ATCCGCCGGCGCGATCAGGTTTACAG	66,5	
312	GTTGAGCTCCTATGGGGCTGTAA	58,6	Klonierung <i>PpRH1</i> in pET28a
314	TCAGTGCTAGCATGGCGGTGCCTG	65,6	
326	ATGGACGTGAAAGCTGCTG	55,7	Klonierung <i>PpRH3</i> in pET-SUMO
423	TCATTTTCAGTCGAGAGCTGC	54,9	
424	TCACTAGTACATGGCGGTGCCTGAG	62,1	<i>PpRH1</i>
425	TCCAAAGCTTCTGGGGCTGTAAGTCGTTCTTG	64,3	Lokalisierungsvektor

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'	T _m [°C]	Verwendung
426	TCATCTAGAACATGGCGGAGTATGTTGAGG	60,9	PpRH2
427	TCCAAAGCTTCAGGGCTGCACAGGAGTTTCTTC	65,8	Lokalisierungsvektor
428	TCATCTAGAACATGGACGTGAAAGCTGCTGGC	64,3	PpRH3
429	TCCAAAGCTTCTTTCAGTCGAGAGCTGCAAAG	63,2	Lokalisierungsvektor
389	CGCAGACCTTCGTCAGACTC	57,6	<i>PpRH1-knockout-Konstrukt</i>
390	GGCTGAGCATGTCACCTTGTGTAAGA	59,0	
391	CCTTACGCGTGACGGGGACGAAT	63,3	
392	CCCTGACTAGTGTAAGAGGAATCTTCCGT	60,5	
393	GCCCTGAGTCCTGTAATCTT	54,0	
394	CATAACTCTGACGCATGGAATGA	55,0	
395	CCTACGTACGAATGCTGTGGCAATTTGA	60,9	
396	CCCTTCTAGAGTGTGAGGCCCTT	60,2	
407	CCTGCACTTAGTCTTCTCAGGAT	56,1	<i>PpRH2-knockout-Konstrukt</i>
408	GAACATGACGGTACTCTGCATCT	56,7	
409	CCCTTCAAAGCTTACCACCTGCTGCTA	62,4	
410	CCCTTGACTCGAGCAATACAGAACGGAA	61,7	
411	CAGAACCGTAGGTTGAATGGTGTTC	57,5	
412	CGAATTGCGCTGGAGGGATAA	57,6	
413	CCCTGGATCCGTAGGTTGAATGGT	60,5	
414	CCTTACGCGTTGGCAGCAAAGA	60,5	
415	GTGGACTCATGGTTGCCTCAAGAT	58,6	<i>PpRH3-knockout-Konstrukt</i>
416	GCACTGGATTAGGCCCTAAGAATAC	57,1	
417	CCCCTGTCATGCTCATCAAGCTAGTTTGT	62,4	
418	CCCTGACTCGAGAAGATTTGCGAGGTA	61,4	
419	GTCAGTGTTCGCCCCAAGA	57,6	
420	CGAGAGCTGCAAAGGAGTTTC	56,2	
421	CCTTCGGCCGCAAGGGCAGTCTT	66,3	
422	CCCTACGCGTTTTCGAACGCCATCAG	63,7	
436	AATCCCAACCACGACGACAA	56,9	Analyse <i>PpRH1-KO</i> genomische Ebene
82	ACTGTCGGCAGAGGCATCTT	58,9	
438	CCTTTGTAGAGGTAAGCTATATGGT	54,5	
80	GCTGCATACGCTTGATCC	54,0	
496	GTATCCTGCACTTAGTCTTCTCA	53,8	Analyse <i>PpRH2-KO</i> genomische Ebene
497	GGTCTTATAGGGTTTCGCTCAT	54,6	
498	GTATGAACTGTTCCGCGATCTT	55,0	
499	GTGAGGTTCCCTCAGATGTTAACT	54,2	
501	GCTGCTTCACTTCATCGAATTCA	55,8	Analyse <i>PpRH3-KO</i> genomische Ebene
502	CCATCTGTGGGTTAGCATTCTTT	55,3	
503	CAGAGCCATGAATAGGTCTATGA	53,7	
504	CATATCCTCTAATGCTGCCATCT	54,3	
214	CGGAGAGGAAGTACAGTGTGTGGA	59,9	<i>PpACT3</i> Expression
215	ACCAGCCGTTAGAATTGAGCCAG	61,2	
536	GAACGGATCGCTGATTTTGT	53,4	Analyse <i>PpRH1-KO</i> Transkript-Ebene
537	TAATCTGGCCACCTTCTTG	54,6	
488	TGCGTATTTTGTGCATGGTT	53,5	Analyse <i>PpRH2-KO</i> Transkript-Ebene
489	TGCCAATGTTCTTGACAAA	52,9	
404	GCCGAGAAGCTAATGTAAG	53,8	Analyse <i>PpRH3-KO</i> Transkript-Ebene
405	GGTCAAGTCTATGCCTATTGC	53,5	

2.3.4 PCR

2.3.4.1 Standard-PCR

PCR-Ansätze wurden in 0,2 oder 0,5 ml Reaktionsgefäßen in den PCR-Cyclern TRIO Thermoblock (Biometra, Göttingen, D) und Primus 96advanced PCR Cycler (Peqlab, Erlangen, D) durchgeführt. Standard-PCR-Ansätze wurden in einem Volumen von 25 µl mit dem nachfolgend stehenden Reaktionsansatz unter Anwendung des Standard-PCR-Protokolls durchgeführt. Zur Amplifikation wurde zumeist die Taq DNA-Polymerase DSC DNA Polymerase (DNA Cloning Service) verwendet. Zur fehlerfreien Vermehrung von Nukleotid-Sequenzen oder zur Amplifikation von Fragmenten > 2000 bp wurde entweder eine Mischung (10:1) aus Taq DNA-Polymerase und proof reading Polymerase (*Pfu* DNA Polymerase, Fermentas) verwendet oder eine spezielle *Pfu*-Polymerase (Phusion High Fidelity DNA Polymerase, Finnzymes) nach Angaben des Herstellers eingesetzt. dNTPs wurden von der Firma Fermentas bezogen. Die Menge an eingesetztem Template variierte je nach Anwendung (10 pg bis 100 ng). Für jedes eingesetzte Primerpaar wurden Kontrollreaktionen mit MilliQ Wasser anstelle von Template durchgeführt.

Standard-Reaktionsansatz für PCR (25 µl):

2,5 µl 10x Reaktionspuffer
 2 µl MgCl₂ (25 mM)
 0,25 µl 5'-3' Primer (50 µM)
 0,25 µl 3'-5' Primer (50 µM)
 0,25 µl dNTPs (je 25 mM)
 1 U DNA-Polymerase oder Polymerasen-Mischung
 x µl Template
 x µl MilliQ Wasser

Standard-PCR-Protokoll

94 °C	3 min	initiale Denaturierung	
94 °C	30 s	Denaturierung	
T _a °C	30 s	Annealing	25-30 Zyklen
72 °C	1 min/kb	Elongation	
72 °C	10 min	finale Elongation	

2.3.4.2 Kolonie-Screening *via* PCR

Zur Identifikation positiver *E. coli*-Klone nach Transformation von Ligationsansätzen (2.3.10) wurde ein Kolonie-PCR-Verfahren durchgeführt. Hierfür wurde die zu untersuchende *E. coli*-Kolonie mit einem Zahnstocher zunächst gepickt, in 5 µl MilliQ Wasser suspendiert und 3-5 µl der Bakteriensuspension direkt als Template in die PCR eingesetzt. Die PCR wurde nach dem Standard-Protokoll durchgeführt (2.3.4.1), mit der Ausnahme einer verlängerten, initialen Denaturierung von 5 min.

2.3.5 Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA- und RNA-Fragmenten

Die Auftrennung von DNA- oder RNA-Fragmenten in Abhängigkeit von ihrer Größe erfolgte über horizontale Gelelektrophorese (Gelkammer: Wide Mini-Sub Cell GT, Bio-Rad, München, D).

1x TAE-Gele mit einer Agarose-Konzentration von 0,8-2,0 % Agarose und 0,5 µg/ml Endkonzentration an Ethidiumbromid wurden hierfür verwendet. Die aufzutrennenden DNA- oder RNA-Proben wurden mit Ladepuffer versetzt und bei 70-80 V in 1x TAE als Laufpuffer aufgetrennt. Als Marker diente mit *Pst*I verdaute Lambda DNA. Zur Visualisierung und Dokumentation der DNA- oder RNA-Fragmente wurde ein UV-Transilluminator zusammen mit der Dokumentationssoftware BioPrint 96.07 (Vilbert Lourmat, Eberhartzell, D) verwendet.

5x Ladepuffer	10x TAE Puffer
50 % (v/v) Glycerol	400 mM Tris
60 mM EDTA pH 8,0	10 mM EDTA pH 8,0
0,25 % (w/v) Bromphenolblau	200 mM Eisessig

2.3.6 Aufreinigung und Isolierung von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen

Die Aufreinigung von PCR-Produkten aus Agarose-Gelen erfolgte mit dem Gel/PCR DNA Fragments Extraction Kit (Avegene über DNA Cloning Service). Alle Schritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.7 Isolierung von Plasmid-DNA

Zur Isolierung geringer Mengen an Plasmid-DNA (bis zu 30 µg) aus *E. coli*, wurde das High-Speed Plasmid Mini Kit (Avegene über DNA Cloning Service) verwendet. Die Elution der DNA erfolgte mit 50 µl TE Puffer oder MilliQ Wasser. Für die Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA (bis zu 500 µg) wurde das Plasmid Maxi Kit von Qiagen (Hilden, D) benutzt. Alle Schritte wurden nach Angaben des Herstellers durchgeführt und die DNA in 300-400 µl sterilem MilliQ Wasser aufgenommen. Die isolierte DNA wurde bei -20 °C aufbewahrt.

DNA-Konzentrationen wurden am Photometer (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech, München, D) mittels der Extinktion der verdünnten DNA bei 260 nm bestimmt, wobei 1 OD₂₆₀ ca. 50 µg doppelsträngiger DNA/ml entspricht. Anhand der Ratio von E₂₆₀/E₂₈₀ konnte die Reinheit der isolierten DNA abgeschätzt werden.

2.3.8 Restriktionsverdau von DNA

Zur qualitativen Überprüfung von Plasmid-DNA oder PCR-Fragmenten sowie zum quantitativen Verdau größerer Mengen DNA, wurde die DNA enzymatisch bei 37 °C unter Verwendung von Restriktionsenzymen von Fermentas verdaut. Zum analytischen Verdau wurde bis zu 1 µg DNA in 20 µl Reaktionsvolumen mit 1 U Enzym für 1 Stunde inkubiert. Bei Verwendung von Fast digest Enzymen (Fermentas) wurden entsprechend kürzere Inkubationszeiten und Enzymmengen nach Angabe des Herstellers angewendet. Größere Mengen an DNA wurden in einem entsprechend größeren Volumen mit größeren Enzymmengen und längeren Reaktionszeiten verdaut. Die Effizienz der Reaktion wurde anhand von Gelelektrophorese überprüft (2.3.5). Die Inaktivierung des Enzymes, zumeist durch Erhitzen, erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zur Präzipitierung der DNA wurde das Reagenz SureClean (Bioline, Luckenwalde, D) verwendet.

2.3.9 Herstellung und Transformation von chemisch-kompetenten *E. coli*-Zellen

Chemisch-kompetente *E. coli*-Zellen wurden nach einem leicht modifizierten Protokoll nach Hanahan (1985) hergestellt. Hierfür wurde zunächst eine 3 ml-Vorkultur des entsprechenden *E. coli*-Stammes

in LB Medium angesetzt und über Nacht bei 37 °C im Wasserbad bei 220 rpm geschüttelt. Im Anschluss wurden 2 ml dieser Vorkultur zu 100 ml LB Medium zugegeben und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4-0,6 bei 37 °C unter Schütteln inkubiert. Danach wurden die Zellen in vorgekühlten Zentrifugengefäßen durch eine Zentrifugation (3000 x g, 5 min, 4 °C, Beckmann Coulter Avanti J-E, Krefeld, D) sedimentiert und das Pellet vorsichtig in 0,4 Volumen kaltem Tfb I Puffer resuspendiert. Nach einer 5 minütigen Inkubation auf Eis, folgte erneut eine Zentrifugation bei 3000 x g für 5 min bei 4 °C. Die Zellen wurden vorsichtig in 0,04 Volumen Tfb II Puffer aufgenommen und für 15 min auf Eis inkubiert. Nach Aliquotierung (50-100 µl) in vorgekühlte Reaktionsgefäße wurden die Zellen zunächst in flüssigem Stickstoff und dann bei -80 °C eingefroren und bis zur Transformation gelagert. Zur Transformation von *E. coli* mit isolierter Plasmid-DNA oder Ligationsansätzen (entsalzt) wurden Aliquots der chemisch-kompetenten Zellen langsam auf Eis aufgetaut. Nach Zugabe der DNA (1-80 ng) und vorsichtigem Mixen, wurde der Transformationsansatz für 20 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss folgte ein Hitzeschock für 45 s bei 42 °C und dann eine Inkubation auf Eis für 2 min. Zur Regeneration wurden 500 µl LB Medium zugegeben und der Ansatz für 1 Stunde bei 37 °C, 220 rpm geschüttelt. Danach wurde ein Teil des Transformationsansatzes (30-500 µl) auf LB-Platten mit dem entsprechenden Antibiotikum ausplattiert und bei 37 °C über Nacht inkubiert.

LB Medium	Tfb I Puffer	Tfb II Puffer
5 g/l Hefeextrakt	30 mM K-Acetat	10 mM MOPS
10 g/l Pepton	100 mM RbCl	75 mM CaCl ₂
10 g/l NaCl	10 mM CaCl ₂	10 mM RbCl
(7,5 g/l Agar)	50 mM MnCl ₂	15 % Glycerol
pH 7,0	15 % Glycerol	pH 6,5
	pH 5,8	
Alle Lösungen wurden nach der pH-Einstellung autoklaviert.		
Konzentrationen der Antibiotika	Ampicillin 100 µg/ml	
	Kanamycin 50 µg/ml	

2.3.10 Ligation von DNA-Fragmenten

Die Ligation von DNA-Fragmenten in einen Vektor erfolgte über sticky end Ligation mit Hilfe der T4 DNA Ligase (Fermentas). Die Reaktion wurde nach Anleitung des Herstellers durchgeführt und durch eine Hitzeinaktivierung gestoppt. Vor der Transformation in *E. coli* wurden die Ligationsansätze mit dem Reagenz SureClean (Bioline) gefällt.

2.3.11 TOPO[®]cloning

Das Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR Cloning Kit (Invitrogen) wurde verwendet, um PCR-Produkte in den Vektor pCR[®]4Blunt-TOPO[®] zu klonieren. Alle Reaktionen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3.12 Kryokonservierung von Bakterienstämmen

Zur längerfristigen Aufbewahrung von Bakterienstämmen mit/ohne Plasmid, wurden Kryostocks angelegt. Hierfür wurde die Bakterienkultur 1:1 mit der Glycerolstock Lösung gemischt, sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und dann bei -80 °C aufbewahrt.

Glycerolstock Lösung

nach Mülhardt (2009)

65 % Glycerol
 0,1 M MgSO₄
 0,025 M Tris
 pH 8,0

2.3.13 Isolierung genomischer DNA aus *Physcomitrella*

Zur Isolierung genomischer DNA aus *Physcomitrella* wurde eine vereinfachte CTAB-Methode angewendet (<http://moss.nibb.ac.jp/>). Das Moosgewebe (aus Flüssigkultur oder von Festmedium) wurde in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit 400 µl 2x CTAB Puffer überführt und mechanisch mit einem kleinen Plastikpistill (schuett-biotec) zerkleinert. Das Homogenat wurde anschließend für 1 Stunde bei 60 °C inkubiert, dann mit 400 µl Chloroform:Isoamylalkohol (25:1) extrahiert und bei 16.000 x g für 10 min bei 4 °C zentrifugiert (Universal 320R, Hettich). Die DNA, enthalten in der oberen wässrigen Phase, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit einem gleichen Volumen Isopropanol präzipitiert und erneut zentrifugiert (16.000 x g, 10 min, 4 °C). Das DNA-Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in 50 µl TE Puffer mit 1 µl RNaseA (1 mg/ml) gelöst. Für anschließende PCR-Ansätze wurden 2-5 µl DNA je Reaktionsansatz als Template eingesetzt (2.3.4.1).

2x CTAB

2 % (w/v) CTAB
 100 mM Tris-HCl pH 8,0
 1,4 M NaCl
 20 mM EDTA pH 8,0

TE Puffer

10 mM Tris-HCl pH 8,0
 1 mM EDTA pH 8,0

2.3.14 Isolierung von RNA aus *Physcomitrella*

Zur RNA-Isolierung aus *Physcomitrella* nach einer leicht modifizierten Methode von Danyluk und Sarhan (1990) wurde 10-100 mg Pflanzenmaterial aus Flüssig- oder Festkulturen verwendet. Nach der Ernte des Gewebes und anschließender Entfernung des Mediums über eine Wasserstrahlpumpe (2.2.3, nur bei Verwendung von Flüssigkulturen) wurde das Material in ein 2 ml Reaktionsgefäß, zu ¼ gefüllt mit Glasperlen (Ø 1,7-2 mm), überführt und direkt in flüssigem Stickstoff gefroren. Nach Zugabe von 1 ml kaltem TLES Puffer wurden die Proben im FastPrep FP120 Homogenizer (Savant Instruments) für 2 x 20 s bei einer Intensität von 5 homogenisiert. Das Homogenat wurde dann zur Entfernung der Zellrückstände bei 13.000 x g, 5 min, 4 °C (Universal 320R, Hettich) zentrifugiert und der Überstand (max. 1 ml) in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Nach Versetzung des Überstandes mit einem gleichen Volumen an Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol (25:24:1) folgte eine erneute Zentrifugation bei 13.000 x g, 10 min, 4 °C. Der Überstand wurde abgenommen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß transferiert und ein gleiches Volumen an Chloroform:Isoamylalkohol (24:1) zugegeben. Die nach der Zentrifugation, 13.000 x g, 10 min, 4 °C, abgetrennte obere Phase, die die RNA enthält, wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der RNA mit LiCl, Endkonzentration 2 M, versetzt. Für eine optimale Ausbeute erfolgte die Fällung bei 4 °C über Nacht, mindestens aber für 1 Stunde bei 4 °C. Zur Präzipitation wurde die RNA im Anschluss bei 13.000 x g, 1 Stunde, 4 °C zentrifugiert. Das erhaltene Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen und in 50-100 µl DEPC Wasser resuspendiert. Die Qualität der RNA wurde mittels Gelelektrophorese (2.3.5) überprüft

und zur Messung der Quantität wurde die RNA im Photometer (Ultrospec 3000, Pharmacia Biotech) bei 260 nm vermessen, wobei 1 OD₂₆₀ ca. 40 µg RNA/ml entspricht.

TLES Puffer

100 mM Tris-HCl pH 8,0
100 mM LiCl
10 mM EDTA pH 8,0
1 % SDS

2.3.15 DNase-Behandlung und reverse Transkription (RT) von RNA

Vor dem Umschreiben der RNA in cDNA wurde die RNA zunächst mit DNase I (Fermentas) nach Angaben des Herstellers behandelt. Nach Zugabe von EDTA und Hitzeinaktivierung der DNase I wurde die RNA mit Ethanol (2,5 Volumen) und Ammoniumacetat ($\frac{1}{10}$ Volumen) präzipitiert, gewaschen und anschließend in DEPC-behandeltem MilliQ Wasser aufgenommen. Qualität und Konzentration wurden wie unter 2.3.14 beschrieben, bestimmt.

Der Reaktionsansatz zur reversen Transkription setzte sich folgendermaßen zusammen (Gesamtvolumen 20 µl):

3-5 µg RNA
1 µl Oligo(dT) Primer anchored, 0,5 µg/µl (Sigma-Aldrich)
bis 12,5 µl DEPC Wasser
4 µl 5x Puffer
0,5 µl RiboLock RNase Inhibitor, 40 U/µl (Fermentas)
2 µl dNTPs, je 10 mM (Fermentas)
1 µl RevertAid M-MuLV, 200 U/µl (Fermentas)

Der Ansatz wurde zunächst bei 42 °C für 60 min inkubiert. Durch eine 10 minütige Inkubation im Anschluss bei 70 °C erfolgte die Inaktivierung der reversen Transkriptase. Die hergestellte cDNA konnte danach direkt in die PCR (0.1) eingesetzt werden (1-5 µl). Neben einer Effizienz-Kontrolle der RT unter Verwendung von TMV-RNA in Kombination mit random nonamer Primern (50 µM, Sigma-Aldrich) anstelle von Oligo(dT) Primern, wurde auch die Kontamination der RNA mit Resten von genomischer DNA überprüft. Hierfür wurden sogenannte „RT minus“-Reaktionen von jeder RNA angesetzt, die einer reversen Transkription allerdings ohne Zugabe der reversen Transkriptase entsprechen. Per PCR konnten eventuelle Reste von genomischer DNA nachgewiesen werden.

2.3.16 Sequenzierung

Sequenzierungen von PCR-Produkten oder Plasmiden erfolgten durch den DNA Cloning Service.

2.3.17 Gensynthese

Gensynthesen wurden bei der Firma DNA Cloning Service in Auftrag gegeben.

2.4 Proteinbiochemie**2.4.1 Herstellung von Proteinextrakten aus *Physcomitrella***

Moosgewebe (0,5-1 g) aus Flüssigkulturen wurde wie zuvor beschrieben (2.2.3) geerntet und in einem Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff zerkleinert. Nach Überführung des

entstandenen Gewebepulvers in 10-20 ml kalten 4x TMD Puffer und einer 25 minütigen Inkubation auf Eis, wurden die Ansätze für 20 min bei 13.000 x g, 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde zum Abfangen kleiner Partikel über einen Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,45 µm, Roth) gegeben und anschließend bis zur 100 %igen Sättigung mit Ammoniumsulfat versetzt. Zur Fällung aller löslichen Proteine folgte im Anschluss eine Inkubation bei 4 °C für mindestens 1 Stunde, idealerweise über Nacht. Nach einer Zentrifugation bei 13.000 x g, 30 min, 4 °C (Beckmann Coulter Avanti J-E) wurde das Pellet in 750 µl 1x TMD Puffer gelöst. Zur Entfernung von Salzen und niedermolekularen Substanzen erfolgte die Entsalzung über illustra™ NAP™ 10 Säulen (GE Healthcare, München, D). Zur Elution der Proteine wurden 1,2 ml 1x TKD Puffer auf die Säule geben. Die Proteinkonzentration der Gewebeextrakte wurde entweder über Bradford (2.4.5) bestimmt oder es erfolgte eine UV-basierte Vermessung im Photometer und eine Berechnung der Konzentration nach folgenden Gleichungen (Ergebnisse der drei Gleichungen wurden gemittelt):

$$\begin{aligned} \text{Protein Konzentration (mg/ml)} &= (1,55 \times A_{280}) - (0,76 \times A_{260}) \\ &= A_{205} / [27 + 120 (A_{280} / A_{205})] \\ &= (A_{235} - A_{280}) / 2,51 \end{aligned}$$

4x TMD Puffer

200 mM Tris-HCl pH 7,5
20 mM MgCl₂
2 mM DTT

4x TKD Puffer

200 mM Tris-HCl pH 7,5
400 mM KCl
2 mM DTT

2.4.2 Überexpression rekombinanter RH in *E. coli*

Zur Herstellung rekombinanter RH wurden *E. coli*-Zellen verwendet (2.3.1), die ein entsprechendes Plasmid (Tab. 2.2) zur Expression rekombinanter RH tragen. Hierfür wurde zunächst mit einer Einzelkolonie eine 3 ml-Vorkultur (LB Medium mit entsprechendem Antibiotikum, 2.3.9) inokuliert und über Nacht bei 37 °C, 220 rpm im Schüttelwasserbad herangezogen. Zur Inokulation der Hauptkultur (2YT Medium mit entsprechendem Antibiotikum) wurde 1/100 der Vorkultur verwendet. Außerdem wurde 0,6 % Glycerol als zusätzliche Kohlenstoffquelle zugegeben. Die Hauptkultur wurde in 1 l-Erlenmeyerkolben bei 37 °C im Wasserbad bei 175 rpm bis zu einer OD₆₀₀ von 1 herangezogen und dann bei Raumtemperatur unter Schütteln weiter inkubiert. Nach ca. 1 Stunde bzw. einer OD₆₀₀ von 1,5-2,0 erfolgte die Induktion der Genexpression mit 1 mM IPTG. Die Kultur wurde für weitere 15-20 Stunden bei 175 rpm herangezogen und dann die Zellen durch eine Zentrifugation bei 5000 x g, 20 min, 4 °C (Beckmann Coulter Avanti J-E) geerntet. Die Zellpellets wurden entweder direkt weiter verarbeitet oder bis zur Aufreinigung bei -20 °C gelagert.

2YT Medium

10 g/l Hefeextrakt
16 g/l Pepton
5 g/l NaCl

Nach Einstellung des pH mit NaOH auf 7,0 wurde das Medium autoklaviert.

2.4.3 Aufreinigung rekombinanter RH aus *E. coli* über Affinitätschromatografie

Alle Aufreinigungsschritte wurden bei 4 °C durchgeführt. Zunächst wurden die Zellpellets (2.4.2) in 1 Volumen 2x Lysis Puffer je Gramm Pellet resuspendiert, optional mit EDTA-freiem Protease-Inhibitor Cocktail (complete Mini EDTA-free, Roche, Mannheim, D). Nach Zugabe von Lysozym mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml, folgte eine 15 minütige Inkubation der Zellsuspension bei Raumtemperatur unter vorsichtigem Schütteln. Zur vollständigen Zelllyse wurde die Zellsuspension einer Ultraschall-Behandlung unterzogen (Ultraschallstab Labsonic 2000, B. Braun Biotech International über Satorius), wobei das Zelllysate in 10 Zyklen à 20 s den Ultraschallwellen ausgesetzt wurde. Zwischen den einzelnen Zyklen wurde die Suspension kurz auf Eis gehalten. Zur Abtrennung von Zelltrümmern und unlöslichem Material folgte eine Zentrifugation bei 13.000 x g, 4 °C für 30 min (Beckmann Coulter Avanti J-E). Im Anschluss wurde der Überstand über einen Filter mit 0,45 µm Porengröße (Roth) filtriert und dann auf eine vorgepackte His•bind® Column (Novagen über Merck) geladen. Die Aufreinigung des rekombinanten Proteins mit His-Tag über Säulenchromatografie erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Elution des Proteins wurde mit 5 ml Elutionspuffer erreicht. Von jedem Aufreinigungsschritt wurden Proben genommen und später per SDS-PAGE analysiert (2.4.6), um einerseits den Aufreinigungsprozess zu kontrollieren und um andererseits die Elutionsfraktionen zu identifizieren, die ausreichend rekombinantes Protein enthielten. Elutionsfraktionen mit rekombinanter RH wurden vereinigt und in 20 mM Tris-HCl Puffer pH 7,5 dialysiert. Hierfür wurden die entsprechenden Fraktionen in einen Dialyseschlauch (Visking, Zellulose Typ 27/32, Roth) überführt und in 1 l 20 mM Tris-HCl Puffer pH 7,5 zunächst für 2 Stunden bei 4 °C dialysiert. Nach Austausch des Puffers wurde die Dialyse über Nacht fortgesetzt. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde der Bradford Assay (2.4.5) sowie die unter 2.4.1 beschriebene photometrische Methode angewendet. Falls eine Aufkonzentrierung des Proteins gewünscht war, wurde diese nach Herstellerangaben über eine Ultrafiltrationseinheit (Amicon® Ultra, MWCO 10 kDa, Millipore) durchgeführt. Das Protein wurde bei 4 °C aufbewahrt und war dort für ca. 2 bis 3 Wochen stabil (Daten nicht gezeigt).

2x Lysis Puffer	Elutionspuffer
0,04 mM Tris-HCl pH 7,9	20 mM Tris-HCl pH 7,9
1 M NaCl	500 mM NaCl
10 mM Imidazol	150 mM Imidazol

2.4.4 Expression von PpRH3 im Champion™ pET SUMO Protein Expression System

Das Champion™ pET SUMO Protein Expression System (Invitrogen) wurde verwendet, um eine Verbesserung der Löslichkeit von PpRH3 zu erzielen. Alle Reaktionen wurden laut Herstellerangaben durchgeführt.

2.4.5 Bestimmung der Proteinkonzentration

Proteinkonzentrationen wurden nach Bradford (1976) im Mikroplattenansatz mit BSA als Standard bestimmt. Hierfür wurde das Bio-Rad Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad) nach Hersteller-Angaben verwendet. Zu vermessende Proteinproben wurden typischerweise in einer 1:10 Verdünnung eingesetzt. Alle Proben wurden bei 595 nm im Mikrotiterplatten-Reader (Dynatech MR 5000 von Dynex Technologies, Chantilly, USA) vermessen.

2.4.6 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine wurden über SDS-PAGE (Laemmli 1970) nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. Die Separierung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen in einem vertikalen Elektrophorese-System (Mini Protean II, Bio-Rad). Standardmäßig wurde ein 5 %iges Sammelgel mit einem 12,5 %igen Trenngel eingesetzt. Alle aufzutrennenden Proben wurden zur Denaturierung zunächst mit 5x SDS Ladepuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C inkubiert. Zur Analyse von Zellpellets bzw. von unaufgereinigten Zellextrakten wurden abweichend davon ca. 50 µl des Zellpellets bzw. des Zellextraktes 1:1 mit 5x SDS Ladepuffer und 25 µl 1x SDS Laufpuffer versetzt und für 30 min bei 95 °C inkubiert. Als Marker wurde der Unstained Protein Molecular Weight Marker von Fermentas verwendet. Die Auftrennung erfolgte bei konstanten 120 V für ca. 1 Stunde unter Verwendung von 1x SDS Laufpuffer.

5x SDS Ladepuffer

375 mM Tris-HCl pH 6,8
10 % (w/v) SDS
50 % (v/v) Glycerol
0,5 M DTT
0,01 % (w/v) Bromphenolblau

10x SDS Laufpuffer

250 mM Tris
1 % (w/v) SDS
1,92 M Glycin

SDS Sammelgel (5 %)

2,88 ml MilliQ Wasser
1,25 ml Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl pH 6,8)
0,624 ml Acrylamid/Bisacrylamid 37:5:1 (Rotiphorese® Gel 40, Roth)
50 µl SDS Lösung (10 %)
25 µl Ammoniumpersulfat Lösung (10 %)
5 µl TEMED (AppliChem, Darmstadt, D)

SDS Trenngel (12.5 %)

4,22 ml MilliQ Wasser
2,5 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl pH 8,8)
3,13 ml Acrylamid/Bisacrylamid 37:5:1 (Rotiphorese® Gel 40, Roth)
100 µl SDS Lösung (10 %)
50 µl Ammoniumpersulfat Lösung (10 %)
5 µl TEMED (AppliChem)

2.4.7 Native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Native PAGE)

Zur Identifizierung der Quartärstrukturen von Proteinen, wurden Proben unter nicht-denaturierenden Bedingungen im Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Separierung erfolgte unter nativen Bedingungen in einem vertikalen Elektrophorese-System (Mini Protean II, Bio-Rad). Es wurde ein 4 %iges Sammelgel mit einem 8 %igen Trenngel verwendet. Alle aufzutrennenden Proben wurden mit 2x Nativem Ladepuffer versetzt. Bis zu 200 µg Protein wurden auf das Gel aufgetragen. Als Marker wurde der HMW-Native Marker (GE Healthcare) verwendet. Die Trennung erfolgte bei 4 °C bei konstanten 15 mA für 1,5 Stunden in 1 x Laufpuffer.

2x Nativer Ladepuffer

125 mM Tris-HCl pH 6,8
20 % (v/v) Glycerol
0,01 % (w/v) Bromphenolblau

10x Nativer Laufpuffer

25 mM Tris
1,92 M Glycin

SDS Sammelgel (4 %)

3,08 ml MilliQ Wasser
 1,25 ml Sammelgelpuffer (0,5 M Tris-HCl pH 6,8)
 0,65 ml Acrylamid/Bisacrylamid 37:5:1 (Rotiphorese® Gel 40, Roth)
 20 µl Ammoniumpersulfat Lösung (10 %)
 5 µl TEMED (AppliChem)

SDS Trenngel (8 %)

4,77 ml MilliQ Wasser
 2,5 ml Trenngelpuffer (1,5 M Tris-HCl pH 8,8)
 2,67 ml Acrylamid/Bisacrylamid 37:5:1 (Rotiphorese® Gel 40, Roth)
 50 µl Ammoniumpersulfat Lösung (10 %)
 5 µl TEMED (AppliChem)

2.4.8 Colloidal-Coomassie-Färbung

Zur Visualisierung der Proteinbanden im Polyacrylamid-Gel wurde eine Colloidal-Coomassie-Färbung vorgenommen, die deutlich sensitiver als die herkömmliche Coomassie Färbung ist (Detektion von 50-500 ng statt 100-1000 ng Protein). Hierzu wurden die Gele unter Schwenken in Colloidal-Coomassie Färbelösung für 6 Stunden inkubiert und anschließend für 1 Stunde entfärbt.

Colloidal-Coomassie Färbelösung

5 % Aluminiumsulfat-(14-18)-Hydrat
 10 % Ethanol (96 %)
 0,02 % Coomassie Brilliant BlueG-250
 2 % *ortho*-Phosphorsäure (100 %)

Entfärberlösung

10 % Ethanol (96 %)
 2 % *ortho*-Phosphorsäure (100 %)

vor Verwendung für mind. 6-8 h rühren

2.4.9 Western Blot

Western Blots wurden nach Towbin *et al.* (1979), modifiziert nach Richter (2008), durchgeführt.

10x PBS

80 g/l NaCl
 2 g/l KCl
 26,8 g/l Na₂HPO₄*7H₂O
 2,4 g/l KH₂PO₄
 pH 7,4

Transfer Puffer

48 mM Tris
 39 mM Glycin
 0,0375 % (w/v) SDS
 20 % (v/v) Methanol
 pH 8,3

NBT/BCIP Puffer

0,1 M NaHCO₃
 1 mM MgCl₂
 pH 9,8

NBT (Nitroblau-Tetrazolium) Lösung

75 mg/ml in 70 % N,N-Dimethylformamid (DMF)

BCIP (5-Brom-4-chlor-3-indoxylphosphat) Lösung

50 mg/ml in 100 % DMF

Primärer Antikörper

Anti His-tag® monoklonaler Antikörper
 (Novagen)
 Verdünnung 1: 1000

Sekundärer Antikörper

Anti mouse IgG-alkaline phosphatase
 (Sigma-Aldrich)
 Verdünnung 1: 5000

2.4.10 Gelfiltration über FPLC

Gelfiltrationen wurden mit einer Bio-Prep SE-100/17-Säule (Bio-Rad), angeschlossen an eine FPLC-Anlage (AKTA mit 200 µl Superloop, GE Healthcare) durchgeführt. Als Puffersystem wurde ein Phosphatpuffer verwendet. Die Flussrate betrug konstant 0,5 ml/min. Die Equilibrierung erfolgte mit 5 Säulenvolumina des Phosphatpuffers. Zur Kalibrierung wurde der Gel Filtration Standard von Bio-Rad (1,3-670 kDa) benutzt. Die Proben (maximal 200 µl, mit unterschiedlichen Proteinmengen) wurden über eine Mikroliterspritze (Hamilton, Bonaduz, CH) aufgetragen.

Phosphatpuffer

0,05 M NaH₂PO₄

0,15 M NaCl

pH 8,0

2.4.11 Enzym-Assays

Zur Messung von RH-Aktivität wurden zwei verschiedene Enzym-Assays angewendet: Der spektrophotometrischer Ansatz nach der Methode von Parkin (1996), der zur Bestimmung von kinetischen Parametern der rekombinanten Proteine angewendet wurde, basiert auf einer Änderung der Absorption durch den Verbrauch von Substrat. Bei der alternativen Messung der Enzym-Aktivität mittels eines HPLC-basierten Assays können hingegen Substrat und Produkt eindeutig anhand von Chromatogrammen identifiziert und quantifiziert werden. Das eventuelle Auftreten von Nebenreaktionen könnte gegebenenfalls auch erfasst werden. Dieser Assay wurde verwendet, (1) um die Korrektheit der im Photometer gemessenen Reaktion zu überprüfen, (2) um einige kinetische Parameter der rekombinanten Proteine zu bestimmen, (3) um RH-Aktivität in inhomogenen Lösungen wie Zellextrakten und intaktem Moosgewebe zu messen und (4) um Enzym-Assays unter Verwendung radioaktiv-markierter Substrate auszuwerten.

2.4.11.1 Spektrophotometrischer Assay nach Parkin (1996)

Zur photometrischen Bestimmung der RH-Aktivität wurden UV-Küvetten (Quarzküvetten, Hellma Analytics, Müllheim, D) zusammen mit dem Cary 50 Scan UV-Vis Spectrometer von Varian (Darmstadt, D, optional mit einem PCB 150 Peltier Water System) verwendet, wobei je nach Substrat die entsprechende Wellenlänge für die Messung gewählt wurde (Tab. 2.4). Die Assays wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Der 1 ml Reaktionsansatz enthielt das Substrat in gewünschter Konzentration sowie 1 x TKD Puffer (2.4.1) als Reaktionspuffer. Die Reaktion wurde durch Zugabe des rekombinanten Proteins gestartet (5-20 µg) und die Änderung der Absorption bei der entsprechenden Wellenlänge über einen Zeitraum von 5 bis 10 Minuten aufgezeichnet. Die Umsetzung einer 1 mM Lösung des entsprechenden Ribosids führte zu der in Tab. 2.4 angegebenen Änderung der Absorption ($\Delta\epsilon_x$). Die Berechnung der Enzym-Aktivität erfolgte anhand folgender Gleichung:

$$\text{Spezifische Aktivität} = \frac{\Delta A_x / s \cdot V}{\Delta \epsilon_x \cdot v \cdot [E]} = \text{nmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$$

wobei ΔA_x die Änderung der Absorption bei der Substrat-spezifischen Wellenlänge, s die Zeit in Sekunden, V das Reaktionsvolumen in ml, $\Delta \epsilon_x$ die Änderung des molaren Extinktionskoeffizienten in

$\mu\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ für das jeweilige Substrat, v das zugegebene Volumen an Enzym-Lösung in μl und $[E]$ die Enzym-Konzentration in mg/ml darstellt.

Tab. 2.4: Messwellenlänge und Änderung des molaren Extinktionskoeffizienten von ausgewählten Purinen und Pyrimidinen, die im spektrophotometrischen Assay eingesetzt wurden.

Substrat	λ [nm]	$\Delta\epsilon_x$ [$\text{mM}^{-1} \text{cm}^{-1}$]*	Quelle für $\Delta\epsilon_x$
Adenosin	276	-1,40	Parkin (1996)
Cytidin	280	3,42	Liang <i>et al.</i> (2008) Hansen und Dandanell (2005)
Guanosin	308	0,16	Parkin (1996)
Inosin	280	-0,92	Parkin <i>et al.</i> (1991)
Thymidin	265	-1,70	Hansen und Dandanell (2005)
Uridin	280	-1,80	Hansen und Dandanell (2005)

2.4.11.2 HPLC-basierter Enzym-Assay

Zusätzlich zu dem zuvor beschriebenen, spektrophotometrischen Assay, wurde RH-Aktivität auch mittels HPLC gemessen. Der Standardansatz (1 ml) enthielt ähnlich wie der spektrophotometrische Ansatz 1 x TKD Puffer (2.4.1) als Reaktionspuffer, das Substrat (radioaktiv-markiert oder unmarkiert) in gewünschter Konzentration sowie 5-20 μg rekombinantes Protein bzw. 100-150 μg Proteinextrakt aus *Physcomitrella*. Die Inkubation der Assays erfolgte bei 35 °C für mehrere Stunden. Anschließend wurde die Reaktion durch Hitze einwirkung gestoppt (70 °C für 10 min), mit Laufmittel A versetzt (Tab. 2.5, in der Regel 1:3 bis 1:5, je nach Konzentration) und über einen Spritzenvorsatzfilter (Porengröße 0,45 μm , Macherey-Nagel) filtriert, um präzipitiertes Protein und andere Partikel zu entfernen. Die Analyse der Proben per HPLC erfolgte nach der unter 2.5 beschriebenen Methode.

2.5 RP-HPLC zur Trennung von Purin-Ribosiden und -Basen sowie Cytokinin-Ribosiden und -Basen

HPLC-Messungen wurden nach dem reverse Phase-Prinzip auf einer Bio-TEK Anlage mit Diodenarray-Detektor DAD 540+ (beides Kontron, Neufahrn, D) durchgeführt. Bei Vermessung von radioaktiv-markierten Proben wurde zusätzlich ein *online*-Flüssigkeitsszintillationszähler angeschlossen (LSC, Radiomatic 500 TR Series, Canberra-Packard, Dreieich, D; Verwendeter Szintillationscocktail: Ultima-Flow M, PerkinElmer, Rodgau, D). Die Flussrate betrug konstant 0,8 ml/min bei einem durchschnittlichen Druck von 70 bar. Je nach aufzutrennenden Substanzen wurden stationäre Phase und Laufmittelgradient sowie Wellenlänge zur Vermessung des HPLC-Effluenten nach Tab. 2.5 ausgewählt. Alle Proben wurden vor ihrer Injektion zunächst in Laufmittel A aufgenommen und anschließend filtriert (0,45 μm Porengröße, Filtergröße je nach Probenvolumen, Macherey-Nagel). Für die Vermessung radioaktiv-markierter Proben, wurden den Proben unmarkierte Standardsubstanzen zwecks Erfassung der Retentionszeiten (UV) zugefügt. Die Datenaufnahme und -auswertung erfolgte mit der Software Geminix (Goebel Instrumentelle Analytik, Ludwigshafen, D).

Tab. 2.5: Übersicht über die verwendeten HPLC-Analyseverfahren.

	Trennung von Inosin/Hypoxanthin*	Trennung von Adenosin/Adenin	Trennung von Cytokin-Ribosiden (iPR) und -basen (iP)
Stationäre Phase	Säule: LiChroCART 250-4 mit LiChrospher 60, RP-Select B (5 µm); Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18 (5 µm) (beides Merck)	Säule: LiChroCART 250-4 mit LiChrospher 60, RP-Select B (5 µm); Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18 (5 µm) (beides Merck)	Säule: LiChroCART 125-4 mit LiChrospher 60, RP-Select B (5 µm); Vorsäule: LiChrospher 100 RP-18 (5 µm) (beides Merck)
Laufmittel (Lm)	Lm A: 10 mM Ammoniumformiat pH 3,7 Lm B: 100 % Acetonitril	Lm A: 10 mM Ammoniumformiat pH 3,7 Lm B: 100 % Acetonitril	Lm A: 10 mM Triethylamin, 10 % Methanol Lm B: 100 % Methanol
Laufmittelgradient	Zeit [min] Laufmittel A [%] 0 99 3 99 16 94 17 0 21 99 30 99	Zeit [min] Laufmittel A [%] 0 96 3 96 16 87 17 0 19 0 21 96 30 96	Zeit [min] Laufmittel A [%] 0 100 5 80 10 79 12 64 31 60 33 53 34 0 36 100
Datenaufnahme	Minute 1-20 (250 nm)	Minute 1-20 (260 nm)	Minute 1-35 (269 nm)

* kann ebenfalls zur Trennung von Guanosin/Guanin sowie Xanthosin/Xanthin verwendet werden

2.6 Quantifizierung von Tritium-markierten Metaboliten

Zur Messung der Gesamtradioaktivität im Kulturmedium und in Gewebeextrakten wurden jeweils Proben (5 µl Kulturmedium, 10 µl Gewebeextrakt) entnommen, mit 3 ml Szintillationscocktail Optiphase HiSafe 2 (PerkinElmer) versetzt und die Zerfälle pro Minute (dpm) für 5 Minuten im Flüssigszintillationsanalyser Tri-Carb 2800 TR (PerkinElmer) gezählt.

2.7 LC-MS/MS-basierte Messungen zur Bestimmung von Purinen und Pyrimidinen

Die LC-MS/MS-basierten Messungen zur Bestimmung und Quantifizierung endogener Purine und Pyrimidine beim Wildtyp sowie bei *PpRH-KO* Transformanten wurden in Kooperation mit Dr. J. Klein (Stoffwechsellabor, Charité Campus Virchow Klinikum, Berlin, D) durchgeführt. Flüssigkulturen der zu untersuchenden Genotypen wurden, wie unter 2.2.2 beschrieben, kultiviert und beprobt. Die Herstellung der Gewebeextrakte für die anschließenden LC-MS/MS-Analysen erfolgte wie in 2.2.5 beschrieben.

LC-MS/MS Messungen wurden an einem 4000 QTRAP (AB Sciex, Foster City, USA) Instrument vorgenommen, das an eine reverse Phase HPLC gekoppelt war (UFLC Prominence, Shimadzu, Duisburg, D). Die Trennung von Purin- und Pyrimidin-Metaboliten erfolgte über eine Luna PFP (2) Säule (Phenomenex, Aschaffenburg, D) bei einer Flussrate von 300 µl/min in einem Methanol-Gradienten (Laufmittel A: 0,2 % Essigsäure; Laufmittel B: 100 % Methanol; Gradient: min 0: 5 % Laufmittel B; min 4: 40 % Laufmittel B; min 4,5: 100 % Laufmittel B; min 6,5: 5 % Laufmittel B). Die Ionisierung erfolgte über Elektrospray-Ionisation, die anschließende Analyse der Ionen wurde im negativen Modus durchgeführt. Quantifizierungen wurden anhand der mit stabilen Isotopen markierten Standards vorgenommen, die den Proben vor der Aufbereitung zugefügt wurden (2.2.5).

2.8 Kristallisierungsansätze

Für Kristallisierungsansätze, die in Kooperation mit Dr. D. Kopečný (Palacký Universität, Olomouc, CZ) durchgeführt wurden, wurden die zu kristallisierenden Proteine nach Überexpression in *E. coli* (2.4.2) zunächst über Co-Agarose (HisPur Cobalt Spin Columns, Thermo Fisher Scientific, Rockford, USA) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Anschließend erfolgte eine zusätzliche Aufreinigung über Gelfiltration (BioLogic Duo Flow Liquid Chromatograph, Bio-Rad) auf einer Superdex 200 HR 10/30 Säule (Amersham Biosciences über GE Healthcare). Als Puffer wurde der unten stehende HEPES Puffer verwendet. Zur Entsalzung und Aufkonzentrierung auf ca. 12-18 mg/ml wurde eine Ultrafiltrationseinheit (Centricon®, MWCO 10 kDa, Millipore) verwendet.

Die Kristallisierung erfolgte nach der *hanging-drop* Dampfdiffusionsmethode bei einer konstanten Temperatur von 20 °C. Zum Auffinden der optimalen Kristallisierungsbedingungen wurden die folgenden Screening Kits verwendet: Crystal Screen I und II von Hampton Research (Laguna Niguel, USA) sowie Classic und PEG Suite (Qiagen). Vor der Vermessung im flüssigen Stickstoff-Strahl wurden die Kristalle in die mit PEG4000 versetzte Mutterlauge als Gefrierschutzmittel überführt. Die Vermessung im Röntgendiffraktometer erfolgte an der Synchrotronanlage SOLEIL (Proxima 1 Beamline, Saclay, F).

HEPES Puffer

100 mM HEPES pH 7,5
100 mM NaCl

2.9 Durchlicht- und Fluoreszenz-Mikroskopie

Zur mikroskopischen Dokumentation von Proben wurde das Lichtmikroskop Olympus BH-2 mit integrierter Digitalkamera (Olympus, Software: analySIS, Software Imaging Systems, Münster, D) verwendet. Für Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von Transformationsansätzen (2.2.7) wurde zusätzlich eine Quecksilberlampe angeschlossen und die Filter BP-545 (Anregungsfilter) und Y-455 (Sperrfilter) verwendet. Aufgrund der besseren Auflösung, wurden Fluoreszenzsignale außerdem mit Hilfe des Konfokal-Lasermikroskop Leica TCS SPE aufgenommen (Software: LAS AF Lite, beides Leica Microsystems, Wetzlar, D).

2.10 Biolistische Transformation

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisierung von PpRH1-3 wurden die entsprechenden Lokalisierungsstrukture (pLNU-GFP, Tab. 2.2) über biolistische Transformation nach Herrmann *et al.* (2006) transient in Epidermiszellen von *Allium cepa* eingebracht (Partikelkanone PDS 1000/HE, Bio-Rad). Fluoreszenzsignale wurden nach einer 24 stündigen Inkubation im Dunkeln am Konfokal-Lasermikroskop beobachtet (2.9).

2.11 Durchflusszytometrie

Zur Messung des Ploidiegrades der regenerierten Transformanten wurde Moosgewebe von Kulturen auf Festmedium oder aus Flüssigkulturen geerntet und in 2 ml DAPI Färbelösung (CyStain UV Ploidy, Partec, Münster, D) in einer Petrischale resuspendiert. Nach mechanischer Zerkleinerung des Gewebes mit einer Rasierklinge und anschließender Filtration über eine Sieb (30 µm Porengröße), wurde die UV-Fluoreszenz der Proben vermessen. Hierfür wurde der Ploidie Analyser der Firma Partec verwendet (verwendete Einstellungen: Gain 390; Speed 0,9 µl/s). Je Probe wurden ca. 1000

Zellkerne ausgezählt. Die Ploidie konnte anhand der Histogramme abgeleitet werden: Bei haploiden Pflanzen lag der Hauptpeak bei ca. 50, während für diploide Pflanzen die stärkste Fluoreszenz bei 100 gemessen wurde.

2.12 Sequenzanalysen

2.12.1 Sequenzsuche und -vergleiche

Für Sequenzanalysen von *Physcomitrella* wurde die BLAST-Funktion unter Verwendung der Standardeinstellungen auf dem cosmoss Server (<http://www.cosmoss.org/>) zum Screening des Genoms sowie des Transkriptoms (V1.2 und V1.6, Rensing *et al.* 2008) verwendet. Sequenzen aus dem Genom von *S. moellendorffii*, *C. reinhardtii* und *Volvox carteri* wurden über BLAST-Analysen auf dem JGI Server identifiziert (<http://genome.jgi-psf.org/> und <http://www.phytozome.net/>). Die Suche von Sequenzen in anderen Genomen als den zuvor genannten erfolgte über die GenBank® Datenbank des NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) oder über die DFCI Datenbank (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>).

Sequenzvergleiche auf Nukleotid-Ebene wurden unter Verwendung der Funktion *Align 2 or more sequences* auf dem NCBI Server vorgenommen (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PAGE_TYPE=BlastSearch&PROG_DEF=blastn&BLAST_PROG_DEF=megaBlast&SHOW_DEFAULTS=on&BLAST_SPEC=blast2seq&LINK_LOC=align2seq). *Global pairwise alignments* von Aminosäure-Sequenzen wurden mit dem *EMBOSS::needle pairwise alignment algorithm* vorgenommen (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/emboss/align/index.html>).

2.12.2 Bestimmung von Proteineigenschaften

Berechnungen von Proteineigenschaften wie Molekulargewicht, isoelektrischer Punkt etc. wurden mit Hilfe des ProtParam Tools auf dem ExPASy Proteomics Server (<http://expasy.org/tools/protparam.html>) getroffen.

In silico Analysen zur subzellulären Lokalisierung der Proteine wurden mit den Anwendungen TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>, Emanuelsson *et al.* 2007) und MultiLoc ([http://www-bs.informatik.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc](http://www.bs.informatik.uni-tuebingen.de/Services/MultiLoc), Höglund *et al.* 2006) durchgeführt.

Angaben zur EST-Frequenz wurden über den cosmoss Server (<http://www.cosmoss.org/>) erhalten.

2.12.3 Multiple Alignments und Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen

Multiple Alignments wurden mit Hilfe des Programms ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>, Larkin *et al.* 2007) erstellt und mit Jalview Version 2.4 (<http://www.jalview.org/>, Waterhouse *et al.* 2009) visualisiert.

Die Erstellung von phylogenetischen Stammbäumen erfolgte in Kooperation mit Dr. D. Kopečný (Palacký Universität, Olomouc, CZ). Das Alignment der Aminosäure-Sequenzen wurde mit Hilfe des Programmes MUSCLE Version 3.8 (<http://www.drive5.com/muscle/>, Edgar 2004) erstellt. Aufgrund der stark von den anderen Aminosäure-Sequenzen abweichenden Sequenz von AtNSH3 wurde im Anschluss das Programm Gblocks (<http://molevol.cmima.csic.es/castresana/Gblocks.html>, Castresana 2000) angewendet, um schwer alignbare Bereiche zu entfernen und das Alignment auf Positionen mit ausreichend phylogenetischer Information zu kürzen (verbleibende Positionen: 260

von 918 Aminosäuren). Unter Anwendung des *maximum likelihood*-Kriteriums mit *bootstrap*-Analyse wurde die Phylogenie mit dem Programm PhyML Version 3.0 (<http://www.atgcmontpellier.fr/phyml/>, Guindon und Gascuel 2003) unter Verwendung des LG-Modells der Evolution (Le und Gascuel 2008) berechnet. Zur Darstellung des Stammbaumes wurde das Programm TreeView (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>, Page 1996) verwendet.

3 Ergebnisse

Pflanzliche Ribohydrolasen (RHs) und ihre zugehörigen Genfamilien sind bisher nur für *Arabidopsis* beschrieben worden. In der vorliegenden Arbeit wurde die RH-Genfamilie aus *Physcomitrella* identifiziert und eingehend charakterisiert. An rekombinanten Proteinen wurden biochemische Charakteristika wie Temperatur- und pH-Optimum sowie Substratspezifität einzelner Familienmitglieder bestimmt. Ebenso wurde die subzelluläre Lokalisierung der PpRHs untersucht. In einem weiteren Abschnitt wurden *single-knockout* Pflanzen für *PpRH1*, *PpRH2* und *PpRH3* hergestellt und auf molekularer Ebene analysiert. Anhand von *in vivo* Markierungsexperimenten mit verschiedenen Ribosiden sowie LC-MS/MS-basierten Messungen von Purin- und Pyrimidin-Gehalten wurden die Auswirkungen der jeweiligen RH-*knockouts* auf den pflanzlichen Stoffwechsel untersucht.

3.1 *In vivo* RH-Aktivität bei *Physcomitrella*

In der Literatur wurde RH-Aktivität bereits mehrfach für verschiedene Pflanzenspezies beschrieben. Hierzu zählen beispielsweise Gerste (Guranowski und Schneider 1977), Weizen (Chen und Kristopeit 1981), Tomate (Burch und Stuchbury 1986), Gelbe Lupine (Abusamhadneh *et al.* 2000) und Kaffee (Campos *et al.* 2005). Für das Laubmoos *Physcomitrella* war bisher nicht bekannt, ob es diese Enzym-Aktivität besitzt. Zur Messung von *in vivo* RH-Aktivität wurde daher eine unter Standardbedingungen kultivierte Wildtyp Kultur (1,5 g Gewebe (FG), 20 ml A'BCDNTV-Medium) mit Adenosin (80 μ M) versetzt und nach 24 stündiger Inkubation beprobt. Hierfür wurde eine Probe aus dem Medium entnommen und per HPLC (2.5) analysiert.

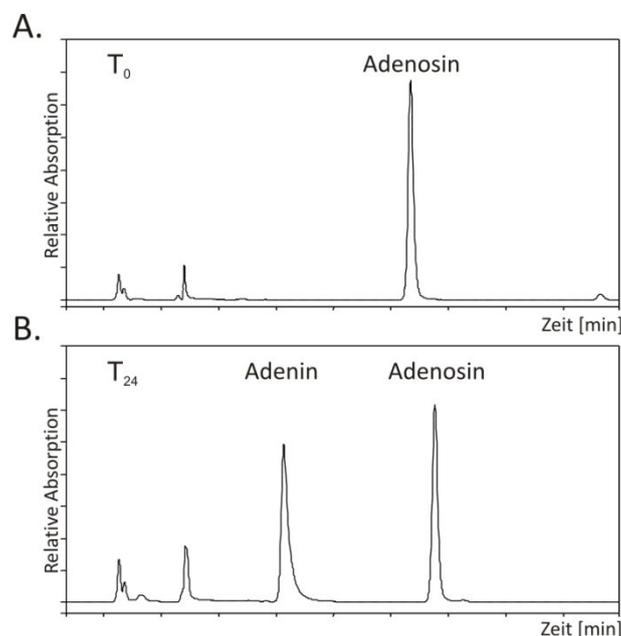


Abb. 3.1 *In vivo* RH-Aktivität beim Wildtyp von *Physcomitrella*. Zur Messung von RH-Aktivität wurde einer unter Standardbedingungen gewachsenen Wildtyp Kultur Adenosin (Endkonzentration 80 μ M) zugesetzt. Unmittelbar nach Applikation von Adenosin (A.) sowie nach 24 stündiger Inkubation (B.) wurden Proben aus dem Medium entnommen und mittels HPLC analysiert. Die leichte Verschiebung der Retentionszeiten zwischen (A.) und (B.) ist darauf zurückzuführen, dass die beiden Proben in einem größeren zeitlichen Abstand voneinander vermessen wurden. Die Substanzen wurden anhand des jeweiligen UV-Spektrums eindeutig identifiziert.

Wie aus Abb. 3.1 deutlich wird, konnte die Bildung von Adenin gemessen werden. Aus der Umwandlung von Adenosin zu Adenin konnte unter diesen Bedingungen eine *in vivo* Metabolisierungsrate von $19 \text{ nmol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ (FG) für Adenosin bestimmt werden. Ob die Deribosylierung von Adenosin durch Nukleosid-Phosphorylase-Aktivität (in Anwesenheit von Phosphat) oder durch RH-Aktivität erfolgt, kann an dieser Stelle nicht eindeutig bestimmt werden. Aufgrund der Datenlage in der Literatur wird davon ausgegangen, dass die Bedeutung der Nukleosid-Phosphorylase in Pflanzen untergeordnet ist (1.1.2). Die beobachtete Umwandlung von Adenosin zu Adenin weist somit auf eine mögliche RH-Aktivität hin. *In vitro* Messungen von RH-Aktivität unter Verwendung eines Puffers ohne Phosphat zeigten ebenfalls eine Umwandlung des Ribosids Inosin zur korrespondierenden Base Hypoxanthin (3.6.3). Die Existenz von RH-Aktivität in *Physcomitrella* wird daher als sehr wahrscheinlich angesehen. In einem nächsten Schritt wurde daher im Genom von *Physcomitrella* nach putativen RH-Genen gesucht.

3.2 Identifizierung und Charakterisierung der RH-Genfamilie aus *Physcomitrella*

Zur Identifizierung von RH-kodierenden Genen im Genom von *Physcomitrella* wurden Aminosäure-Sequenzen von bereits bekannten RHs aus Protozoen (*C. fasciculata*, Accession Q27546; *L. major*, Accession P83851; *T. vivax*, Accession AAG38561) verwendet. Zum damaligen Zeitpunkt waren keine RH-Sequenzen aus Pflanzen bekannt. Unter Verwendung der BLAST-Funktion wurde mit den oben genannten Sequenzen das Transkriptom von *Physcomitrella* (<http://www.cosmoss.org/>, Assemblierung V1.2) nach homologen Sequenzen durchsucht. Sowohl die Suche BLASTp (Datenbank *P. patens* V1.2_proteins) als auch tBLASTn (Datenbank *P. patens* V1.2_transcripts) unter Verwendung der Standardeinstellungen lieferten die folgenden drei Loci als Kandidaten: Pp1s357_22, Pp1s140_172 und Pp1s5_276 (Tab. 3.1). Diese wurden als *PpRH1*, -2 und -3 bezeichnet. In Tab. 3.1 sind die wichtigsten Merkmale dieser Loci bzw. der ausgewählten Genmodelle sowie der korrespondierenden Aminosäure-Sequenzen aufgeführt.

Die insgesamt sehr geringe Homologie der putativen RHs aus *Physcomitrella* zu RHs aus Protozoen (10-28 %) lässt sich mit der phylogenetischen Distanz zwischen diesen Organismen erklären.

Die zur Assemblierung V1.2 gehörenden Genmodelle wurden hingehend ihrer Intron/Exon-Struktur, der Übereinstimmung mit vorhandenen Transkripten sowie dem Vorhandensein des RH-typischen Sequenzmotives DXDXXXDD (Versées und Steyaert 2003, Pfam ID PF01156) analysiert und als korrekt bewertet. Keines der drei Genmodelle wird allerdings über die gesamte Länge des Gens durch ESTs gestützt.

Auch nach Veränderung der verwendeten Parameter zur Reduktion der Stringenz lieferte die BLAST-Suche keine weiteren Kandidaten. Die Genfamilie der RHs in *Physcomitrella* scheint demnach mit drei putativen Mitgliedern relativ klein zu sein.

Tab. 3.1 Eigenschaften der *RH*-Genfamilienmitglieder aus *Physcomitrella*, die nach einer BLAST-Suche im *Physcomitrella* Genom mit den Sequenzen protozoischer RHs (*Crithidia fasciculata*, Accession Q27546; *Leishmania major*, Accession P83851; *Trypanosoma vivax*, Accession AAG38561) selektiert wurden. ^(a) Homologie über <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html> ^(b) Genmodelle und die Anzahl der ESTs stammen von <https://www.cosmoss.org/mgb2/gbrowse/physcome> ^(c) Parameter der Proteine wurden über <http://expasy.org/tools/protparam.html> bestimmt.

	<i>PpRH1</i>	<i>PpRH2</i>	<i>PpRH3</i>
Sequenz Nr.	Pp1s357_22	Pp1s140_172	Pp1s5_276
Identität zu protozoischen RHs ^(a) [%]	17-27	12-28	10-24
Genmodell/ Position ^(b)	Pp1s357_22V2.1 (Phypa_226360) scaffold_357: 158771..162989 (+ strand)	Pp1s140_172V2.1 (Phypa_137777) scaffold_140: 1015516..1019756 (- strand)	Pp1s5_276V2.1 (Phypa_55133) scaffold_5: 1889219..1893898 (+ strand)
Anzahl an ESTs ^(b)	14	3	5
ORF [bp]	1002	987	1047
Abgeleitete Protein-Sequenz [aa]	334	329	349
MW ^(c) [kDa]	36,08	35,46	37,67
pI ^(c)	4,96	4,90	4,97
Sequenzmotiv (Pfam ID PF01156)	DXDXXXDD	DXDXXXDD	DXXXXXXDD

In Abb. 3.2 ist die zugehörige Intron/Exon-Struktur der zur Genom-Assemblierung V1.2 gehörenden Genmodelle für *PpRH1*, -2 und -3 schematisch dargestellt. Alle drei Genmodelle weisen acht Introns auf, wobei das 1. Intron immer das längste ist (692 bp bei *PpRH1*, 1454 bp bei *PpRH2* und 1466 bp bei *PpRH3*). Darüberhinaus lassen sich Ähnlichkeiten hinsichtlich der Anordnung und Länge der Exons zwischen den selektierten Genmodellen erkennen. Das zuvor erwähnte Sequenzmotiv ist bei allen drei Genmodellen am Übergang vom 1. zum 2. Exon lokalisiert (gelb markiert in Abb. 3.2).

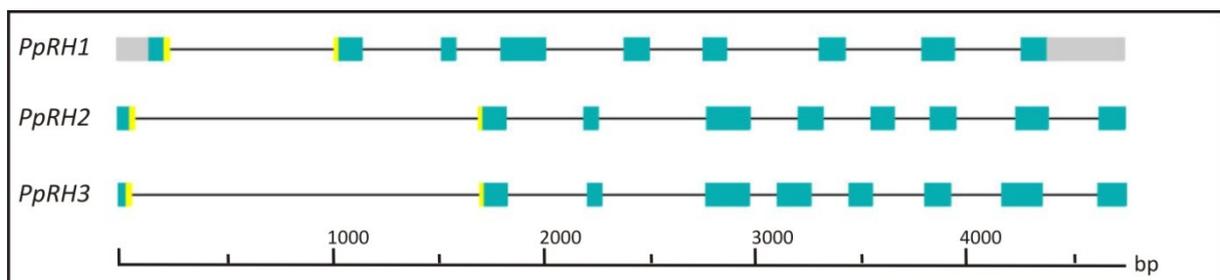


Abb. 3.2 Schematische Darstellung der Intron/Exon-Struktur von *PpRH1*, -2 und -3. In grau sind untranslatierte Bereiche in der 5'- und 3'-Region dargestellt, blaue Boxen stellen die kodierenden Abschnitte (Exons) dar, die von Introns unterbrochen sind. Das für RHs typische Sequenzmotiv (DXDXXXDD, Pfam ID PF01156) befindet sich am Übergang zwischen 1. und 2. Exon (gelbe Boxen).

Die *RH*-Genfamilie mit den Mitgliedern *PpRH1*, -2 und -3 wurde zunächst *in silico* hinsichtlich der Eigenschaften der abgeleiteten Aminosäure-Sequenzen detailliert analysiert.

Außerdem wurde eine heterologe Überexpression aller drei *PpRHs* angestrebt, um Untersuchungen am rekombinanten Protein vorzunehmen. Aufgrund der zahlreichen EST-Evidenzen wurde *PpRH1* für eine umfassende Charakterisierung auf proteinbiochemischer Ebene ausgewählt (3.4).

3.2.1 Aminosäure-Sequenzvergleiche von PpRH1, -2 und -3

Die wichtigsten Charakteristika der PpRH1, -2 und -3 zugrunde liegenden Aminosäure-Sequenzen sind in Tab. 3.1 aufgeführt. Die abgeleiteten Protein-Sequenzen variieren von 329 (PpRH2) über 334 (PpRH1) bis 349 (PpRH3) Aminosäuren mit Molekulargewichten (MW) von 35,46 (PpRH2) über 36,08 (PpRH1) bis 37,67 (PpRH3) kDa. Der isoelektrische Punkt wurde mit 4,90 (PpRH2), 4,96 (PpRH1) und 4,97 (PpRH3) berechnet.

Für Vergleiche der Aminosäure-Sequenzen wurde der ClustalW Algorithmus verwendet. Zur Ermittlung der prozentualen Identität der Sequenzen im paarweisen Alignment wurde der EMBOSS::needle Algorithmus eingesetzt, der die folgenden Identitäten berechnete: PpRH1 zu PpRH2 51 %; PpRH1 zu PpRH3 43 % und PpRH2 zu PpRH3 76 %. PpRH2 und -3 sind sich demnach deutlich ähnlicher als PpRH1 und -2 bzw. -3

Wie bereits erwähnt, liegen bisher nur sehr wenige Informationen zu RHs aus Pflanzen vor. Details zu Sequenzeigenschaften wie Aminosäure-Resten, die die Substratspezifität beeinflussen, sind derzeit nur für RHs aus Protozoen bekannt. In Abb. 3.3 ist ein Alignment von RHs aus Protozoen mit der putativen RH-Familie aus *Physcomitrella* unter Markierung katalytisch wichtiger Aminosäuren dargestellt.

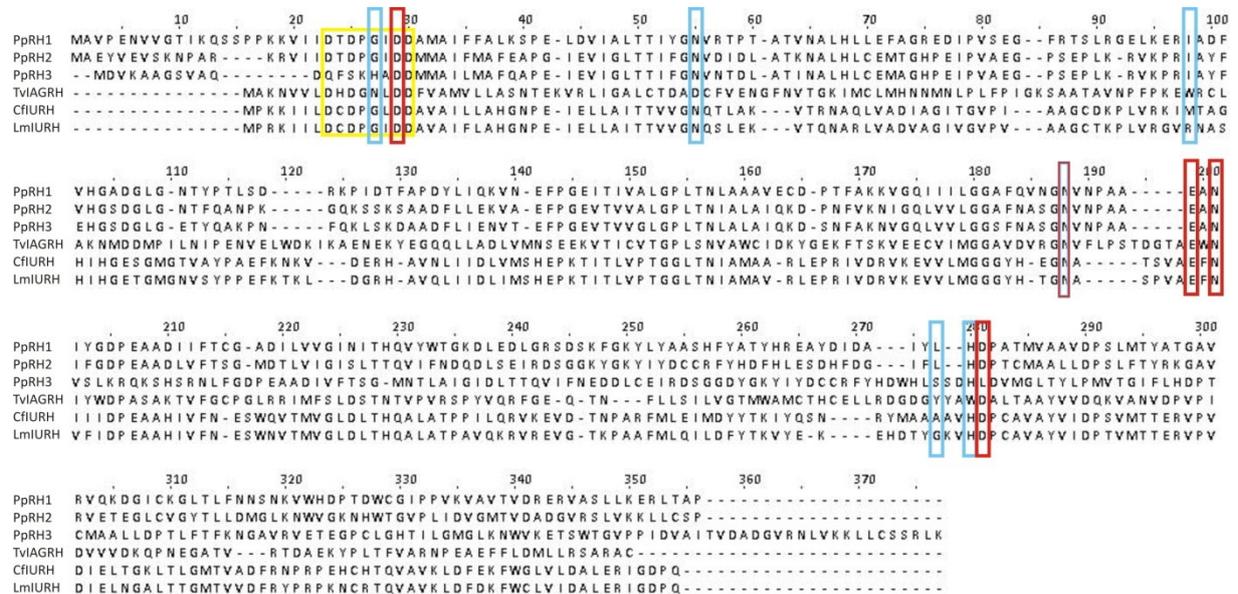


Abb. 3.3 Multiples Alignment der Aminosäure-Sequenzen von RHs aus Protozoen (TVIAGR: *Trypanosoma vivax*, Accession AAG38561, CfiURH: *Crithidia fasciculata*, Accession Q27546, LmiURH: *Leishmania major*, Accession P83851) und putativen RHs aus *Physcomitrella* (PpRH1, PpRH2, PpRH3). Das Alignment wurde mit ClustalW berechnet, manuell editiert und mit Jalview graphisch dargestellt. Gelb umrahmt ist das typische Sequenzmotiv DDXXXXDD für RHs, blaue Rahmen markieren Aminosäuren, die nach Angaben von Versées *et al.* (2001) bei der RH aus *T. vivax* eine Interaktion mit dem Purin eingehen (N12, D40, W83, N173, Y257 und W260), während rote Rahmen auf Aminosäure-Reste hinweisen, die mit der Ribose interagieren (D14, N173, E184, N186 und D261).

Es zeigt, dass das N-terminale Motiv aus Aspartat-Resten – DXDXXXDD (Pfam ID PF01156, gelb umrahmt in Abb. 3.3) –, das von Versées und Steyaert (2003) als charakteristisch für RHs beschrieben wurde, auch in zwei der selektierten Kandidaten aus *Physcomitrella* vorhanden ist. In der Sequenz von PpRH3 hingegen ist das Motiv in der abgewandelten Form DXXXXXXDD statt DXDXXXDD vorhanden. Es ist unbekannt, ob die Modifikation des Sequenzmotivs Einfluss auf die Aktivität hat. Versées *et al.* (2001) identifizierten Aminosäure-Reste, die mit dem Purin-Rest des Ribosids interagieren (blaue Rahmen, Abb. 3.3) bzw. solche, die an der Bindung des Ribose-Anteils (rote Rahmen, Abb. 3.3) beteiligt sind. Wie aus Abb. 3.3 deutlich wird, zeigen mit der Nucleobase interagierende Aminosäure-Reste insgesamt eine höhere Divergenz als solche, die spezifisch für die Bindung der Ribose sind. Putative RHs aus *Physcomitrella* zeigen eine hohe Homologie mit protozoischen RHs in Regionen, die für die Interaktion mit der Ribose wichtig sind, während Aminosäuren zur Interaktion mit dem Basen-Rest sich stärker unterscheiden. Dies deutet möglicherweise auf eine andere Substratspezifität hin.

3.3 Herstellung rekombinanter PpRHs in *E. coli*

Nach Identifizierung der RH-kodierenden Gene *PpRH1*, -2 und -3 über eine entsprechende BLAST-Suche, wurde die Klonierung der zugehörigen cDNA-Sequenzen angestrebt. Während *PpRH1* aus einer cDNA-Bank amplifiziert wurde, wurden die Sequenzen von *PpRH2* und -3 über Gensynthese erhalten.

3.3.1 Klonierung von *PpRH1*

Das mittels BLAST-Suche im Genom von *Physcomitrella* selektierte Gen *PpRH1* (Genmodell: Pp1s357_22V2.1) weist einen ORF von 1002 bp auf, der für ein Protein mit einer Länge von 334 Aminosäuren kodiert (Tab. 3.1, Aminosäure-Sequenz siehe Anhang, 6.2.1). Versuche, den gesamten ORF aus einer cDNA-Bank aus Protonemagewebe (Reski *et al.* 1995) in einem Schritt zu amplifizieren, waren nicht erfolgreich. Daher wurden zunächst zwei sich überlappende Teilfragmente amplifiziert (Primer 235/239, 238/236, Tab. 2.3). Die Teilfragmente wurden dabei so gewählt, dass im Überschneidungsbereich eine *Bgl*II-Schnittstelle liegt, die später zur Ligation der beiden Fragmente genutzt wurde. Mit einer proof reading Polymerase wurden die Teilfragmente aus der cDNA-Bank amplifiziert und anschließend aufgereinigt. Nach einem Restriktionsverdau mit *Bgl*II, erfolgte die Ligation der Fragmente. Das so erhaltene Fragment wurde als Template in die PCR eingesetzt und unter Verwendung der terminalen Primer 235/236 nochmals reamplifiziert. Die gesamte kodierende Sequenz von *PpRH1* wurde dann in den Vektor pCR®4Blunt-TOPO® kloniert, in *E. coli* transformiert und das erhaltene Konstrukt sequenziert. Die *via* PCR amplifizierte cDNA-Sequenz bestätigte die dem Genmodell Pp1s357_22V2.1 zugrunde liegende Nukleotid-Sequenz.

3.3.2 Gensynthesen von *PpRH2* und -3

Zum Erhalt der kodierenden Sequenzen von *PpRH2* und -3 wurde die Firma DNA Cloning Service mit Gensynthesen beauftragt. Die hierfür verwendeten Sequenzen wurden von den entsprechenden Genmodellen aus der Assemblierung V1.2 abgeleitet (Genmodell *PpRH2*: Pp1s140_172V2.1; Genmodell *PpRH3*: Pp1s5_276V2.1, Aminosäure-Sequenzen siehe Anhang, 6.2.2, 6.2.3). Die zum damaligen Zeitpunkt veröffentlichten ESTs bestätigten die entsprechenden Genmodelle und es bestand kein Grund zur Annahme, dass die vorhergesagten Aminosäure-Sequenzen fehlerhaft sein könnten. Für spätere Klonierungen wurden die synthetisierten Gen-Sequenzen am N-Terminus mit

einer *NheI*-, am C-Terminus mit einer *XhoI*-Schnittstelle versehen. Eine Codon-Optimierung wurde nicht vorgenommen.

3.3.3 Heterologe Expression von PpRH1, -2 und -3 in *E. coli*

Zum Nachweis der Funktionalität der aus *Physcomitrella* selektierten *RH*-Gene, wurde eine heterologe Expression aller drei Proteine in *E. coli* angestrebt. Hierfür wurde eine N-terminale Histidin-Markierung der Proteine nach Expression im Vektor pET28a ausgewählt.

Die kodierende Sequenz von *PpRH1* wurde mit den Primern 312/314 (Tab. 2.3) aus dem Vektor pCR®4Blunt-TOPO®_PpRH1 mittels *proof reading* Polymerase amplifiziert. Über *NheI* und *Sall* erfolgte die *in frame*-Klonierung mit einem N-terminalen Polyhistidin-Tag in den Vektor pET28a. *PpRH2* und -3 wurden über Gensynthese erhalten und die angefügten, terminalen Schnittstellen von *NheI* und *XhoI* zur *in frame*-Klonierung in den Vektor pET28a verwendet. Auch hier wurde der Polyhistidin-Tag an den N-Terminus angefügt.

Die Expression der rekombinanten PpRH Proteine wurde in dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS vorgenommen (2.4.2). Nach Herstellung der Proteinextrakte erfolgte die Aufreinigung über Ni-Agarose wie unter 2.4.3 bzw. 2.4.4 beschrieben. Für PpRH1 und PpRH2 wurde, wie Abb. 3.4 A. zeigt, erfolgreich rekombinantes Protein mit der erwarteten Größe (38,6 kDa bzw. 38,0 kDa) gewonnen. Die erhaltene Proteinpräzipitation wurde nach Entsalzung über Dialyse und Aufnahme in 1 x TKD Puffer (2.4.1) für die enzymkinetische Charakterisierung, insbesondere die Messung des jeweiligen Substratspektrums eingesetzt. Aktivitätstests wiesen für beide Proteine eindeutig Aktivität nach (3.4.3).

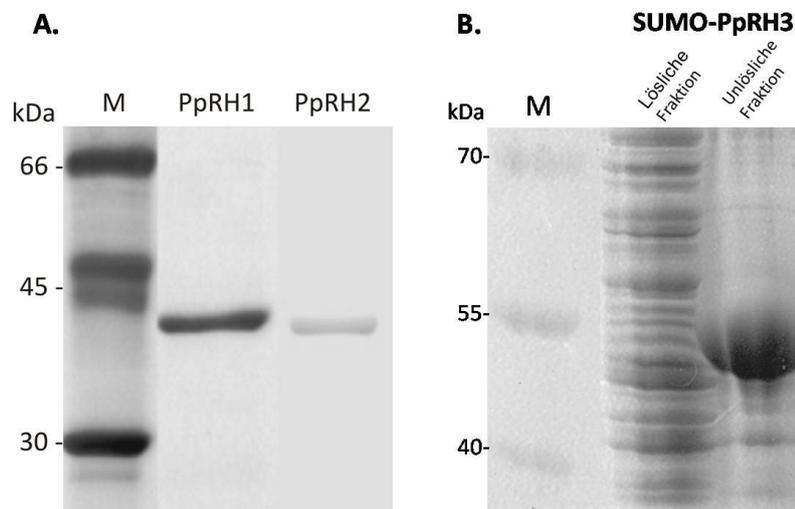


Abb. 3.4 Heterologe Expression von PpRH1, -2 und -3 im *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS. (A.): SDS-Polyacrylamid-Gel mit rekombinantem PpRH1 und -2 Protein nach Expression in *E. coli*. Proteinextrakte aus *E. coli*-Kulturen nach 15 stündiger, IPTG-induzierter Expression von His-getagtem PpRH1 bzw. -2 Protein wurden nach Aufreinigung auf einem 12,5 %igem SDS-Gel aufgetrennt. (B.): SDS-Polyacrylamid-Gel mit rekombinantem SUMO-PpRH3 Protein nach Expression in *E. coli*. Die lösliche und unlösliche Fraktion des Proteinextraktes wurde nach 6 stündiger, IPTG-induzierter Expression auf einem 12,5 %igem SDS-Gel aufgetrennt. Färbung der Gele in (A.) und (B.) mit Colloidal-Coomassie.

Die Expression von PpRH3 in dem *E. coli*-Stamm BL21(DE3)pLysS lieferte unlösliches Protein, das nur mittels eines Western Blots unter Verwendung eines anti His-Tag-Antikörpers im Pellet nachzuweisen war (Daten nicht gezeigt). Um die Löslichkeit des Proteins zu verbessern, wurden verschiedene Strategien getestet. Zunächst erfolgte die Expression des Proteins bei niedrigen Temperaturen (16-18 °C), die aber keine Verbesserung brachte. Im Anschluss wurden unterschiedliche *E. coli*-Stämme (BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL, Rosetta(DE3)pLysS, C41 (DE3), ER2566, 2.3.1) zur Expression verwendet, die die Expression verbessern und/oder die Löslichkeit von Proteinen erhöhen sollen. Auch auf diesem Weg konnte im löslichen Überstand kein PpRH3 Protein in nennenswerter Menge erhalten werden. Es waren lediglich geringe Mengen im Western Blot unter Verwendung eines anti His-Tag-Antikörpers detektierbar (Daten nicht gezeigt). Als weitere Möglichkeit zur erfolgreichen Expression unlöslicher Proteine bietet sich die Co-Expression mit einem löslichen Protein an. In diesem Fall wurde das Champion™ pET SUMO Protein Expression System verwendet, das die Expression eines Fusionsproteins aus SUMO-Tag und PpRH3 erlaubt (zur Klonierung verwendete Primer 326/423, Tab. 2.3; Größe des Fusionsproteins 51 kDa). Die Analyse der Proteinextrakte zeigte jedoch, dass auch das SUMO-Tag zu keiner Verbesserung der Löslichkeit von PpRH3 führte (Abb. 3.4 B.). Daher konnte keine weiterführende Charakterisierung von PpRH3 hinsichtlich des Substratspektrums etc. vorgenommen werden.

3.4 Charakterisierung rekombinanter PpRHs

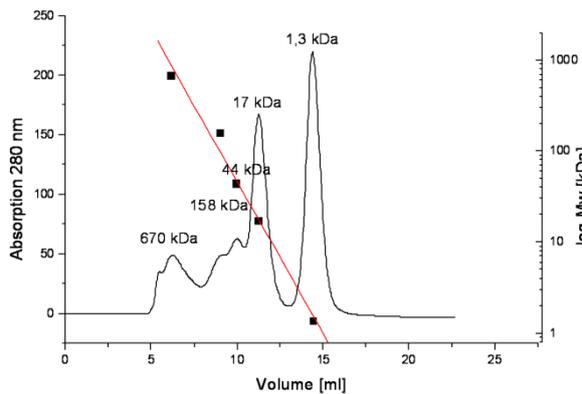
3.4.1 Quartärstruktur von PpRH1

Von RHs aus Protozoen sowie aus einigen Pflanzen ist bereits bekannt, dass diese häufig nicht als Monomer, sondern als Di- oder Tetramere auftreten (z.B. Campos *et al.* 2005, Abusamhadneh *et al.* 2000). Ob das auch für RHs aus *Physcomitrella* zutrifft, sollte am Beispiel von PpRH1 untersucht werden. Hierfür wurde das rekombinante Protein zunächst auf einem nativen Polyacrylamid-Gel analysiert. Da die Oligomerisierung häufig konzentrationsabhängig erfolgt, wurden 100, 50 und 25 µg rekombinantes PpRH1 auf ein natives Gel aufgetragen. Wie Abb. 3.5 C. zeigt, liegt PpRH1 demnach zu einem Großteil als Dimer (77,2 kDa) vor. Ein geringer Anteil des Proteins konnte zudem als Tetramer (154,4 kDa) nachgewiesen werden. Das Monomer (38,6 kDa) konnte nicht detektiert werden.

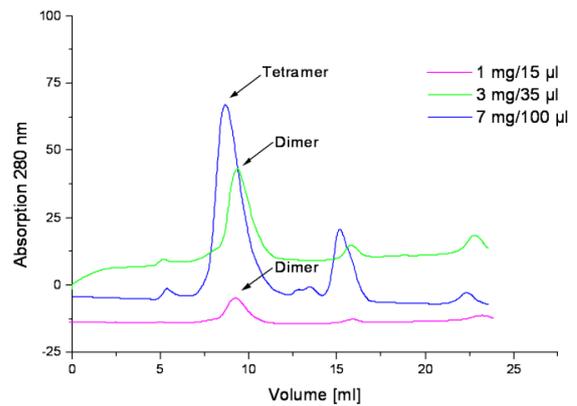
Neben nativer-PAGE wurde außerdem zur Bestimmung der Quartärstruktur von PpRH1 eine Gelfiltration über FPLC vorgenommen. Für die Kalibrierung wurde der Gel Filtration Standard von Bio-Rad eingesetzt, der den Molekulargewichtsbereich von 1,3-670 kDa abdeckt (Abb. 3.5 A.). Zur Untersuchung der Quartärstruktur von PpRH1 wurden 1-7 mg an rekombinantem PpRH1 Protein verwendet. Zunächst wurden FPLC-Läufe mit 1 bzw. 3 mg PpRH1 vorgenommen. Aus diesen konnte mit Hilfe des Standards ein Molekulargewicht von 77-83 kDa für PpRH1 berechnet werden. Dies Ergebnis weist auf das Vorliegen von PpRH1 in Form eines Dimers hin (Abb. 3.5 B.). Peaks, die der Molekülmasse des Monomers entsprachen, konnten ebenso wie bei der nativen-PAGE nicht nachgewiesen werden. Bei höheren Konzentrationen (> 7 mg) wurde ein Molekulargewicht von 132 kDa berechnet, das darauf schließen lässt, dass PpRH1 bei hoher Konzentration auch zur Tetramer-Bildung neigt (Abb. 3.5 B.).

Somit wurde über native-PAGE und Gelfiltration übereinstimmend nachgewiesen, dass das rekombinante PpRH1 Protein vorrangig als Dimer auftritt. Außerdem wurde die Bildung eines Tetramers bei hohen Konzentrationen beobachtet

A.



B.



C.

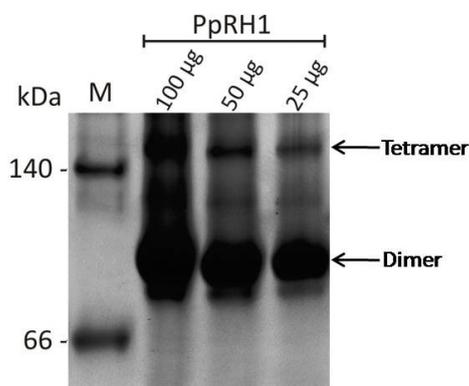


Abb. 3.5 Bestimmung der Quartärstruktur von rekombinantem PpRH1 Protein; (A.) und (B.): Gelfiltrationschromatografie unter Verwendung einer Bio-Prep SE-100/17-Säule (Bio-Rad); (A.): Gel Filtration Standard von Bio-Rad mit Angabe der entsprechenden Molekulargewichte. Die rote Linie zeigt die Auftragung des Logarithmus des Molekulargewichtes gegen das Elutionsvolumen. (B.): Elutionsprofil von 1 mg (in 15 µl, pink), 3 mg (in 35 µl, grün) und 7 mg (in 100 µl, blau) PpRH1; (C.): Natives Polyacrylamid-Gel (8 %) mit 100, 50 und 25 µg PpRH1 nach Färbung mit Colloidal-Coomassie.

3.4.2 Ansätze zur Kristallisierung von PpRH1

Die Versuche zur Kristallisierung von PpRH1 wurden in Zusammenarbeit mit Dr. D. Kopečný (Palacký Universität, Olomouc, CZ) durchgeführt. Die Kristallisationsansätze mit rekombinantem, über Co-Agarose aufgereinigtem PpRH1 Protein erfolgten nach der Dampfdiffusionsmethode mit hängendem Tropfen. Zum Auffinden von geeigneten Kristallisierungsbedingungen wurden verschiedene *screening kits* verwendet (2.8). Wie die Abb. 3.6 zeigt, wurden erste Kristalle für PpRH1 erhalten. Diese wurden über Reservoiren gebildet, die 0,1 M HEPES pH 7,5 mit 100 mM NaCl und 18 % (w/v) PEG 4000 enthielten. Bei der anschließenden Vermessung im Röntgendiffraktometer in der Synchrotronanlage SOLEIL (Saclay, F) wurde eine nur sehr geringe Auflösung von 4,1 Å bestimmt. Die Analyse der Kristalle zeigte, dass die asymmetrische Einheit vier oder sechs Monomere enthält, die in Form von zwei oder drei Dimeren auftreten. Weiterführende Experimente zur Kristallisierung von PpRH1 zum Erhalt von Strukturdaten von Kristallen mit einer deutlich besseren Auflösung (< 2,5 Å) sind derzeit in Vorbereitung. Unter anderem soll rekombinantes PpRH1 Protein erzeugt werden, das keinen *Tag* am N-Terminus besitzt, da dieses sich störend auf die Kristallisierung auswirken kann.



Abb. 3.6 Kristalle des rekombinanten PpRH1 Proteins. Kristalle wurden in Reservoiren erhalten, die 0,1 M HEPES pH 7,5 mit 100 mM NaCl und 18 % (w/v) PEG 4000 enthielten. Die Untersuchung der Kristalle im Röntgendiffraktometer (Auflösung 4,1 Å) lieferte die folgenden Daten: Die Kristalle gehören zu einer primitiven, tetragonalen Raumgruppe $P4_22_12$. Für die Elementarzelle wurden die folgenden Parameter ermittelt: $a = 126,08$; $b = 126,08$; $c = 255,11$; $\alpha = 90^\circ$; $\beta = 90^\circ$; $\gamma = 90^\circ$. Die asymmetrische Einheit enthielt vier oder sechs Monomere die in Form von zwei oder drei Dimeren vorlagen und einem Matthews-Koeffizienten (Matthews 1968) von 3,37 (entspricht einem Flüssigkeitsgehalt von ca. 63 %) bzw. $2,25 \text{ \AA}^3 \text{ Da}^{-1}$ (entspricht einem Flüssigkeitsgehalt von ca. 45 %) aufwiesen. In Kooperation mit Dr. D. Kopečný (Palacký Universität, Olomouc, CZ).

3.4.3 Aktivitätsnachweis rekombinanter PpRHs

Für die Messung von RH-Enzym-Aktivität, wurden wie in 2.4.11 beschrieben zwei unterschiedliche Assays angewendet. Der spektrophotometrische Assay nach Parkin (1996) beruht auf der Messung einer Absorptionsänderung bei einer bestimmten Wellenlänge. Die Änderung der Absorption nach der vollständigen Umwandlung einer 1 mM Lösung eines Ribosids zur korrespondierenden Base wird als $\Delta\epsilon$ beschrieben und kann experimentell ermittelt und zur Berechnung der spezifischen Aktivität eingesetzt werden. In Abb. 3.7 A. ist das Prinzip des spektrophotometrischen Assays am Beispiel von Adenosin dargestellt. Links ist das Spektrum von Adenosin gezeigt. Erfolgt ein Umsatz von Adenosin zu Adenin, ist eine Abnahme der Absorption bei 276 nm messbar (Abb. 3.7 A., rechts). Wird eine 1 mM Lösung von Adenosin vollständig zu Adenin umgesetzt, kann zwischen den beiden Spektren $\Delta\epsilon_{276 \text{ nm}} = -1,4$ gemessen werden.

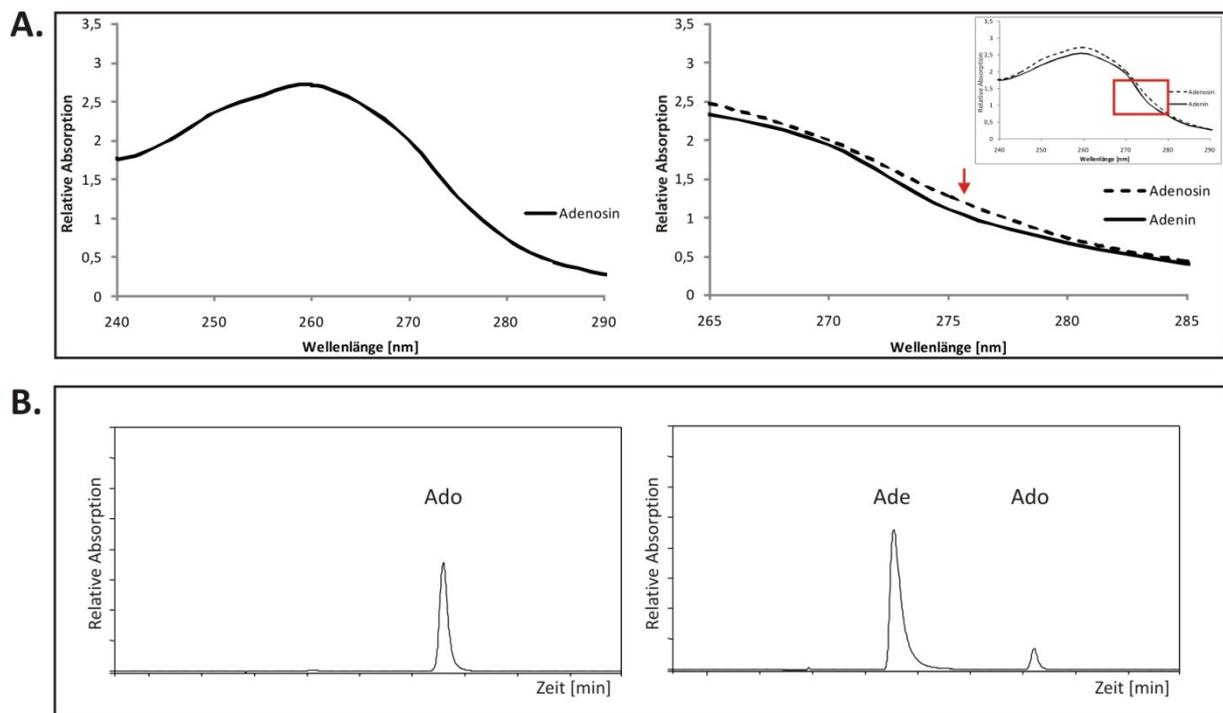


Abb. 3.7 Messgrundlagen der verwendeten Enzym-Assays zur Bestimmung von RH-Aktivität. (A.): Spektrophotometrischer Enzym-Assay nach Parkin (1996). Links ist das Spektrum von Adenosin im Bereich von 240-290 nm gezeigt; Rechts sind die Spektren von Adenosin und Adenin im Vergleich gezeigt, wobei der Bereich von 265-285 nm vergrößert dargestellt wurde. Als Messwellenlänge wurde 276 nm ausgewählt, da die beiden Spektren hier eine deutliche Differenz aufweisen (roter Pfeil). Aus Absorptionsänderungen wurde RH-Aktivität errechnet. (B.): HPLC-basierter Enzym-Assay. Links ist ein HPLC-Chromatogramm von Adenosin, rechts von Adenosin und Adenin dargestellt. Die chromatografische Auftrennung von Ribosid und Base ermöglicht die Messung von RH-Aktivität.

Abschnitt B. der Abb. 3.7 veranschaulicht das dem HPLC-basierten Enzym-Assay zugrunde liegende Prinzip. Die durch RH-Aktivität auftretende Umwandlung des Ribosids zur korrespondierenden Base – hier am Beispiel von Adenosin und Adenin gezeigt – wird durch die chromatografische Auftrennung von Substrat und Produkt *via* HPLC sichtbar gemacht. Substrat und Produkt sowie mögliche Nebenprodukte können eindeutig anhand von Retentionszeit und UV-Spektrum identifiziert und quantifiziert werden.

Je nach Anwendung wurde einer der beiden Assays zur Messung der RH-Aktivität eingesetzt. Die parallele Vermessung von Enzym-Assays mit beiden Methoden zeigte, dass vergleichbare Werte erhalten werden.

Für Aktivitätstests wurden die rekombinanten Proteine von PpRH1 und -2 in Enzym-Assays nach den zuvor beschriebenen Methoden eingesetzt. Für beide RH-Proteine wurde eindeutig Aktivität nachgewiesen. In den folgenden Abschnitten werden die ermittelten kinetischen Parameter im Detail beschrieben.

3.4.4 Ermittlung enzymkinetischer Parameter rekombinanter PpRHs

Nach erfolgreicher Gewinnung von heterolog exprimiertem PpRH1 und -2 Protein wurden die rekombinanten Proteine hinsichtlich ihrer enzymatischen Charakteristika analysiert. Hierfür wurden zunächst am Beispiel von PpRH1 die bevorzugten Reaktionsbedingungen bestimmt. Im Anschluss folgten Messungen zur Ermittlung des Substratspektrums für PpRH1 und -2.

3.4.4.1 Bestimmung der optimalen Reaktionsbedingungen für PpRH1

Zur genaueren Charakterisierung von PpRH1 wurde zunächst ermittelt, welches die bevorzugten Temperatur- und pH-Bedingungen darstellen.

3.4.4.1.1 Temperatur-Optimum von PpRH1

Das Temperatur-Optimum des rekombinanten PpRH1 Proteins wurde unter Verwendung des Parkin-Assays ermittelt. Inosin wurde als bevorzugtes Substrat von PpRH1 bestimmt und daher als Substrat für das Experiment ausgewählt (3.4.4.2). Jeder Reaktionsansatz enthielt ca. 6 μg rekombinantes PpRH1 Protein sowie Inosin mit einer Konzentration von 400 μM und wurde in Triplikaten vermessen. Die höchste Aktivität für PpRH1 wurde bei 35 °C gemessen (Abb. 3.8). Bei 40 °C waren noch 91 % der Aktivität vorhanden, während das Enzym bei 50 °C bereits 95 % seiner Aktivität verloren hatte. Eine Minderung der Temperatur auf 20 °C führte zu einer verbleibenden Aktivität von 46 % und bei nur 16 °C Reaktionstemperatur waren noch 30 % der Aktivität erhalten.

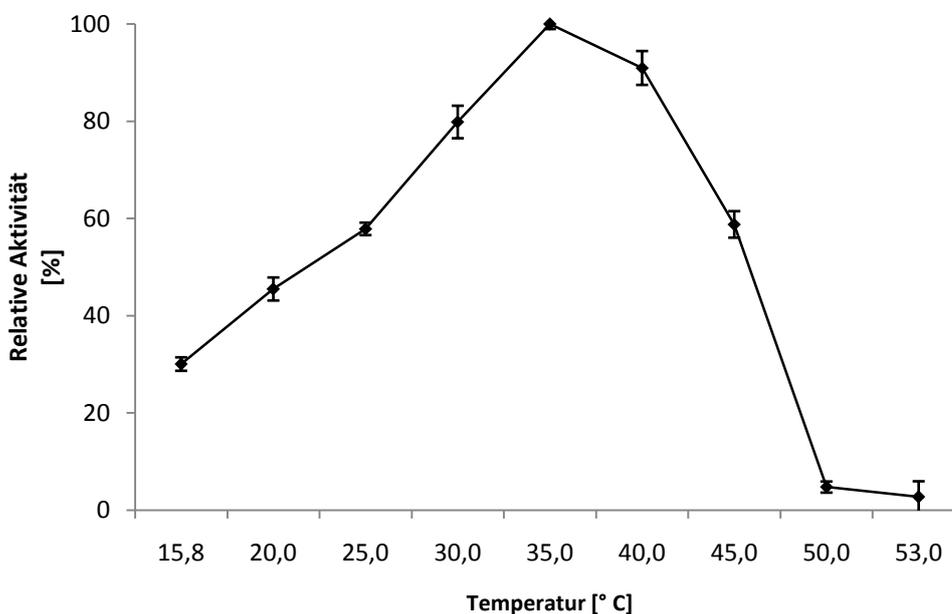


Abb. 3.8 Einfluss der Temperatur auf die katalytische Aktivität von PpRH1. Enzym-Assays nach Parkin (1996) wurden mit Inosin (400 μM) als Substrat bei einem konstanten pH von 7,5 in 1x TKD Puffer durchgeführt. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an ($n=3$).

3.4.4.1.2 pH-Optimum von PpRH1

Zur Messung der optimalen pH-Bedingungen für PpRH1 wurden Enzym-Assays mit Inosin als Substrat bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Hierfür wurden zwei verschiedene Puffersysteme

verwendet, um einen weiten pH-Bereich abzudecken: Für den Bereich von pH 3,5-8,0 wurde ein Citrat/Phosphatpuffer, für den Bereich von pH 7,5-10,0 ein Glycin/NaOH-Puffer verwendet. Die Ansätze (ca. 5 µg rekombinante PpRH1, Inosin 70 µM) wurden nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur mittels HPLC-Analyse ausgewertet (2.5). Der Parkin-Assay wurde für diesen Versuch nicht angewendet, da der molare Extinktionskoeffizient pH-abhängig ist und es daher zu Fehlern bei der anschließenden Auswertung kommen würde. Anhand der Menge an umgesetztem Inosin bzw. gebildetem Hypoxanthin wurde die spezifische Aktivität unter den jeweiligen pH-Bedingungen berechnet. Wie die Abb. 3.9 zeigt, liegt das pH-Optimum des rekombinanten PpRH1 Proteins bei 7,5-8,0 je nach verwendetem Puffer. Bei pH 5,5 konnte ein Aktivitätsminimum gemessen werden, das vermutlich darauf zurückzuführen ist, dass hier der isoelektrische Punkt des rekombinanten PpRH1 Proteins liegt (pI: 5,56). Bei pH 6,5 sind noch ca. 60 % der Aktivität zu messen wohingegen bei pH 8,5 ca. 90 % der Aktivität vorliegen. Geringe Aktivität konnte auch im sauren Bereich (pH < 5,5) gemessen werden (max. 30 %, Daten nicht gezeigt).

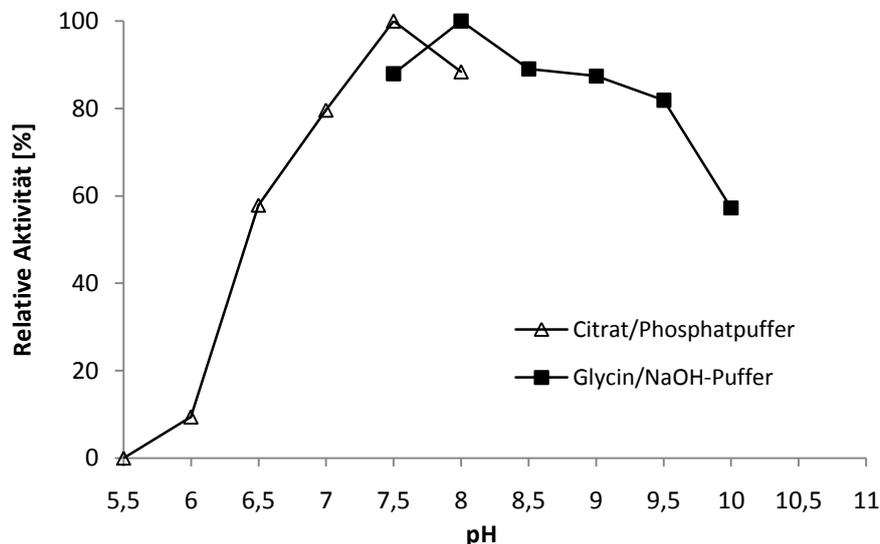


Abb. 3.9 Einfluss des pH-Wertes auf die katalytische Aktivität von PpRH1. Unter Verwendung von Inosin als Substrat (70 µM) wurden HPLC-basierte Enzym-Assays bei verschiedenen pH-Bedingungen, pH 3,5-8,0 Citrat/Phosphatpuffer und pH 7,5-10,0 Glycin/NaOH-Puffer, bei einer konstanten Temperatur von 20 °C durchgeführt. Daten für pH 3,5-5,5 sind nicht gezeigt.

3.4.4.2 Ermittlung des Substratspektrums von PpRH1 und -2

Zur Charakterisierung der RHs aus *Physcomitrella* und um erste Hinweise auf eine mögliche Bedeutung dieser Enzyme im pflanzlichen Stoffwechsel zu erhalten, wurde zunächst die Substratspezifität von PpRH1 und -2 am rekombinanten Protein untersucht. Hierfür wurde der spektrophotometrische Assay nach Parkin (1996) angewandt, bei dem die Änderung der Absorption bei einer Substrat-spezifischen Wellenlänge gemessen wird (2.4.11.1). Da für PpRH3 kein lösliches rekombinantes Protein erhalten wurde, blieb dieses von der Messung ausgeschlossen.

Die Bestimmung der apparenten Affinitätskonstante, des K_m Wertes, erfolgte durch Vermessung der initialen, über einen Zeitraum von 5-10 Minuten konstanten Geschwindigkeit bei 15-25 verschiedenen Substratkonzentrationen. Die Tab. 3.2 zeigt die kinetischen Konstanten, die für

PpRH1 und -2 ermittelt wurden. In Abb. 3.10 sind die resultierenden, hyperbolischen Michaelis-Menten-Kinetiken für PpRH1 am Beispiel der Substrate Inosin, Adenosin, Guanosin und Uridin gezeigt. Anhand eines Lineweaver-Burk-Diagramms, die reziproke Darstellung von Substratkonzentration und Reaktionsgeschwindigkeit, wurden die Werte für K_m und V_{max} abgeleitet. Zur Überprüfung der erhaltenen Werte wurde außerdem die Software GraFit Data Analysis Software Version 4.0 (Erithacus Software Ltd., East Grinstead, GB) verwendet.

Folgende Ergebnisse wurden dabei erhalten (Tab. 3.2): Inosin ist eindeutig das bevorzugte Substrat von PpRH1 mit einer maximalen katalytischen Aktivität von $100 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ und einer apparenten Affinitätskonstante von $82 \text{ }\mu\text{M}$. Danach folgen die Purine Adenosin und Guanosin, die eine geringere Affinität besitzen (101 bzw. $166 \text{ }\mu\text{M}$) und mit einer deutlich gesenkten Maximalgeschwindigkeit hydrolysiert werden (12 bzw. $5 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Ein weiteres, allerdings nur sehr schwach umgesetztes Substrat ist Uridin (K_m $1485 \text{ }\mu\text{M}$, V_{max} $53 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Für weitere Pyrimidine, Cytidin und Thymidin, wurde kein Umsatz gemessen. Letztere scheinen also keine Substrate für PpRH1 zu sein. Für Xanthosin sowie das Cytokinin Isopentenyladenosin (iPR) wurde ebenfalls Aktivität mittels eines HPLC-basierten Assays nachgewiesen (2.4.11.2).

Tab. 3.2 Kinetische Konstanten von PpRH1 und -2, die am rekombinanten Protein aus *E. coli* mittels eines spektrophotometrischen Assays nach Parkin (1996) ermittelt wurden.

Substrat	PpRH1			PpRH2		
	K_m [μM]	V_{max} [$\text{nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$]	V_{max}/K_m [relativ]	K_m [μM]	V_{max} [$\text{nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$]	V_{max}/K_m
Inosin	82	100	1,21 [100]	Aktivität n. d.		
Adenosin	101	12	0,11 [9,1]	Aktivität n. d.		
Guanosin	166	6	0,04 [3,3]	Aktivität n. d.		
Uridin	1485	53	0,03 [2,9]	1015	27	0,02
Xanthosin*	aktiv, K_m und V_{max} nicht bestimmt			aktiv, K_m und V_{max} nicht bestimmt		
iPR*	aktiv, K_m und V_{max} nicht bestimmt			aktiv, K_m und V_{max} nicht bestimmt		
Cytidin	Aktivität n. d.			Aktivität n. d.		
Thymidin	Aktivität n. d.			Aktivität n. d.		

* über einen HPLC-basierten Assay gemessen (2.4.11.2)

n. d. = nicht detektierbar, Aktivität entweder gar nicht zu messen oder $< 0,1 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$

aktiv = Aktivität $> 0,1 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$

Für V_{max}/K_m [relativ] wurde der für Inosin berechnete Wert = 100 % gesetzt

Die vorliegenden Daten zum Substratspektrum zeigen, dass es sich bei PpRH1 eindeutig um eine Purin-bevorzugende RH handelt, die aber auch in der Lage ist Pyrimidine sowie das Purin-Derivat iPR umzusetzen.

Für PpRH2 wurde insgesamt eine schwächere katalytische Aktivität gemessen. Für das Pyrimidin Uridin wurde ein K_m von $1015 \text{ }\mu\text{M}$ zusammen mit einer maximalen katalytischen Aktivität von $27 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ gemessen (Tab. 3.2). Schwache Aktivität wurde auch für das Purin Xanthosin sowie das Cytokinin iPR gemessen. Für alle weiteren, in Tab. 3.2 aufgeführten potentiellen Substrate wurde keine Aktivität gemessen. Nach dem dargestellten Datenstand handelt es sich somit bei PpRH2 - im Gegensatz zu PpRH1 - um eine Pyrimidin-bevorzugende RH.

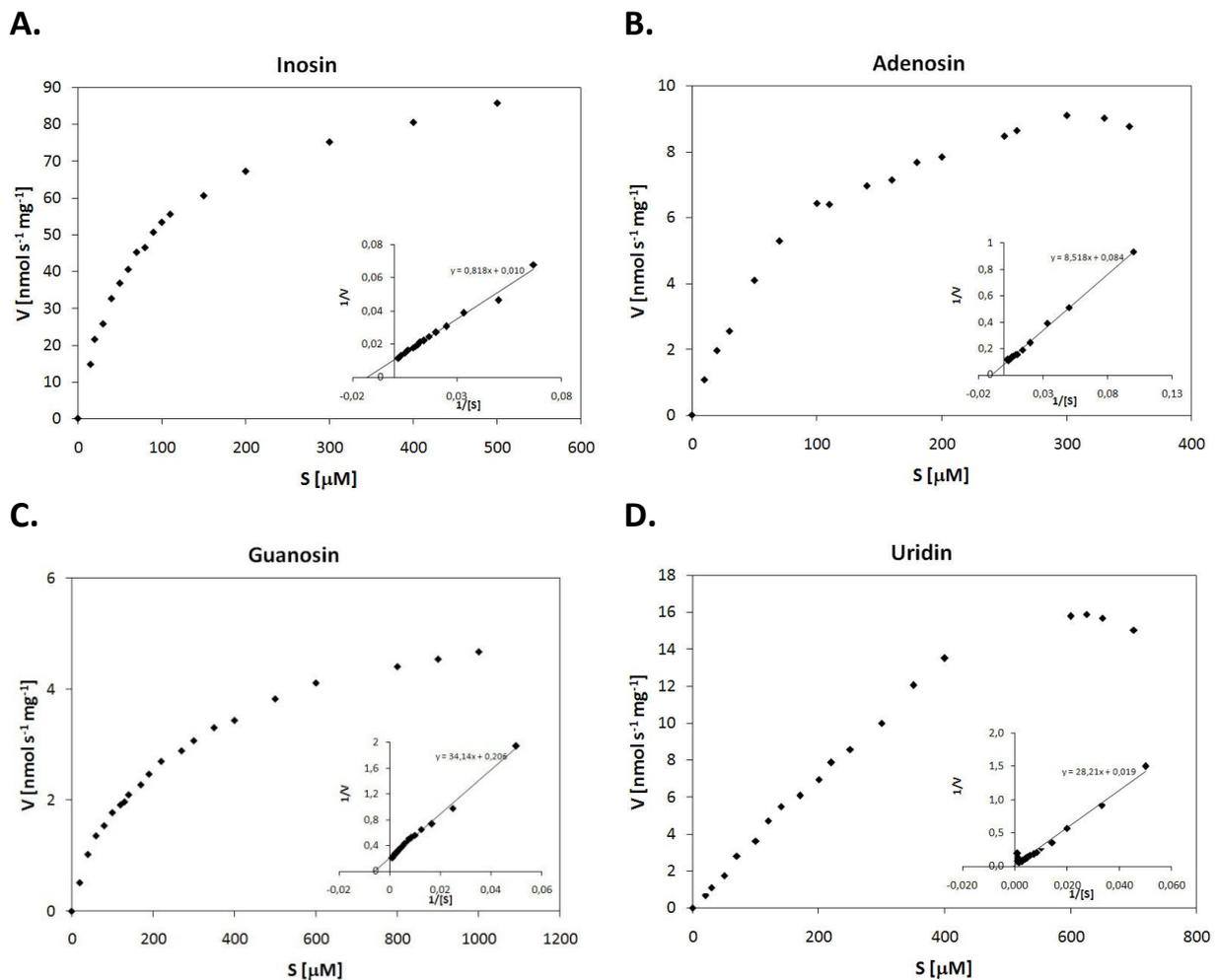


Abb. 3.10 Michaelis-Menten-Kinetik der PpRH1-Aktivität unter Verwendung der Substrate Inosin (A.), Adenosin (B.), Guanosin (C.) und Uridin (D.), eingefügt sind die zugehörigen Lineweaver-Burk-Diagramme. Rekombinantes PpRH1 Protein wurde durch Expression in *E. coli* erhalten und anschließend aufgereinigt. Mittels eines Enzym-Assays nach Parkin (1996) wurde der Effekt der Substratkonzentration auf die Hydrolyse der verwendeten Substrate gemessen. V = Reaktionsgeschwindigkeit [$\text{nmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$], S = Substratkonzentration [μM]. Es wurden drei unabhängige Bestimmungen durchgeführt, wobei hier ein repräsentatives Experiment dargestellt ist.

3.4.4.3 Einfluss von CaCl_2 auf die Enzym-Aktivität

Aus der Literatur ist bekannt, dass einige RHs Calcium-Bindungsstellen besitzen und zur Ausprägung ihrer Aktivität Calcium als Co-Faktor benötigen (z.B. Szuwart *et al.* 2006, Versées und Steyaert 2003). Aus diesem Grund wurden mit rekombinatem PpRH1 Protein Enzym-Assays unter Calcium-Zugabe durchgeführt (Substrat: Inosin, $150 \mu\text{M}$) um zu testen, ob dieses einen Einfluss auf die Hydrolyse des Substrates hat. Die Auswertung der Assays erfolgte *via* HPLC (2.4.11.2). In Enzym-Assays wurde Calciumchlorid in Konzentrationen von 10, 100 sowie $1000 \mu\text{M}$ verwendet. Dies entsprach einem molaren Verhältnis von Ca^{2+} -Ionen zu Protein-Molekülen von 5000, 50.000 bzw. 500.000. Es konnte weder eine Steigerung noch eine Minderung der Aktivität nach Calcium-Addition gemessen werden (Abb. 3.11). Allerdings konnte eine Reduktion der Aktivität nach Zugabe von EDTA bzw. EGTA festgestellt werden, wobei die Reduktion unabhängig von der Konzentration stärker nach Addition von EDTA war (ca. 10 % Rest-Aktivität bei Zugabe von EDTA, ca. 30 % Rest-Aktivität bei Zugabe von EGTA). EDTA und EGTA sind beides Komplexbildner, die Chelatkomplexe mit 2-wertigen Kationen

eingehen. Die Reduktion der Aktivität nach Zugabe dieser Substanzen lässt vermuten, dass PpRH1 Co-Faktoren in Form von 2-wertigen Kationen zur Erlangung der vollständigen Aktivität benötigt. Ob es sich dabei um Calcium oder andere 2-wertige Kationen wie Magnesium handelt, kann anhand dieser Daten nicht festgestellt werden.

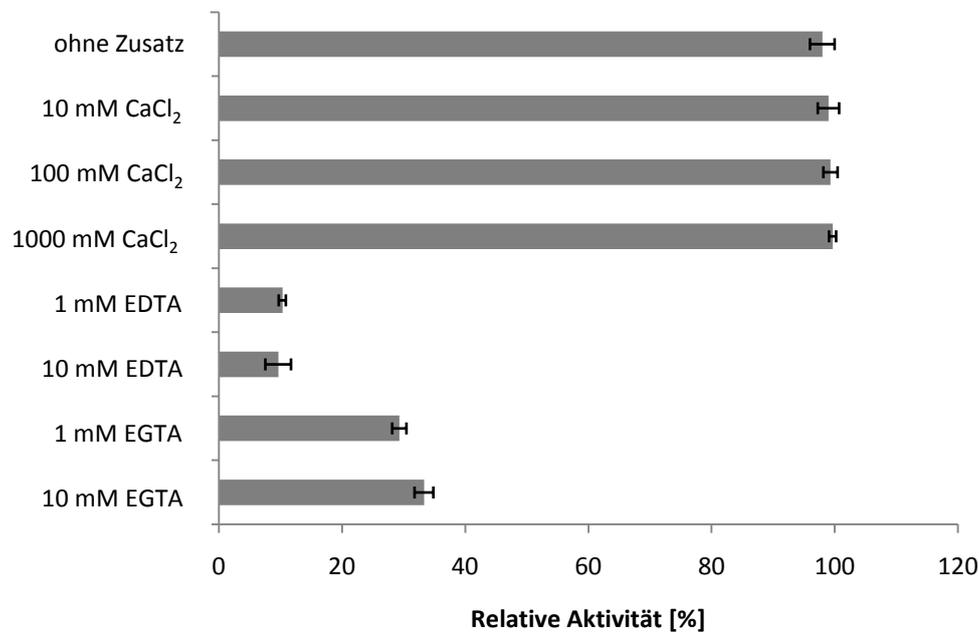


Abb. 3.11 Einfluss von Calcium, EDTA und EGTA auf die Aktivität von PpRH1 unter Verwendung von Inosin als Substrat. Enzym-Assays wurden per HPLC vermessen. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an (n=3).

3.4.4.4 Test auf Heterodimerbildung

Aufgrund der - im Vergleich zu PpRH1 - relativ schwachen Aktivität von PpRH2 an den getesteten Substraten, wurde die Möglichkeit einer Heterodimerbildung aus PpRH1 und PpRH2 in Betracht gezogen. Hierfür wurden die Aktivität von PpRH1 und PpRH2 an den Substraten Inosin, Adenosin, Guanosin und Uridin zunächst einzeln und dann im Mischungsverhältnis 1:1, 1:2 und 2:1 mittels des Parkin-Assays verglichen. Außerdem wurden Kontrollreaktionen mit BSA durchgeführt, bei denen PpRH1 mit BSA statt mit PpRH2 in den zuvor genannten Mischungsverhältnissen gemischt wurde (Daten nicht gezeigt). Auf diesem Weg sollte eine unspezifische Beeinflussung der Aktivität ausgeschlossen werden. Für keines der genannten Substrate konnte eine gesteigerte Aktivität bei Verwendung der Enzym-Mixtur aus PpRH1 und PpRH2 gemessen werden (Abb. 3.12). Allerdings konnte eine schwache Reduktion der PpRH1-Aktivität nach Mischung mit PpRH2 beobachtet werden. Diese Hemmung war bei den Kontrollansätzen mit BSA nicht zu beobachten. Demnach kann eine Aktivitätssteigerung durch Heterodimerbildung aus PpRH1 und -2 unter diesen Bedingungen als unwahrscheinlich angesehen werden. Dennoch deuten die Ergebnisse auf eine mögliche Interaktion zwischen PpRH1 und -2 hin, die sich nicht aktivitätssteigernd sondern aktivitätshemmend auf PpRH1 auswirkt.

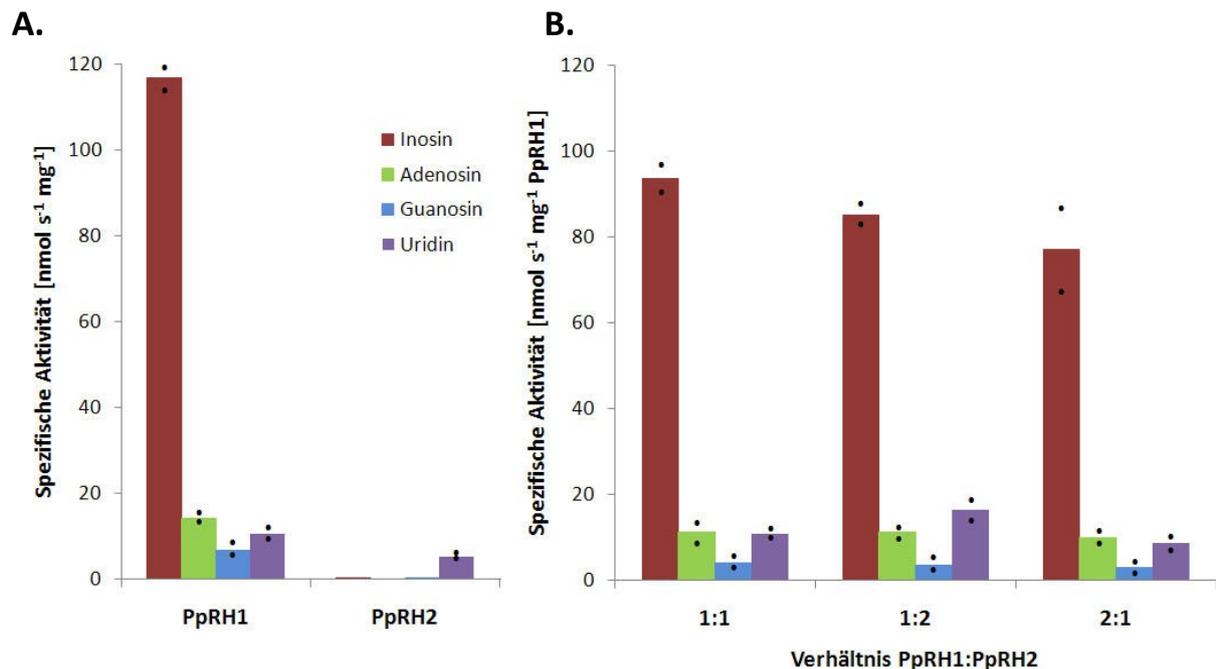


Abb. 3.12 Test auf Aktivitätsänderung bei Mischung von rekombinantem PpRH1 und PpRH2 Protein. Heterolog überexprimierte RH Proteine wurden hinsichtlich ihrer Aktivität an den Purinen Inosin, Adenosin, Guanosin und dem Pyrimidin Uridin einzeln und in den molaren Mischungsverhältnissen 1:1; 1:2 sowie 2:1 getestet. Für Aktivitätsmessungen wurde ein spektrophotometrischer Assay nach Parkin (1996) verwendet. (A.): Spezifische Aktivität je mg Protein. (B.): Spezifische Aktivität je mg PpRH1. Dargestellt sind Mittelwerte, die Werte der beiden Einzelmessungen sind als Punkte dargestellt.

3.5 Studien zur subzellulären Lokalisierung von PpRHs

Vorhersagen zur Lokalisierung der selektierten RHs aus *Physcomitrella* wurden mit den Programmen TargetP und MultiLoc getroffen (2.12.2). Die Ergebnisse zeigen, dass eine Lokalisierung im Cytoplasma für alle PpRH Proteine am wahrscheinlichsten ist. Das Programm TargetP berechnete für alle PpRHs sehr geringe Wahrscheinlichkeiten für das Vorhandensein von Signalsequenzen zur Einschleusung in Chloroplasten, Mitochondrien oder in den sekretorischen Weg und gibt als Zuordnung „Anderes Kompartiment“ an. Über MultiLoc wurden Scores von 0,95 (PpRH3), 0,96 (PpRH1) und 0,98 (PpRH2) für eine Lokalisierung im Cytoplasma erhalten, die nach bioinformatischen Kriterien eindeutig für eine Lokalisierung im Cytoplasma sprechen.

Die *in planta* Untersuchung der subzellulären Lokalisierung der RHs aus *Physcomitrella* erfolgte in Protoplasten, die aus *Physcomitrella* isoliert wurden. Der für die Lokalisierungsstudien ausgewählte Vektor pLNU-GFP enthält GFP unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors aus *Zea mays*. Die ORFs von PpRH1, -2 und -3 wurden mit Pfu-Polymerase mit den Primern 424/425, 426/427 bzw. 428/429 (Tab. 2.3) amplifiziert und über die Schnittstellen von XbaI und HindIII in den Vektor pLNU-GFP *in frame* mit GFP ligiert. Nach Transformation in *E. coli*, Selektion der positiven Klone und anschließender Sequenzierung der Konstrukte, erfolgte die transiente Expression in *Physcomitrella*. Hierfür wurden Protoplasten aus *Physcomitrella* Wildtyp isoliert (2.2.6) und nach dem unter 2.2.7 beschriebenen Protokoll transformiert. Als Kontrolle wurde der „leere“ Vektor pLNU-GFP verwendet. Die Auswertung erfolgte nach sechs Tagen am Konfokal-Lasermikroskop (2.9). Die Fluoreszenzsignale der PpRH-GFP-Fusionsproteine waren hauptsächlich im Cytoplasma zu finden (Abb. 3.13). *In silico*

Vorhersagen und experimentelle Daten zeigen somit übereinstimmend, dass PpRH1, -2 und -3 im Cytoplasma lokalisiert sind.

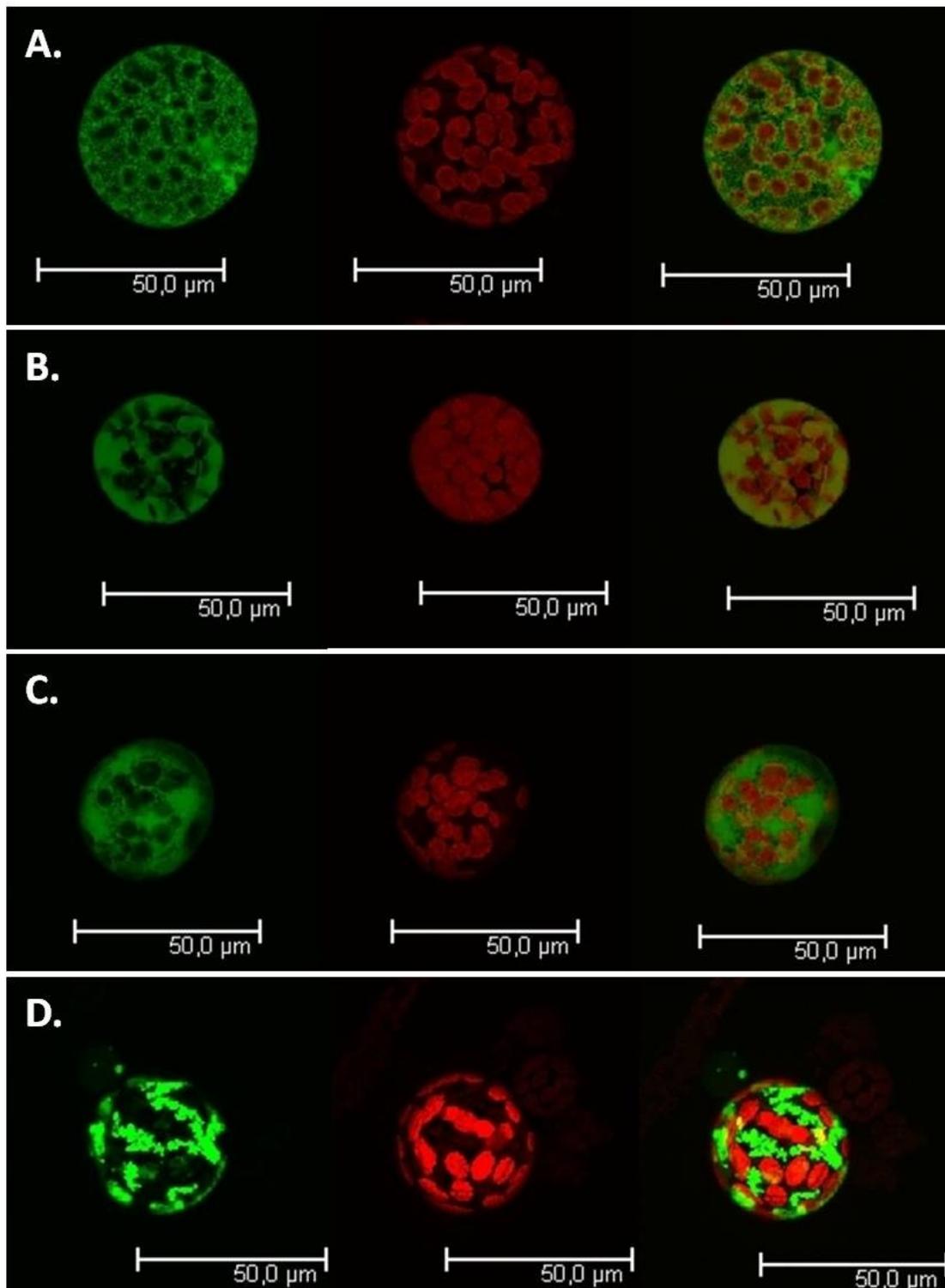


Abb. 3.13 GFP-Lokalisierungsstudien von PpRH1, -2 und -3 durch transiente Expression in Protoplasten von *Physcomitrella*. (A.). Kontrolle (pLNU-GFP); (B.): pLNU-GFP_PpRH1; (C.): pLNU-GFP_PpRH2; (D.): pLNU-GFP_PpRH3. Links ist die GFP-Fluoreszenz, in der Mitte die Autofluoreszenz des Chlorophylls und rechts die Überlagerung beider Fluoreszenz-Signale abgebildet. Aufnahmen wurden am Konfokal-Lasermikroskop sechs Tage nach der Transformation gemacht.

Parallel durchgeführte Lokalisierungsstudien in Epidermiszellen von *A. cepa* (2.10) bestätigten ebenfalls, dass PpRH1, -2 und -3 im Cytoplasma lokalisiert sind und kein Signalpeptid zum Transport in ein anderes Zellkompartiment besitzen (Daten nicht gezeigt).

Die *in silico* vorhergesagte cytoplasmatische Lokalisierung von PpRH1, -2 und -3 wurde somit in zwei Modellsystemen auch *in planta* bestätigt.

3.6 Gezielter *knockout* von *PpRH1*, -2 und -3 in *Physcomitrella*

Zur Aufklärung von Funktion und Bedeutung von RHs im pflanzlichen Stoffwechsel, wurden *single-knockout* Pflanzen für alle drei Mitglieder der *RH*-Genfamilie generiert. Der *knockout* der betreffenden *RH* wurde auf genomischer Ebene nachgewiesen, sowie die Abwesenheit des jeweiligen *RH*-Transkriptes bestätigt. Außerdem wurden einzelne *knockout* Linien hinsichtlich der verbleibenden *RH*-Aktivität analysiert. *In vivo* Markierungsexperimente wurden durchgeführt, um Auswirkungen auf den Purin- und Cytokininstoffwechsel zu messen. Anhand von LC-MS/MS-Analysen wurden Veränderungen im Profil von Purinen und Pyrimidinen untersucht.

3.6.1 Herstellung von *PpRH*-*knockout* Linien

Gene targeting über den Mechanismus der homologen Rekombination erfolgt in *Physcomitrella* mit ungewöhnlich hoher Frequenz (Kamisugi und Cuming 2005). Die hierfür verwendeten *knockout*-Vektoren müssen dafür einen Resistenzmarker enthalten, der von zwei ca. 1000 bp großen genomischen Fragmenten des zu treffenden Locus flankiert wird, über die mittels homologer Rekombination dann die Integration der „Resistenzkassette“ und der damit verbundene *knockout* des betreffenden Gens erfolgt.

Zum *knockout* der *RH*-Gene wurden zunächst entsprechende *knockout*-Vektoren konzipiert und kommerziell hergestellt. Für *PpRH1* wurde der Vektor pBNR (Tab. 2.2) ausgewählt, der später in Pflanzen eine Selektion über Geneticin (G418) erlaubt. Aus genomischer DNA vom Wildtyp wurde mit den Primern 389/390 (Tab. 2.3) ein 1057 bp-Fragment aus dem 5'-Bereich, mit den Primern 393/394 (Tab. 2.3) ein 1014 bp-Fragment aus dem 3'-Bereich des Locus amplifiziert. Die erhaltenen Fragmente wurden nach ihrer Aufreinigung per PCR mit den für die Klonierung in pBNR benötigten Schnittstellen versehen (Fragment aus 5'-Bereich: *MluI* und *SpeI*, Primer 391/392; Fragment aus 3'-Bereich: *BsiWI* und *XbaI*, Primer 395/396, Tab. 2.3) und in den entsprechend vorbereitenden Vektor nacheinander ligiert. Der durch Sequenzierung überprüfte Vektor pBNR_PpRH1-KO wurde dann zur Transformation in *Physcomitrella* verwendet.

Die Vektoren pBHR bzw. pBZR (Tab. 2.2), die für den *knockout* des *PpRH2*- bzw. *PpRH3*-Gens ausgewählt wurden, vermitteln Resistenz gegenüber Hygromycin bzw. Zeocin. Analog wie für *PpRH1* zuvor beschrieben, wurden zunächst die genomischen Fragmente amplifiziert. Für *PpRH2* wurden hierfür die Primer 407/408 (Tab. 2.3) für das Fragment aus dem 5'-Bereich (1127 bp), Primer 411/412 (Tab. 2.3) für das Fragment aus dem 3'-Bereich (1045 bp) verwendet. In einer anschließenden PCR mit den Primern 409/410 bzw. 413/414 (Tab. 2.3) wurden die Schnittstellen zur Klonierung in den Vektor pBHR an die Fragmente angehängt (Fragment aus dem 5'-Bereich: *HindIII* und *XhoI*; Fragment aus dem 3'-Bereich: *BamHI* und *MluI*) und anschließend in den präparierten Vektor ligiert. Für *PpRH3* wurden genomische Fragmente mit den Primern 415/416 (5'-Bereich, 1082 bp, Tab. 2.3) bzw. 419/420 (3'-Bereich, 1005 bp) amplifiziert. Die erhaltenen Fragmente wurden nach Aufreinigung

über eine zweite PCR mit den für die Klonierung in pBZR benötigten Schnittstellen versehen (Primer 417/418 mit *SphI*- und *XhoI*-Schnittstelle bzw. Primer 421/422 mit *EagI*- und *MluI*-Schnittstelle, Tab. 2.3) und anschließend in den entsprechend vorbereitenden Vektor nacheinander ligiert. Die erhaltenen Konstrukte, pBHR_PpRH2-KO und pBZR_PpRH3-KO, wurden für die PEG-vermittelte Transformation von *Physcomitrella* Protoplasten genutzt.

Zur Transformation in Protoplasten wurde lineare DNA aller drei Konstrukte verwendet, wobei aus pBNR_PpRH1-KO mit *XbaI* und *MluI* und aus pBHR_PpRH2-KO und pBZR_PpRH3-KO mit *HindIII* und *MluI* die „*RH-knockout*-Kassette“ aus dem Vektor ausgeschnitten wurde. Die Transformation und anschließende Selektion von *RH-knockout* Pflanzen erfolgte nach der unter 2.2.7 beschriebenen Methode. Für jeden Locus wurden ca. 15-20 stabile Linien, d.h. solche die drei Selektionszyklen überlebten, erhalten.

3.6.2 Molekulare Analyse der *PpRH-knockout* Linien

Zur Identifizierung von *RH-single-knockout* Linien auf molekularer Ebene wurde genomische DNA aus stabilen Transformanten isoliert und per PCR analysiert. Details zum Nachweis der Transgenese werden im Folgenden für *PpRH1*-, *PpRH2*- und *PpRH3-knockout* Pflanzen beschrieben.

3.6.2.1 Identifizierung von *PpRH1-knockout* Linien auf genomischer Ebene

Aus 12 stabilen *PpRH1-knockout* Pflanzen wurde genomische DNA isoliert und mittels PCR das Vorhandensein der Resistenzmarkers im genomischen Locus nachgewiesen. Mit der Primerkombination 436/82 (Tab. 2.3) wurde die erfolgreiche 5'-, mit den Primern 80/438 (Tab. 2.3) die erfolgreiche 3'-Integration der Resistenzkassette in den *PpRH1* Locus gezeigt. Das PCR-Ergebnis für die Linien *PpRH1-KO* #23, #26, #28 und #29 ist in Abb. 3.14 zu sehen. Für alle gezeigten Linien wurden die PCR-Produkte 1 und 2 erhalten, die die vollständige Integration der *NPTII*-Resistenzkassette in den genomischen Locus von *PpRH1* belegen. Die Sequenzierung der erhaltenen PCR-Produkte bewies außerdem, dass die Amplifikate die erwarteten Sequenzabschnitte aus dem genomischen *PpRH1* Locus sowie Teile des *NPTII*-Gens enthielten. Die Linien *PpRH1-KO* #23, #26, #28 und #29 wurden als bestätigte *PpRH1-knockout* Linien eingestuft und für weitere Analysen verwendet.

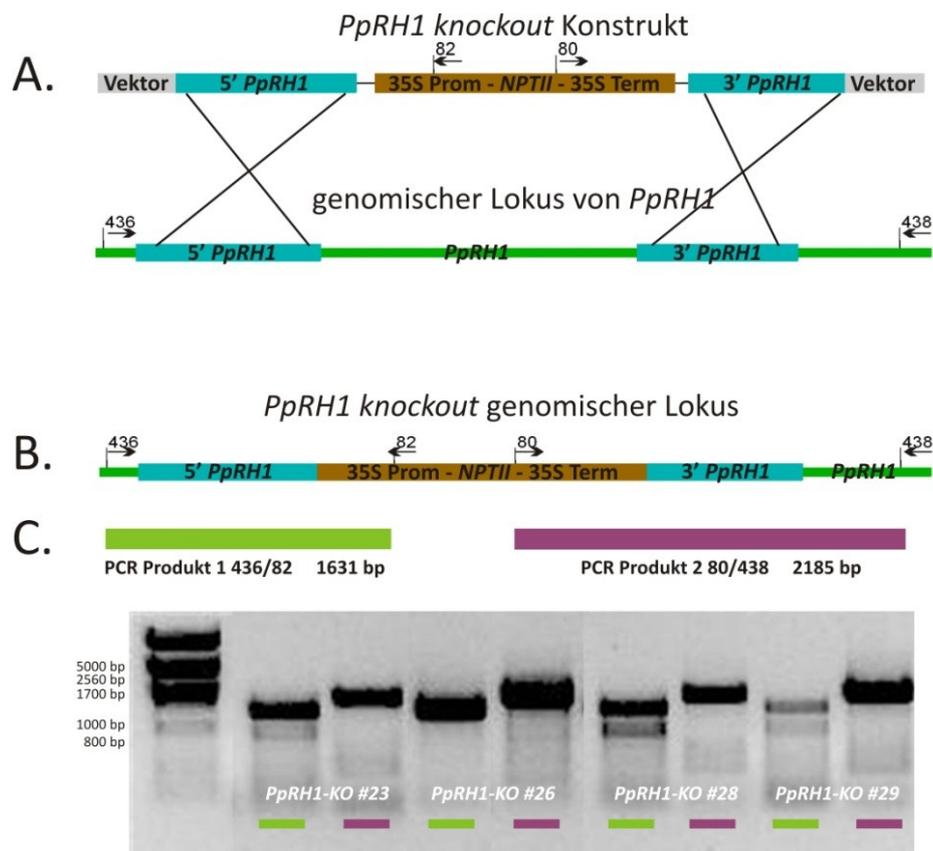


Abb. 3.14 Schematische Integration der *NPTII*-Resistenzkassette in den *PpRH1* Locus und molekulare Analyse von *PpRH1*-knockout Mutanten. (A.): Mechanismus der homologen Rekombination zur Zerstörung des genomischen *PpRH1* Locus über die Integration des *NPTII*-Gens in *PpRH1*. (B.): Schematische Rekonstruktion des *PpRH1* Locus in *PpRH1*-knockout Mutanten. (C.): PCR-Ergebnisse der genomischen DNA-Analyse zum molekularen Nachweis der erfolgreichen 5'- und 3'-Integration des *PpRH1*-knockout-Konstruktes in vier Mutanten Linien. Der genomische Locus von *PpRH1* ist in grün, Sequenzabschnitte von *PpRH1*, die zur homologen Rekombination verwendet wurden, sind in blau, die *NPTII*-Resistenzkassette in braun dargestellt.

3.6.2.2 Identifizierung von *PpRH2*-knockout Linien auf genomischer Ebene

Zum Nachweis der genetischen Veränderung in *PpRH2*-knockout Mutanten, wurde genomische DNA aus 10 stabilen Linien isoliert und diese über PCR analysiert. Die angewandte PCR-Strategie ist in Abb. 3.15 zu sehen. Über zwei verschiedene PCR-Produkte wurde die Integration des Resistenzmarkers (*HPH*) in den genomischen Locus von *PpRH2* überprüft; PCR-Produkt 1, erhalten mit den Primern 496/497 (Tab. 2.3), zeigte die erfolgreiche Integration im 5'-Bereich von *PpRH2*, während das mit den Primern 498/499 (Tab. 2.3) amplifizierte PCR-Produkt 2 den Nachweis für die Integration im 3'-Bereich lieferte. Wie aus Abb. 3.15 deutlich wird, wurden für die Linien *PpRH2*-KO#3, #13, #52 und #56 beide PCR-Produkte erhalten. Die im Anschluss vorgenommene Sequenzierung der PCR-Produkte bestätigte ebenfalls die genetische Veränderung des *PpRH2* Locus. Die Linie #27 zeigte hingegen lediglich eine erfolgte Integration im 3'-Bereich von *PpRH2*. Daher wurde davon ausgegangen, dass in diesem Fall kein vollständiger Austausch des Gens erfolgte, sondern die *PpRH2*-knockout-Kassette lediglich im 3'-Bereich in den Locus integriert wurde. Diese Linie wurde von der weiteren Charakterisierung ausgeschlossen. Die Mutanten *PpRH2*-KO#3, #13, #52 und #56 können hingegen als verifizierte *PpRH2*-KO Linien eingestuft werden und wurden daher in die folgenden Analysen einbezogen.

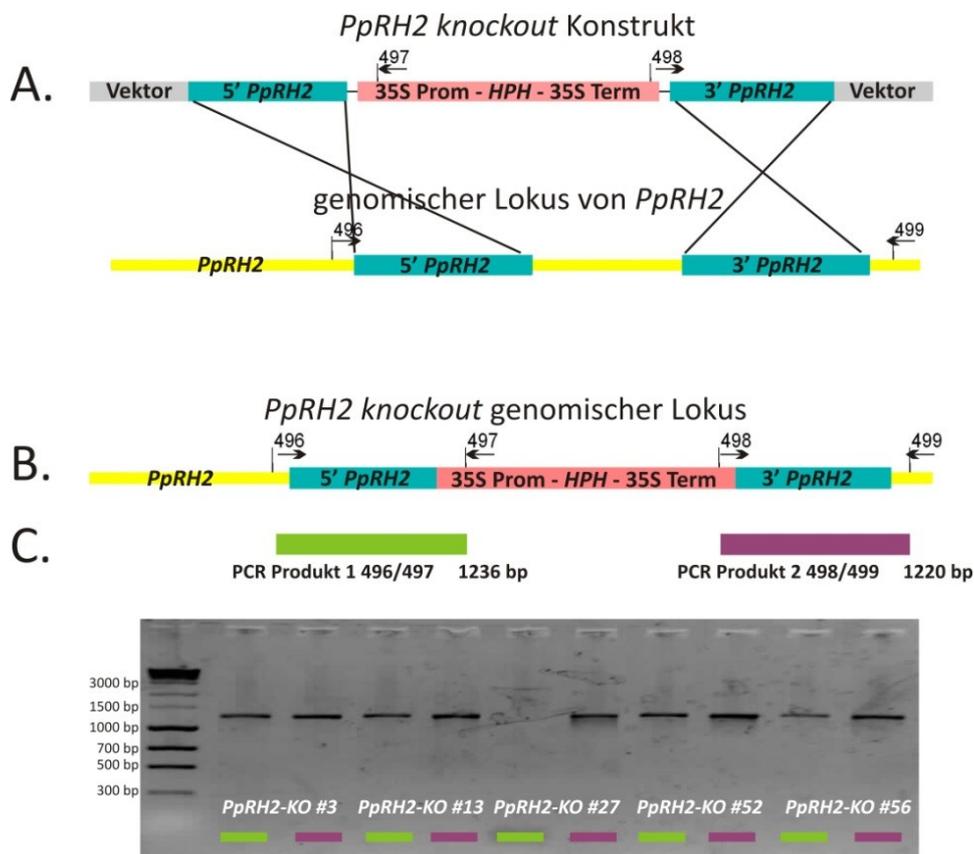


Abb. 3.15 Schematische Integration der *HPH*-Resistenzkassette in den *PpRH2* Locus und molekulare Analyse von *PpRH2*-knockout Mutanten. (A.): Mechanismus der homologen Rekombination zur Zerstörung des genomischen *PpRH2* Locus über die Integration des *HPH*-Gens in *PpRH2*. (B.): Schematische Rekonstruktion des *PpRH2* Locus in *PpRH2*-knockout Mutanten. (C.): PCR-Ergebnisse der genomischen DNA-Analyse zum molekularen Nachweis der erfolgreichen 5'- und 3'-Integration des *PpRH2*-knockout-Konstruktes in fünf Mutanten Linien. Der genomische Locus von *PpRH2* ist in gelb, Sequenzabschnitte von *PpRH2*, die zur homologen Rekombination verwendet wurden, sind in blau, die *HPH*-Resistenzkassette in rosa dargestellt.

3.6.2.3 Identifizierung von *PpRH3*-knockout Linien auf genomischer Ebene

Nach Selektion putativer *PpRH3*-knockout Linien sollte ebenfalls der Nachweis der Transgenese auf molekularer Ebene erfolgen. Hierfür wurde genomische DNA aus 10 stabilen *PpRH3*-KO Linien isoliert und mittels PCR überprüft. Über die PCR-Produkte 1 (Primer 501/502, Tab. 2.3) und 2 (Primer 503/504, Tab. 2.3) sollte zum einen die Anwesenheit der *BLE*-Resistenzkassette, zum anderen die erfolgreiche 5'- bzw. 3'-Integration im *PpRH3* Locus nachgewiesen werden (Abb. 3.16). Die dargestellte PCR-Analyse der Linien *PpRH3*-KO #7, #8, #13, #23 sowie #25 zeigte, dass bei diesen fünf Linien die 5'- sowie die 3'-Integration erfolgreich war und der native *PpRH3* Locus durch die Insertion der Resistenzkassette zerstört wurde. Durch Sequenzierung der erhaltenen Amplifikate wurde die Transgenese nochmals bestätigt. Für den Locus *PpRH3* wurden somit die Linien *PpRH3*-KO #7, #8, #13, #23 sowie #25 als bestätigte *knockout* Linien eingestuft.

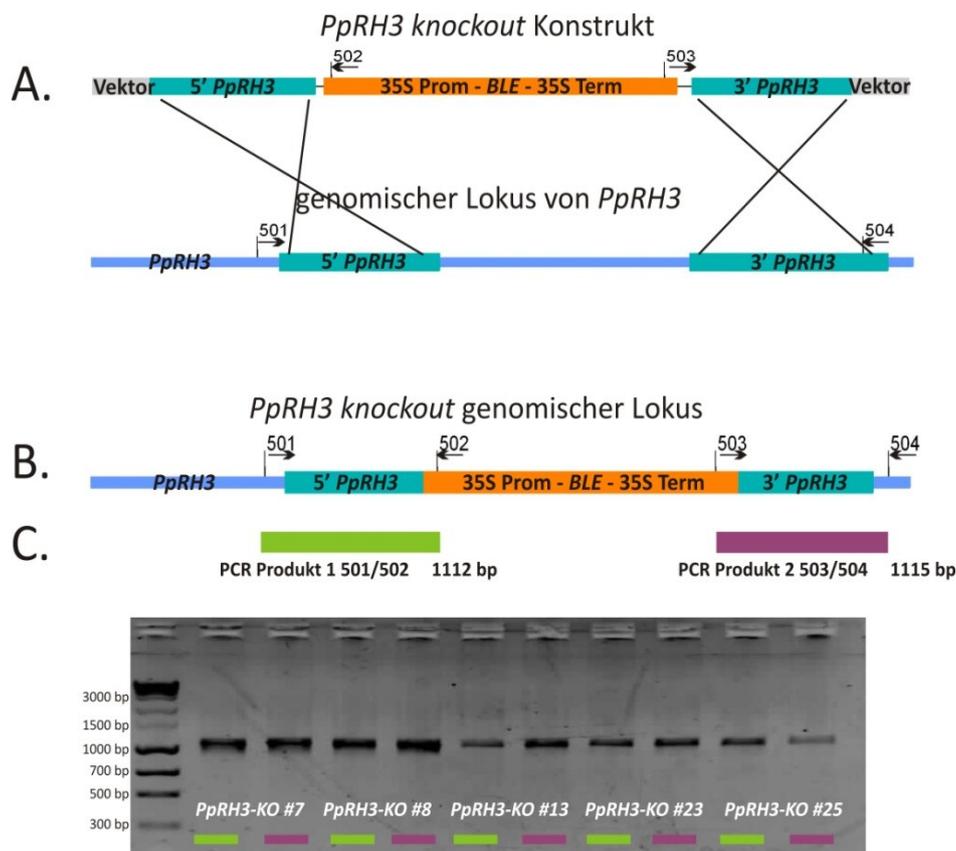


Abb. 3.16 Schematische Integration der *BLE*-Resistenzkassette in den *PpRH3* Locus und molekulare Analyse von *PpRH3*-knockout Mutanten. (A.): Mechanismus der homologen Rekombination zur Zerstörung des genomischen *PpRH3* Locus über die Integration des *BLE*-Gens in *PpRH3*. (B.): Schematische Rekonstruktion des *PpRH3* Locus in *PpRH3*-knockout Mutanten. (C.): PCR-Ergebnisse der genomischen DNA-Analyse zum molekularen Nachweis der erfolgreichen 5'- und 3'-Integration des *PpRH3*-knockout-Konstruktes in fünf Mutanten Linien. Der genomische Locus von *PpRH3* ist in hellblau, Sequenzabschnitte von *PpRH3*, die zur homologen Rekombination verwendet wurden, sind in blau, die *BLE*-Resistenzkassette in orange dargestellt.

3.6.2.4 Messungen des Ploidiegrades und morphologische Vergleiche von *PpRH*-knockout Linien

Wie von Schween *et al.* (2005) beschrieben, kommt es bei *Physcomitrella* regelmäßig nach der Transformation von Protoplasten durch Protoplastenfusionen bei einem Teil der regenerierenden Pflanzen zu einer Änderung des Ploidiegrades. Die Änderung des Ploidiegrades kann als Folge auch zu morphologischen Veränderungen führen. Daher bestand die Notwendigkeit vor der weiteren Charakterisierung, die Ploidie der generierten *knockout* Pflanzen zu messen.

Mittels Durchflusszytometrie wurden die Haploidie aller analysierten *knockout* Pflanzen eindeutig nachgewiesen (Abb. 3.17). Haploide Pflanzen, wie der Wildtyp sowie die *knockout* Linien *PpRH1*-KO #29, *PpRH2*-KO #56 und *PpRH3*-KO #7, zeigten einen Hauptpeak bei 50, während bei diploiden Pflanzen der Hauptpeak bei 100 lag (nicht gezeigt). *Knockout* Linien mit einem veränderten Ploidiegrad wurden von der weiteren Charakterisierung ausgeschlossen.

Außerdem wurden die Transformanten hinsichtlich möglicher morphologischer Veränderungen untersucht. Mikroskopische Untersuchungen des Protonemas sowie der Gametophoren von unter Standardbedingungen gewachsenen Kulturen zeigten aber keine erkennbaren Veränderungen (Abb. 3.17, Gametophoren nicht gezeigt).

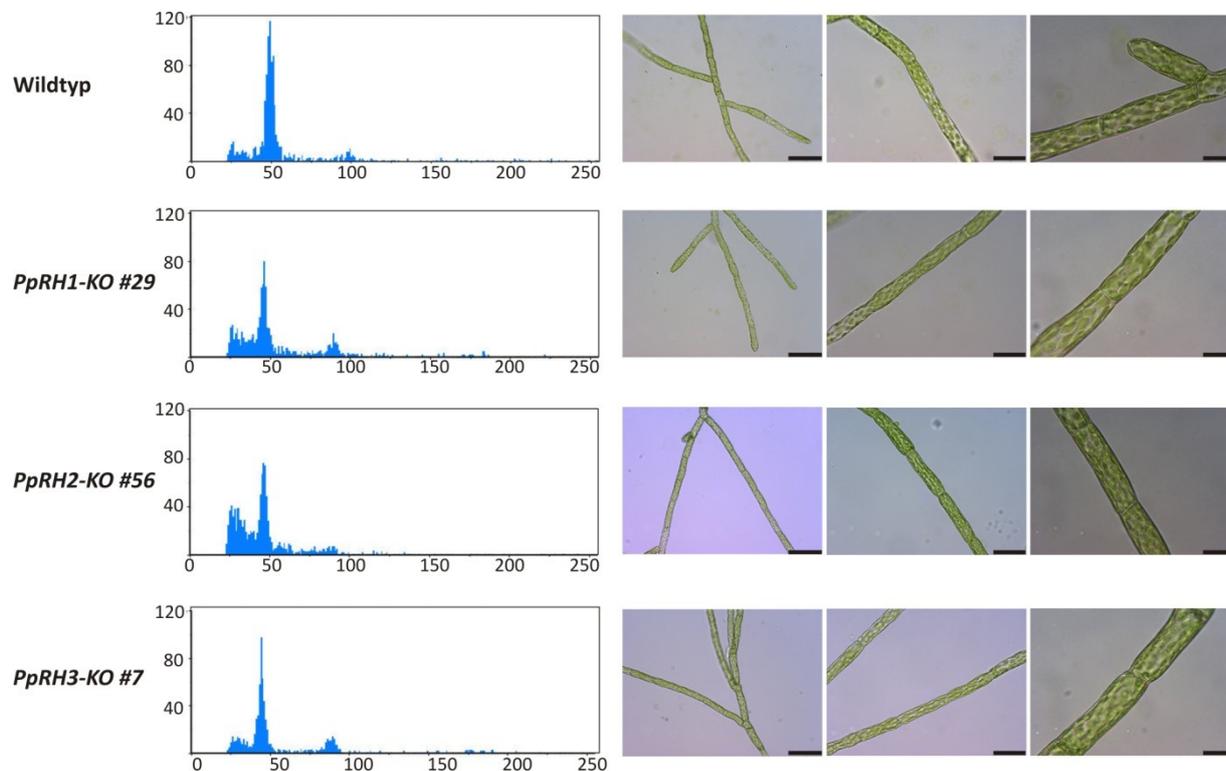


Abb. 3.17 Ploidie-Messung und morphologische Untersuchung von *PpRH*-knockout Pflanzen. Links sind Durchflusszytometrie-Histogramme von Wildtyp, *PpRH1-KO #29*, *PpRH2-KO #56* und *PpRH3-KO #7* gezeigt. Auf der x-Achse ist die relative Fluoreszenzintensität, auf der y-Achse sind die gezählten Fluoreszenzereignisse dargestellt. Rechts sind lichtmikroskopische Aufnahmen des Protonemas von Wildtyp, *PpRH1-KO #29*, *PpRH2-KO #56* und *PpRH3-KO #7* gezeigt. Die Aufnahmen wurden von fünf Tage alten, unter Standardbedingungen gewachsenen Kulturen gemacht. Die eingefügten Maßstabballen entsprechen 100, 50 bzw. 20 μm (von links nach rechts).

3.6.2.5 Molekulare Analyse der *PpRH*-knockout Linien auf Transkript-Ebene

Neben dem Nachweis der Transgenese auf genomischer Ebene sollte außerdem die Abwesenheit des jeweiligen *RH*-Transkriptes bestätigt werden. Dazu wurde aus sieben Tage alten unter Standardbedingungen gewachsenen Kulturen der *knockout* Linien RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. RT-PCR Experimente wurden unter Verwendung von *PpRH* spezifischen Primern (*PpRH1*: 536/537; *PpRH2*: 488/489; *PpRH3*: 404/405, Tab. 2.3) durchgeführt. Als Kontrolle der RNA-Extraktion sowie der durchgeführten RT-Reaktion wurde parallel die Anwesenheit des konstitutiv exprimierten *PpACT3* Gens mit den Primern 214/215 (Tab. 2.3) untersucht. Das Primerpaar 488/489, das zur Transkript-Analyse der *PpRH2*-knockout Linien verwendet wurde, bindet in einem Bereich von *PpRH2*, der in den *knockout* Linien durch Insertion der *HPH*-Resistenzkassette ersetzt wurde. Daher wurden für diese Ansätze keine „RT minus“-Reaktionen durchgeführt.

Wie Abb. 3.18 zeigt, wurde die erwartete Abwesenheit des jeweiligen *PpRH*-Transkriptes für die *PpRH1-knockout* Linien #29, #26, #28 und #23, für die *PpRH2-knockout* Linien #52 und #56 sowie für die *PpRH3-knockout* Linien #7, #8 und #13 über RT-PCR mit *PpRH*-spezifischen Primern nachgewiesen. Dies bestätigt den *knockout* für die genannten Linien auch auf der Ebene des jeweiligen *RH*-Transkriptes.

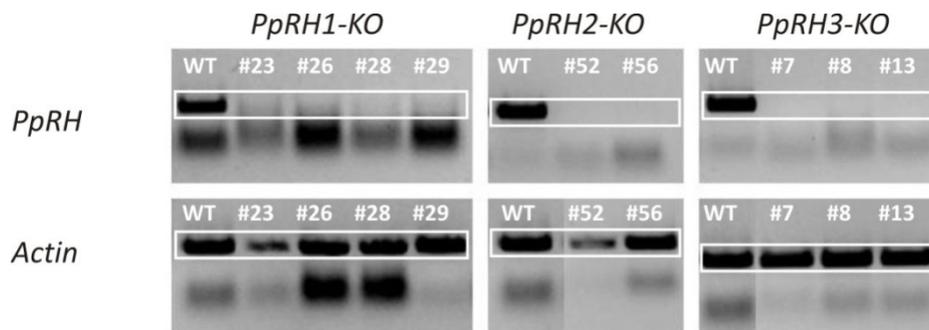


Abb. 3.18 Expressionsanalyse der *PpRH-KO* Linien. RT-PCR Experimente wurde mit spezifischen Primern für das jeweilige *RH*-Gen durchgeführt (oben, *PpRH1*: 536/537; *PpRH2*: 488/489; *PpRH3*: 404/405, Tab. 2.3). Als Positivkontrolle wurde parallel die Expression des konstitutiv exprimierten *PpACT3*-Gens analysiert (Mitte). „RT minus“-Reaktionen zeigten, dass keine Kontamination mit genomischer DNA vorlag (Daten nicht gezeigt). Banden im unteren Bereich der Gele sind durch Primerdimerbildung verursacht.

3.6.3 *In vitro* RH-Aktivität bei *PpRH1-KO #29*

Zur Bestätigung einer veränderten RH-Aktivität bei der Mutante *PpRH1-KO #29* wurden *in vitro* Enzym-Assays mit Inosin, dem Hauptsubstrat von PpRH1, durchgeführt. Hierfür wurden zunächst Proteinextrakte aus Moosgewebe hergestellt (2.4.1). Das verwendete Gewebe des Wildtyps sowie der Transformante *PpRH1-KO#29* stammte aus vier Tage alten, unter Standardbedingungen kultivierten Mooskulturen. RH-Aktivität wurde mit dem HPLC-basierten Enzym-Assay (2.4.11.2) gemessen, wobei 70 µg Proteinextrakt mit ³H-Inosin (30 nM) für 19 bzw. 24 Stunden bei 35 °C inkubiert wurden. Außerdem wurde den Assays Calciumchlorid (100 mM) zugesetzt, da dieses möglicherweise als Co-Faktor eine Bedeutung hat (3.4.4.3).

Beim Wildtyp entfielen nach 19 Stunden 16 % der Radioaktivität auf Hypoxanthin und 63 % auf das zugefügte Substrat Inosin; 21 % entfielen auf andere Metabolite (Abb. 3.19). Nach 24 stündiger Inkubation waren 18 % des applizierten Substrates zu Hypoxanthin umgesetzt worden und es lagen noch 64 % Inosin vor. Die übrigen 18 % repräsentieren nicht näher identifizierte Metabolite. Die Mutante *PpRH1-KO #29* hingegen zeigte eine drastisch reduzierte RH-Aktivität für das Substrat Inosin: Nach 19 stündiger Inkubation wurden noch 77 % der applizierten Radioaktivität als Inosin nachgewiesen; es konnte aber kein Hypoxanthin gemessen werden. Nach 24 Stunden wurden 73 % der Radioaktivität in Form von Inosin und 1 % als Hypoxanthin detektiert. Auch hier traten außerdem weitere, nicht näher analysierte Metabolite auf (23 bzw. 26 % nach 19 bzw. 24 Stunden). Während für den Wildtyp Umsatzraten für Inosin von 0,6-0,8 pmol h⁻¹ mg⁻¹ Protein gemessen wurden, konnte bei *PpRH1-KO #29* nur eine minimale Rest-Aktivität (< 0,02 pmol h⁻¹ mg⁻¹ Protein) gemessen werden. Diese Daten belegen eindeutig, dass im Fall von *PpRH1-KO #29* eine fast vollständige Reduktion der durch RH-Aktivität katalysierten Metabolisierung von Inosin durch den *knockout* von *PpRH1* erreicht

wurde. Anhand der nicht näher identifizierten Metabolite wird außerdem sichtbar, dass neben der RH auch noch andere konkurrierende Enzym-Aktivitäten vorhanden sind, die Inosin ebenfalls als Substrat verwenden.

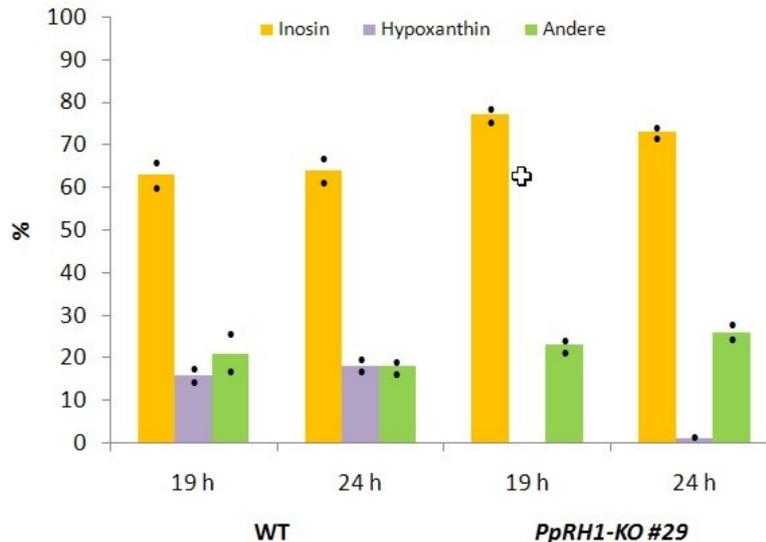


Abb. 3.19 *In vitro* RH-Aktivität beim Wildtyp und der *knockout* Mutante *PpRH1-KO #29*. Enzym-Assays wurden mit Proteinextrakten aus Kulturen von Wildtyp und *PpRH1-KO#29* und ^3H -Inosin als Substrat (30 nM) durchgeführt. Die Vermessung der Ansätze erfolgte nach 19 und 24 Stunden per HPLC-online-LSC. Dargestellt sind Mittelwerte, die Werte der beiden Einzelmessungen sind als Punkte dargestellt.

3.6.4 Analyse des Purin- und Cytokinin-Metabolismus bei *PpRH-knockout* Linien

Wie in 3.4.4.2 beschrieben, zählen Purine, Pyrimidine und Cytokinine zum Substratspektrum der charakterisierten, rekombinanten PpRH Proteine. Um die Auswirkungen des *knockouts* eines *RH*-Gens auf den Purin- bzw. Cytokinin-Stoffwechsel zu analysieren, wurden *in vivo* Metabolismusstudien mit dem Wildtyp und ausgewählten *PpRH-KO* Transformanten unter Verwendung der Purine Adenosin und Inosin sowie dem Cytokinin iPR durchgeführt.

Zum Purin-Stoffwechsel bei *Physcomitrella* existieren in der Literatur bisher kaum Daten. Weder die beteiligten Enzyme sind näher charakterisiert noch lagen vor dieser Arbeit Daten zum Vorkommen der einzelnen Substanzen vor. Die in dieser Arbeit durchgeführten Metabolismusstudien ermöglichen somit erste Einblicke in den Purin-Stoffwechsel bei *Physcomitrella*. Der Cytokinin-Stoffwechsel bei *Physcomitrella* ist hingegen in weiten Teilen bereits charakterisiert worden (Schwartzberg *et al.* 2007, Schwartzberg 2006). Über eine Beteiligung der hier beschriebenen RHs am Cytokinin-Stoffwechsel *in planta* ist aber derzeit nichts bekannt. Für das rekombinante Protein von PpRH1 und von PpRH2 wurde Aktivität an iPR gemessen (Tab. 3.2). Daher wurden *in vivo* Metabolismusstudien mit ^3H -iPR durchgeführt, um die Vermutung der Beteiligung von PpRH1, -2 und -3 am Cytokinin-Metabolismus zu überprüfen.

3.6.4.1 *In vivo* Metabolismusstudien mit den Purin-Ribosiden ^3H -Adenosin und ^3H -Inosin

In vivo Markierungsexperimente mit Adenosin und Inosin als Substrat wurden mit Tritium-markierten Substanzen durchgeführt.

Flüssigkulturen (1 g Gewebe (FG), 4 ml A'BCDNTV-Medium) des Wildtyps und der Transformante *PpRH1-KO #29* wurde ^3H -Adenosin bzw. ^3H -Inosin mit einer Endkonzentration von $1\ \mu\text{M}$ (in isotopischer Verdünnung mit ca. $\frac{1}{10}$ ^3H -Purin-Ribosid) zugefügt und der Metabolismus über einen Zeitraum von 60 Minuten durch Entnahme von Proben aus dem Kulturmedium verfolgt. Nach 60 Minuten wurde außerdem das Gewebe geerntet und zur Analyse der intrazellulären Metabolite aufgeschlossen (2.2.4). Zur Bestimmung der radioaktiv-markierten Metabolite wurden die Medium- und Gewebeprouben per HPLC-online-LSC analysiert (2.5).

3.6.4.1.1 Kinetik der ^3H -Adenosin- und ^3H -Inosin-Konzentration im Medium

Die Kinetik der Verteilung des applizierten ^3H -Adenosins im Kulturmedium ist in Abb. 3.20 A. dargestellt. Mit zunehmender Inkubationszeit nimmt die Menge an radioaktiv-markiertem Adenosin bei beiden Genotypen ab. Bei der Transformante *PpRH1-KO #29* erfolgt die Verarmung des Mediums an Adenosin jedoch deutlich schneller: Nach 30 Minuten sind beim Wildtyp noch 62 %, bei der Transformante nur noch 37 % der zum Zeitpunkt T_0 applizierten Gesamtmenge an Adenosin vorhanden. Auch nach 60 minütiger Inkubation besteht ein deutlicher Unterschied zwischen beiden Genotypen: Beim Wildtyp liegen noch 47 %, bei *PpRH1-KO #29* lediglich 21 % der Gesamtmenge an Adenosin im Kulturmedium vor. Hieraus lässt sich eine Abnahmerate für Adenosin unter Initialbedingungen von $10\ \text{pmol}\ \text{min}^{-1}\ \text{g}^{-1}$ für den Wildtyp und $16\ \text{pmol}\ \text{min}^{-1}\ \text{g}^{-1}$ für *PpRH1-KO #29* ermitteln (Tab. 3.3). Nach 60 Minuten wurden ähnliche Abnahmeraten für beide Genotypen berechnet, 4 bzw. 5 $\text{pmol}\ \text{min}^{-1}\ \text{g}^{-1}$ für Wildtyp bzw. *PpRH1-KO #29*. Die Kinetik der Adenosin-Konzentration unterscheidet sich demnach bei den beiden Genotypen hauptsächlich innerhalb der ersten 10 Minuten.

Der Befund, dass nach 60 minütiger Inkubation nur noch 47 (Wildtyp) bzw. 21 % (*PpRH1-KO #29*) der zum Zeitpunkt T_0 applizierten Gesamtmenge an Adenosin im Medium detektiert wurden, deutet bei beiden Genotypen auf eine rasche Aufnahme und/oder eine starke Metabolisierung von Adenosin hin, wobei diese beim *PpRH1-knockout* im Vergleich zum Wildtyp noch gesteigert ist.

Die Analyse der Proben aus dem Kulturmedium des Markierungsexperimentes mit ^3H -Inosin ergab folgendes Bild (Abb. 3.20 B.): Auch die Abnahme von Inosin erfolgt bei beiden Genotypen sehr rasch. Bereits nach 10 Minuten sind nur noch 60 % des applizierten Inosins im Kulturmedium des Wildtyps und der Transformante *PpRH1-KO #29* nachzuweisen. Dies entspricht einer Abnahmerate unter Initialbedingungen von $20\ \text{pmol}\ \text{min}^{-1}\ \text{g}^{-1}$ (identisch für beide Genotypen, Tab. 3.3). Ab Minute 20 erfolgt dann die Abnahme von Inosin bei *PpRH1-KO #29* schneller als beim Wildtyp. Nach 30 Minuten liegen beim Wildtyp noch 48 %, bei der Transformante lediglich 33 % des zugefügten Inosins im Medium vor. Nach 60 Minuten sind lediglich 14 % des applizierten Inosins bei *PpRH1-KO #29* im Medium nachzuweisen, während beim Wildtyp noch 35 % der Ausgangsmenge an Inosin im Medium verblieben sind. Hieraus wurden Abnahmeraten von 6 bzw. 9 $\text{pmol}\ \text{min}^{-1}\ \text{g}^{-1}$ für den Wildtyp bzw. die Transformante *PpRH1-KO #29* ermittelt.

Die Transformante *PpRH1-KO #29* zeigt somit übereinstimmend für beide durchgeführten Markierungsexperimente eine gegenüber dem Wildtyp beschleunigte Abnahme für das applizierte Substrat im Kulturmedium. Während für Adenosin eine schnellere Abnahme im Medium bereits innerhalb der ersten 10 Minuten beobachtet wurde, sinkt nach Applikation von Inosin die Inosin-Konzentration erst nach 10 Minuten auf einen niedrigeren Wert als beim Wildtyp ab.

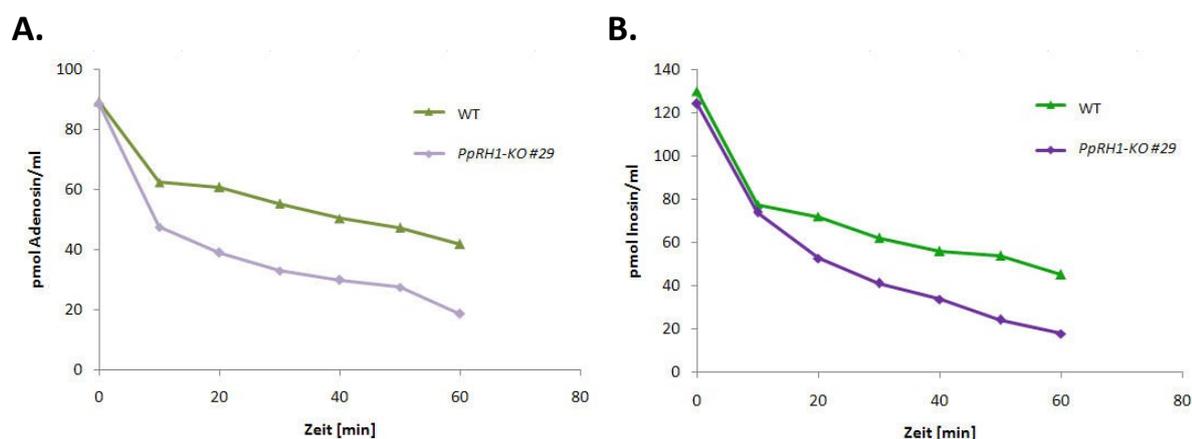


Abb. 3.20 *In vivo* Metabolismusstudien mit ³H-Adenosin und ³H-Inosin von Kulturen des Wildtyps und der Transformante *PpRH1-KO #29*. Die Substrate wurden den Kulturen (1 g Gewebe (FG), 4 ml A'BCDNTV-Medium) mit einer Konzentration von 1 μM (isotopische Verdünnung, 1/10 ³H-Substrat) zugefügt. Über 60 Minuten wurden Proben aus dem Kulturmedium entnommen und per HPLC-online-LSC analysiert. (A.): Kinetik der ³H-Adenosin- (B.): Kinetik der ³H-Inosin-Abnahme im Medium beim Wildtyp und der Transformante *PpRH1-KO #29*.

Tab. 3.3 Abgeleitete Abnahmeraten für ³H-Adenosin und ³H-Inosin im Medium beim Wildtyp und *PpRH1-KO #29* nach *in vivo* Markierung.

	Abnahmeraten für ³ H-Adenosin [pmol min ⁻¹ g ⁻¹]		Abnahmeraten für ³ H-Inosin [pmol min ⁻¹ g ⁻¹]	
	Minute 0-10	Minute 10-60	Minute 0-10	Minute 10-60
WT	10	4	20	6
<i>PpRH1-KO #29</i>	16	5	20	9

3.6.4.1.2 Analyse der ³H-Adenosin- und ³H-Inosin-Metabolite in Gewebeextrakten

Zur detaillierten Charakterisierung des Adenosin- bzw. Inosin-Metabolismus wurde nach 60 minütiger Inkubation mit radioaktiv-markiertem Substrat das Gewebe geerntet und analysiert. Nach Extraktion der intrazellulären Metabolite aus dem Gewebe wurden zunächst die Bilanzen für die Gesamtradioaktivität ermittelt (Tab. 3.4). Hierbei wurde festgestellt, dass der Hauptanteil der Radioaktivität im Medium verblieb (58 bzw. 68 % bei Markierung mit ³H-Adenosin, 81 bzw. 77 % bei Markierung mit ³H-Inosin). Auffallend ist, dass sich intrazellulär bei beiden Genotypen eine drastische Differenz zwischen der extrahierbaren und der errechneten (bezogen auf die im Medium verbliebene Radioaktivität) intrazellulären Radioaktivität ergab. Diese Differenz betrug beim Markierungsexperiment mit ³H-Adenosin 35 % beim Wildtyp und 29 % bei *PpRH1-KO #29* (Berechnung: errechnete minus extrahierbare intrazelluläre Radioaktivität). Nach Markierung mit ³H-Inosin betrug der Anteil an aufgenommenen aber nicht mehr extrahierbarer intrazellulärer Radioaktivität 18 % (Wildtyp) bzw. 22 % (*PpRH1-KO #29*). Bereits der für beide Genotypen hohe Anteil der nicht mehr aus dem Gewebe extrahierbaren Radioaktivität deutet auf eine rasche Metabolisierung der eingesetzten Substrate hin.

Tab. 3.4 Vergleichende Darstellung der Bilanzen der Radioaktivität während der 60 minütigen *in vivo* Markierung mit ³H-Adenosin (links) und ³H-Inosin (rechts) beim Wildtyp und *PpRH1-KO #29*. Angegeben ist die nach 60 Minuten im Medium verbliebene Radioaktivität, die sich hieraus ergebende errechnete, intrazelluläre Radioaktivität sowie die aus dem Gewebe extrahierbare Radioaktivität.

	Markierung mit ³ H-Adenosin			Markierung mit ³ H-Inosin		
	Im Medium verbliebene Radioaktivität pmol/Ansatz [%]	Extrahierbare, intrazelluläre Radioaktivität pmol/Ansatz [%]	Errechnete, intrazelluläre Radioaktivität pmol/Ansatz [%]	Im Medium verbliebene Radioaktivität pmol/Ansatz [%]	Extrahierbare, intrazelluläre Radioaktivität pmol/Ansatz [%]	Errechnete, intrazelluläre Radioaktivität pmol/Ansatz [%]
WT	209 [58]	24 [7]	151 [42]	443 [81]	3 [1]	104 [19]
<i>PpRH1-KO #29</i>	239 [68]	12 [3]	112 [32]	400 [77]	3 [1]	119 [23]

Prozentangaben beziehen sich auf die zum Zeitpunkt T₀ applizierte Gesamtradioaktivität

Zur Identifizierung der intrazellulären Metabolite wurden die Gewebeextrakte per HPLC-online-LSC analysiert (Abb. 3.21). Hierbei wurden Basen, Riboside und Nukleotid-Monophosphate direkt nach der Extraktion per HPLC-online-LSC detektiert (obere Chromatogramme in A. und B.). Nukleotid-Di- und -Triphosphate waren erst nach Dephosphorylierung zusammen mit den Nukleotid-Monophosphaten als Riboside zu identifizieren (untere Chromatogramme in A. und B.).

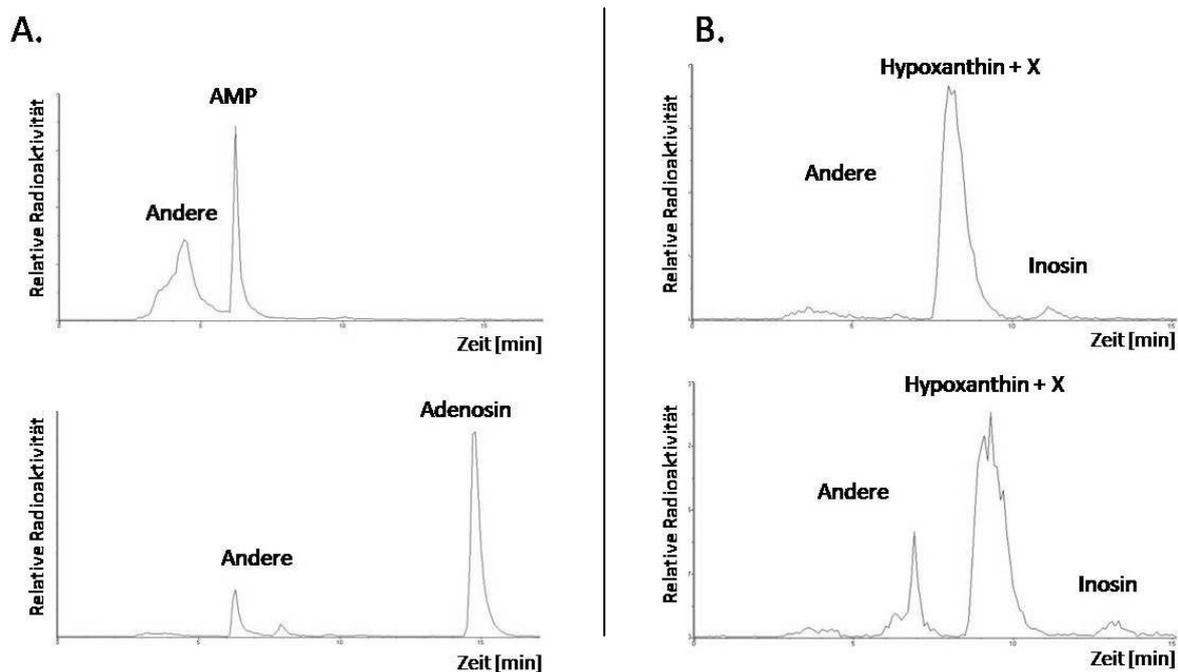


Abb. 3.21 Beispielchromatogramme von Gewebeextrakten aus Markierungsexperimenten mit ³H-Adenosin (A.) und ³H-Inosin (B.). Die dargestellten Chromatogramme zeigen die HPLC-online-LSC-Analyse der Gewebeextrakte des Wildtyps vor (oben) und nach (unten) Dephosphorylierung nach 60 minütiger Markierung. Vor Dephosphorylierung werden Basen, Riboside und Nukleotid-Monophosphate, nach Dephosphorylierung Nukleotid-Di- und -Triphosphate zusammen mit Nukleotid-Monophosphaten in Form von Ribosiden erfasst. Die in B. zu sehende Verschiebung der Retentionszeiten ist darauf zurückzuführen, dass die beiden Proben in einem größeren zeitlichen Abstand voneinander vermessen wurden. Anhand des jeweiligen UV-Spektrums wurden die Substanzen eindeutig identifiziert.

Die Analyse der Protonemaextrakte nach Markierung mit ^3H -Adenosin ist in Abb. 3.22 A. dargestellt. Im Gewebe beider Genotypen konnte weder das applizierte Adenosin noch Adenin nachgewiesen werden. Lediglich die Nukleotide AMP, ADP und ATP sowie weitere, nicht näher bestimmte Metabolite waren detektierbar. Die Nukleotide ADP/ATP machten dabei den Hauptanteil aus (7 pmol/100 mg, Wildtyp) bzw. 4 pmol/100 mg, *PpRH1-KO #29*). Für AMP wurde beim Wildtyp eine Menge von 3 pmol/100 mg und bei der Transformante von 1 pmol/100 mg bestimmt. Alle weiteren Metabolite ergaben zusammen eine Menge von 4 pmol/100 mg (Wildtyp) bzw. 2 pmol/100 mg (*PpRH1-KO #29*). Die Tatsache, dass weder Adenosin noch Adenin intrazellulär detektiert werden konnten, spricht für eine schnelle Umwandlung oder Verwertung von Adenosin bzw. Adenin.

Auch nach 60 minütiger Markierung mit ^3H -Inosin wurden radioaktiv-markierte Metabolite aus dem Gewebe extrahiert und per HPLC-online-LSC analysiert (Abb. 3.22 B.). Hier zeigte sich, dass auch Inosin ebenso wie zuvor für Adenosin beschrieben, einer schnellen Metabolisierung unterlag. Im Gewebe des Wildtyps war eine sehr geringe Menge an Inosin (0,03 pmol/100 mg) vorhanden. Bei *PpRH1-KO #29* konnte hingegen kein Inosin mehr im Gewebe nachgewiesen werden. Hypoxanthin konnte im Gewebe beider Genotypen zwar gemessen werden, aber die vorliegenden Daten lassen vermuten, dass weitere Substanzen mit Hypoxanthin koeluierten und daher korrekterweise von Hypoxanthin-koeluiierenden Substanzen (Hypoxanthin + X in Abb. 3.22 B.) gesprochen werden muss. Die Menge an gebildetem Hypoxanthin war daher nicht zu quantifizieren. Die nicht näher klassifizierten Metabolite („Andere“) traten beim Wildtyp und Mutante *PpRH1-KO #29* in ähnlichen Mengen auf (0,4 pmol/100 mg).

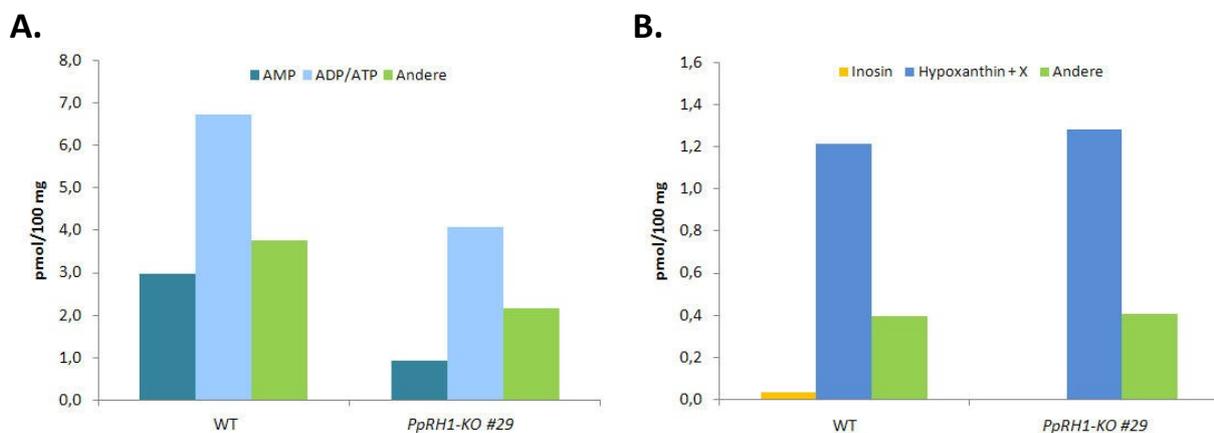


Abb. 3.22 Darstellung der ^3H -Metabolite in Gewebeextrakten von Wildtyp und *PpRH1-KO #29* nach Markierungsexperimenten mit ^3H -Adenosin (A.) und ^3H -Inosin (B.). Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der y-Achsen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die rasche Metabolisierung beider Purine eine Messung der RH-katalysierten Reaktion unter diesen experimentellen Bedingungen im Gewebe nicht zulässt. Unterschiede zwischen Wildtyp und den *KO*-Mutanten werden daher nicht deutlich sichtbar. Weder Substrat noch Produkt der RH-Reaktion konnten sowohl nach Markierung mit Adenosin als auch mit Inosin nicht oder nur in sehr geringen Mengen im Gewebe detektiert werden.

3.6.4.2 *In vivo* Metabolismusstudien mit dem Cytokinin-Ribosid ^3H -iPR

Zur Untersuchung des Cytokinin-Metabolismus wurden *in vivo* Markierungsexperimente mit Tritium-markiertem iPR durchgeführt. Hierfür wurden Flüssigkulturen (1 g Gewebe (FG), 4 ml A'BCDNTV-Medium) des Wildtyps und der Transformanten *PpRH1-KO #29*, *PpRH2-KO #56* und *PpRH3-KO #7* mit ^3H -iPR in einer Endkonzentration von 30 nM versetzt. Aus dem Kulturmedium wurden über einen Zeitraum von 25 Stunden Proben entnommen. Nach 20 bzw. 25 Stunden wurde außerdem auch das Gewebe geerntet und zur Extraktion radioaktiv-markierter Metabolite, wie in 2.2.4 beschrieben, aufgeschlossen. Alle Proben wurden anschließend mittels HPLC-online-LSC ausgewertet.

3.6.4.2.1 Kinetik der ^3H -iPR-Metabolite im Medium

Wie aus Abb. 3.23 ersichtlich, war bei allen Genotypen eine Metabolisierung des applizierten ^3H -iPRs zu messen. Übereinstimmend für alle Genotypen erfolgte einerseits eine Verarmung des Kulturmediums an ^3H -iPR, andererseits wurde die Bildung von ^3H -iP sowie nicht näher bestimmten Abbauprodukten gemessen. Die Abnahme von ^3H -iPR erfolgte bei *PpRH1-KO #29* unerwarteterweise schneller, bei *PpRH2-KO #56* und *PpRH3-KO #7* hingegen geringfügig langsamer als beim Wildtyp. Nach 25 stündiger Markierung waren beim Wildtyp noch 29 %, bei *PpRH1-KO #29* nur 14 %, bei *PpRH2-KO #56* 36 % und bei *PpRH3-KO #7* noch 39 % der ursprünglich applizierten Gesamtmenge an ^3H -iPR im Kulturmedium zu messen. Die Bildung von ^3H -iP erfolgte für alle Genotypen in einer ähnlichen Größenordnung (nach 25 Stunden ca. 2 pmol/ml). Ein Vergleich der iP-Mengen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Experimentes zeigt, dass diese sich zeitabhängig stark verändern. Möglicherweise spielen hier auch Transporteffekte eine Rolle. Die Menge im Medium vorhandener Abbauprodukte lag für alle Genotypen ebenfalls in einer ähnlichen Größenordnung (6-9 pmol/ml). Die abgeleiteten Abnahmeraten von ^3H -iPR innerhalb der ersten 7 Stunden unterschieden sich nur geringfügig bei den verschiedenen Genotypen. Sie betrug beim Wildtyp $12 \text{ pmol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, bei *PpRH1-KO #29* $15 \text{ pmol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$, bei *PpRH2-KO #56* $10 \text{ pmol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ und bei *PpRH3-KO #7* $11 \text{ pmol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$.

Die Konzentration von ^3H -iPR nahm bei den *knockouts* zum Teil schneller (*PpRH1-KO #29*) und zum Teil etwas langsamer (*PpRH2-KO #56* und *PpRH3-KO #7*) ab als beim Wildtyp. Über den gesamten Versuchszeitraum konnten ähnliche Abnahmeraten für alle Genotypen ermittelt werden. Anhand dieser Daten ist es somit schwierig, einen für alle Transformanten zutreffenden *knockout*-gebundenen Effekt auf den ^3H -iPR-Stoffwechsel abzuleiten.

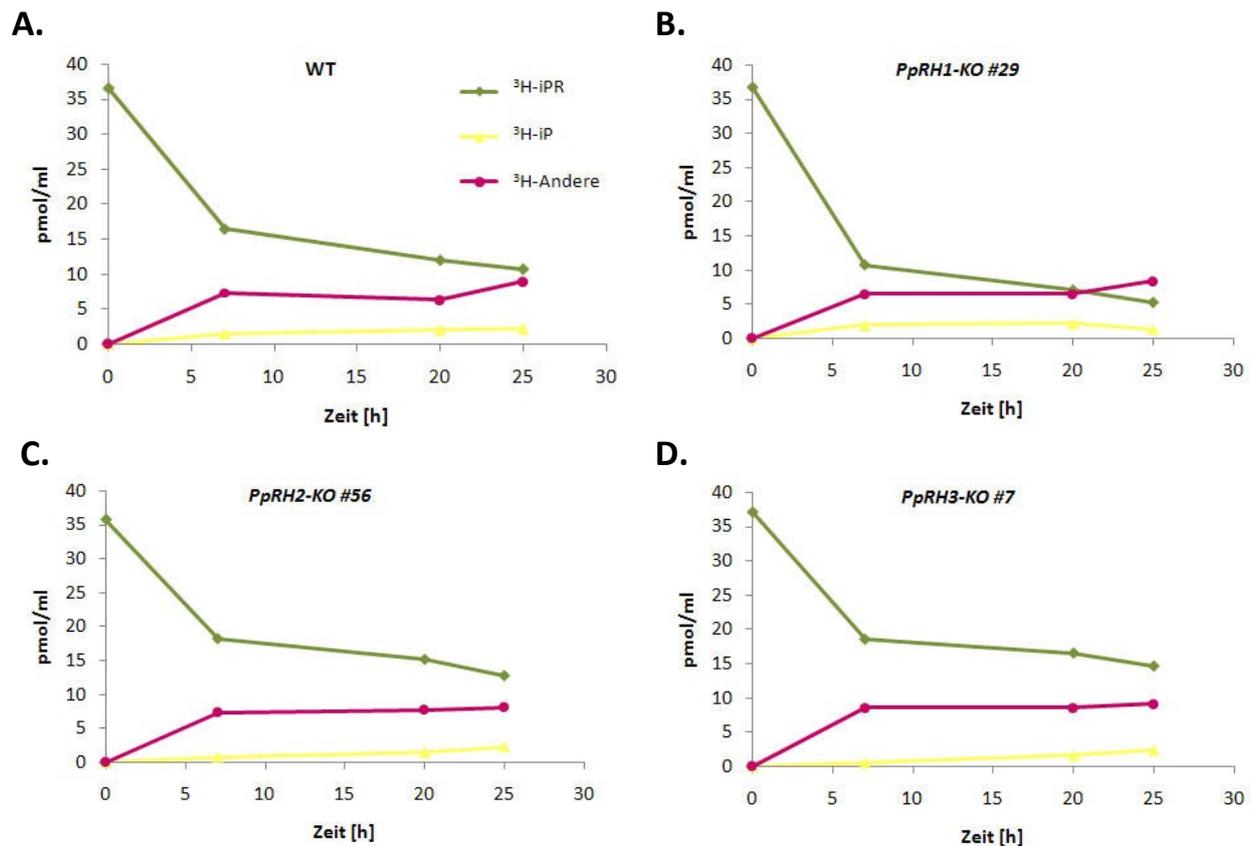


Abb. 3.23 Kinetik von ³H-iPR und -Metaboliten im Kulturmedium beim Wildtyp (A.) und den Transformanten *PpRH1-KO #29* (B.), *PpRH2-KO #56* (C.) und *PpRH3-KO #7* (D.) nach *in vivo* Markierung mit ³H-iPR (30 nM, Kultur: 1 g Gewebe (FG), 4 ml A'BCDNTV-Medium). Über einen Zeitraum von 25 Stunden wurden Proben aus dem Kulturmedium entnommen und per HPLC-online-LSC analysiert.

3.6.4.2.2 Analysen der ³H-iPR-Metabolite in Gewebeextrakten

Zur Bestimmung der intrazellulären Metabolite wurden die Protonemaextrakte nach 20 und nach 25 Stunden mit Bielecki-Reagenz aufgeschlossen (2.2.4). Die HPLC-online-LSC-Analyse dieser Ansätze erlaubte die Bestimmung der Menge an Basen, Ribosiden sowie dem Nukleotid iPRMP. Für die Erfassung von Nukleotid-Di- und -Triphosphaten mussten die Gewebeextrakte zunächst einer Dephosphorylierung unterzogen werden. In der anschließenden HPLC-Analyse wurden diese dann zusammen mit den Nukleotid-Monophosphaten als Riboside erfasst. Im Gewebe aller Genotypen wurden die folgenden Metabolite detektiert: Das applizierte Substrat iPR, die durch Deribosylierung entstandene Base iP, die nach Phosphorylierung gebildeten iP-Nukleotide iPRMP, iPRDP und iPRTP sowie nicht näher bestimmte, durch Abspaltung der Isopentenyl-Seitenkette entstandene, Abbauprodukte (siehe Anhang, Tab. 6.1). Außerdem wurden auch nach Markierung mit ³H-iPR hohe Differenzen zwischen der extrahierbaren intrazellulären Radioaktivität und der aufgrund der im Medium verbliebenen Radioaktivität berechneten intrazellulären Radioaktivität gemessen (24-50 %, siehe Anhang, Tab. 6.2). Diese Differenzen lassen auf eine rasche Verstoffwechslung des applizierten ³H-iPRs schließen. Drastische Unterschiede zwischen den einzelnen Genotypen wurden nicht beobachtet.

Auswirkungen des RH-knockouts auf das Base-Ribosid-Verhältnis

Zur Messung des Effekts des *RH-knockouts* auf den Metabolismus von ^3H -iPR, wurde zunächst das Verhältnis von Produkt und Substrat der RH-katalysierten Reaktion bei allen Genotypen nach 20 und 25 Stunden berechnet - iP zu iPR -, dargestellt in Abb. 3.24. Es zeigte sich, dass die verschiedenen *PpRH-knockouts* im Vergleich zum Wildtyp unterschiedlich reagierten. Während *PpRH1-KO #29* zu beiden Zeitpunkten unerwarteterweise ein höheres iP/iPR-Verhältnis als der Wildtyp aufwies, 3,0 bzw. 2,0 gegenüber 1,8 bzw. 1,0 (Wildtyp), wurde für *PpRH2-KO #56* zunächst ein niedrigeres (1,3 nach 20 h) und fünf Stunden später ein höheres iP/iPR-Verhältnis berechnet (1,5). *PpRH3-KO #7* wies für beide Zeitpunkte übereinstimmend ein im Vergleich zum Wildtyp niedrigeres iP/iPR-Verhältnis auf (1,0 bzw. 0,7). Ob dieser Befund als eine direkte Folge der veränderten RH-Aktivität zu sehen ist oder ob es sich um eine indirekte Folge handelt, ist Gegenstand der anschließenden Diskussion.

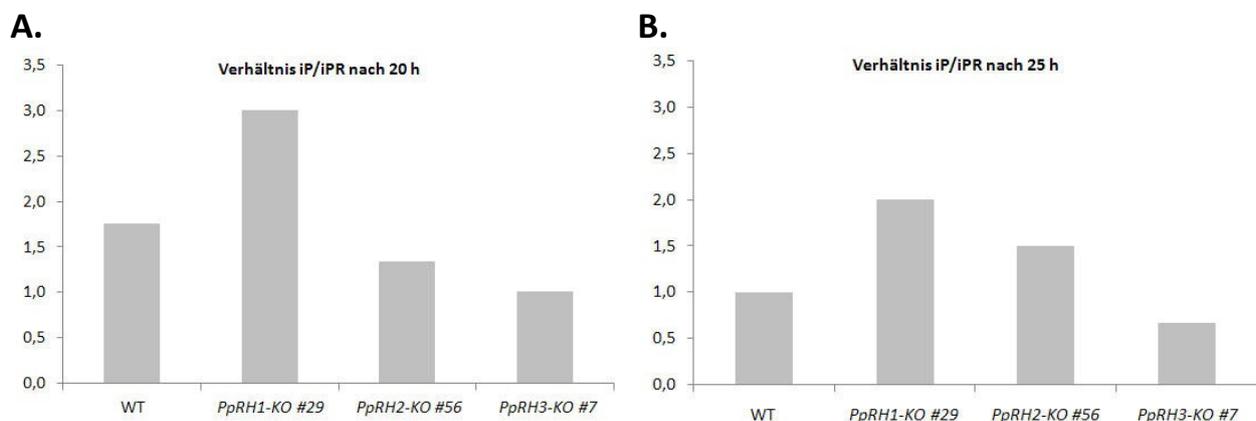


Abb. 3.24 Darstellung des intrazellulären Verhältnisses von der Base iP zum Ribosid iPR nach 20 (A.) bzw. 25 (B.) stündiger *in vivo* Markierung mit ^3H -iPR (30 nM) von Wildtyp und den Transformanten *PpRH1 KO #29*, *PpRH2-KO #56* und *PpRH3-KO #7*.

Auswirkungen des RH-knockouts auf den Gesamt-Cytokinin-Status

Zur Abschätzung der Folgen eines *RH-knockouts* auf den Gesamtstatus an Cytokinin wurde die Menge an Metaboliten mit Isopentenyl-Seitenkette den gebildeten Abbauprodukten gegenüber gestellt (Abb. 3.25). Sowohl nach 20 als auch nach 25 stündiger Inkubation ergibt sich ein ähnliches Bild: Übereinstimmend für alle Genotypen konnte zunächst ein deutlich höherer Anteil an Abbauprodukten als an Metaboliten mit Isopentenyl-Seitenkette detektiert werden. *PpRH1-KO #29* bildet aber im Vergleich zum Wildtyp (jeweils 3,8 pmol/100 mg) eindeutig mehr Abbauprodukte (6,5 bzw. 6,2 pmol/100 mg). Die Linien des *PpRH2-* und *PpRH3-KO* hingegen weisen eine geringere Menge an Abbauprodukten als der Wildtyp auf (*PpRH2-KO #56*: 3,0 bzw. 3,3 pmol/100 mg; *PpRH3-KO #7* 2,6 bzw. 3,4 pmol/100 mg). Betrachtet man das Verhältnis von Abbauprodukten zu Metaboliten mit Isopentenyl-Seitenkette wurde übereinstimmend beim Wildtyp, *PpRH2-* und *PpRH3-KO* die 2fache Menge an Abbauprodukten gegenüber Metaboliten mit Isopentenyl-Seitenkette gebildet. Der *knockout PpRH1-KO* hingegen bildet die 5fache Menge an Abbauprodukten gegenüber Metaboliten mit Isopentenyl-Seitenkette.

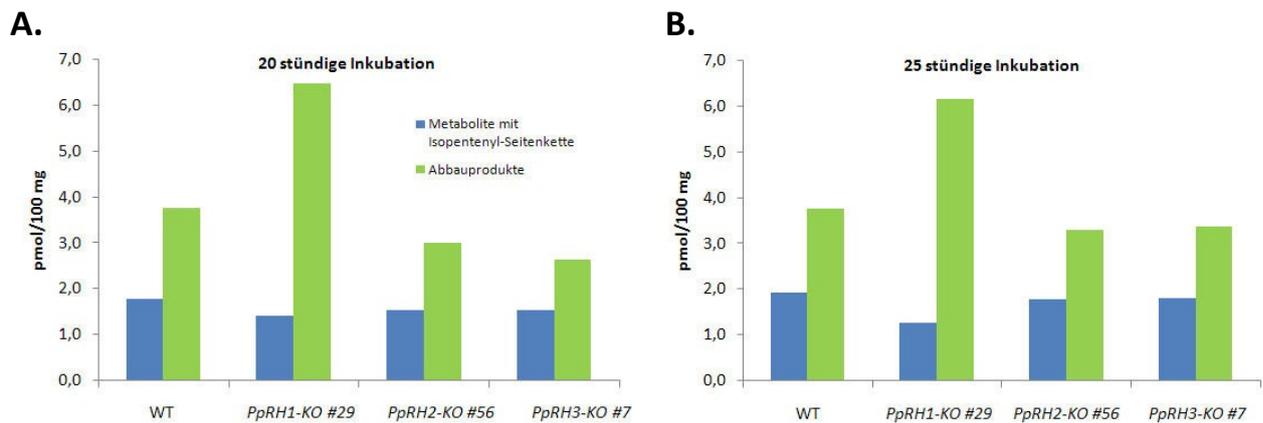


Abb. 3.25 Darstellung der intrazellulären Mengen an ^3H -Metaboliten mit Isopentenyl-Seitenkette und an Abbauprodukten nach 20 (A.) bzw. 25 (B.) stündiger *in vivo* Markierung mit ^3H -IPR (30 nM) von Wildtyp und den Transformanten *PpRH1-KO #29*, *PpRH2-KO #56* und *PpRH3-KO #7*.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der *knockout* der *RHs* nach Markierung mit ^3H -IPR deutlich einen metabolischen Phänotyp erkennen lässt. Für *PpRH1-KO #29* wurde ein gegenüber dem Wildtyp erhöhtes Base/Ribosid-Verhältnis gemessen. Das Verhältnis von Metaboliten mit Isopentenyl-Seitenkette und Abbauprodukten ist zugunsten der Abbauprodukte verschoben, d.h. es findet im Vergleich zum Wildtyp eine verstärkte CKX-vermittelte Cytokinin-Inaktivierung statt. Bei *PpRH2-KO #56* wurde nach 20 Stunden ein niedrigeres, nach 25 Stunden ein höheres Base/Ribosid-Verhältnis im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen. *PpRH3-KO #7* zeigt hingegen zu beiden Zeitpunkten ein niedrigeres Base/Ribosid-Verhältnis. Die Menge an gebildeten Abbauprodukten ist bei *PpRH2-KO #56* und *PpRH3-KO #7* übereinstimmend nach 20 und 25 Stunden geringer als beim Wildtyp. Somit konnte bei allen analysierten *knockout* Mutanten eine Beeinflussung des Cytokinin-Metabolismus festgestellt werden. Der beobachtete Effekt auf den Stoffwechsel variiert leicht, je nach dem welche *RH* ausgeschaltet wurde. Inwieweit das Fehlen einer *RH* direkte oder indirekte Auswirkungen auf den Metabolismus haben kann, wird später diskutiert werden.

3.6.5 Analyse der Gehalte von Purinen und Pyrimidinen in Wildtyp und *PpRH-knockout* Linien

Zur Bestimmung der Gehalte von *in planta* vorhandenen Purinen und Pyrimidinen sowie zur Klärung der Frage, ob der *knockout* einer *RH* Veränderungen im Gehalt an endogenen Purinen bzw. Pyrimidinen verursacht, wurden LC-MS/MS-basierte Messungen in Kooperation mit Dr. J. Klein (Stoffwechsellabor, Charité Campus Virchow Klinikum, Berlin, D) durchgeführt. Hierfür wurden Kulturen des Wildtyps und der Mutanten *PpRH1-KO #29*, *PpRH2-KO #56* und *PpRH3-KO #7* wie unter 2.2.2 beschrieben kultiviert und Gewebeproben nach 0 und 21 Tagen entnommen. Nach einer Aufbereitung der Gewebeproben (2.2.5) wurden diese anschließend per LC-MS/MS zur Bestimmung der Purine und Pyrimidine vermessen (2.7). Für die Quantifizierung der detektierten Substanzen wurden die zugefügten Standards ($^{15}\text{N}_5$]Desoxyadenosin, $^{15}\text{N}_4$]Inosin, $^{15}\text{N}_2$]Orotsäure, $[\text{D}_3]$ S-Sulfocystein, $[\text{D}_4]$ Thymin und $^{15}\text{N}_2$]Uracil, jeweils 5 μM sowie $^{15}\text{N}_2$]Harnsäure, 20 μM) verwendet, wobei die meisten Substanzen (Ausnahme Thymin und Uracil) anhand des $^{15}\text{N}_4$]Inosin-Standards quantifiziert wurden. Hierfür wurde davon ausgegangen, dass sowohl extraktionsbedingte Verluste als auch Ionisierung für Standard und Analyt ähnlich sind. Korrekterweise sollte daher bei den anhand von $^{15}\text{N}_4$]Inosin quantifizierten Analyten von Äquivalenten der jeweiligen Substanz

ausgegangen werden. In Abb. 3.26 sind die LC-MS/MS Chromatogramme ausgewählter Substanzen dargestellt.

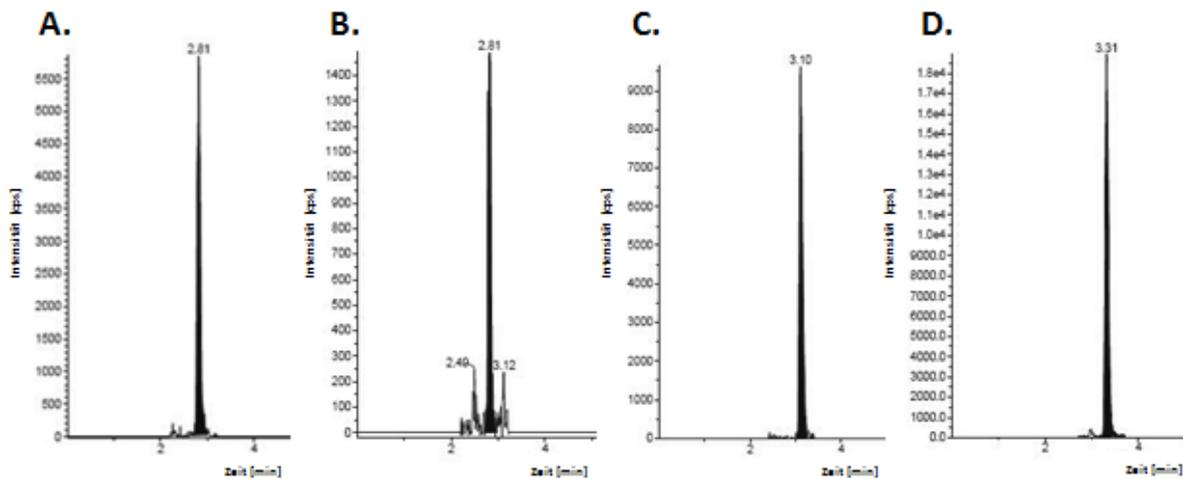


Abb. 3.26 LC-MS/MS Chromatogramme ausgewählter Substanzen. Gezeigt ist in (A.) Standard [$^{15}\text{N}_4$]Inosin (270,9 Da), in (B.) Inosin (266,9 Da), in (C.) Adenosin (265,9 Da) und in (D.) Xanthosin (282,9 Da). In Kooperation mit Dr. J. Klein (Stoffwechsellabor, Charité Campus Virchow Klinikum, Berlin, D).

3.6.5.1 Gehalte von Purinen und Pyrimidinen beim Wildtyp

Informationen zu den Gehalten von Purinen oder Pyrimidinen in Pflanzen liegen bisher kaum vor. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals ein Purin- und Pyrimidin-Profil für das Laubmoos *Physcomitrella* erstellt.

Folgende 15 Substanzen konnten anhand der LC-MS/MS Messungen im Gewebe des Wildtyps sicher identifiziert werden (Abb. 3.27): Xanthosin, Xanthin, Inosin, Hypoxanthin, Desoxyinosin, Adenosin, Adenin, Desoxyadenosin, Guanosin, Desoxyguanosin, Uridin, Uracil, Desoxyuridin, Thymidin sowie Thymin. Cytidin-Metabolite und Nukleotide wurden bei den Messungen nicht analysiert. Für die nachgewiesenen Purine und Pyrimidine konnten Konzentrationen im Bereich von 0,7 bis 81 nmol/g TG gemessen werden. Durch die Quantifizierung anhand der Standards ergab sich eine Reihung der Substanzen je nach ihrem quantitativen Vorkommen nach 21 tägiger Kultivierung: Xanthosin kommt demnach in der höchsten Konzentration im Gewebe vor, dann folgen in lediglich etwas geringeren Mengen das Purin Adenosin sowie die Pyrimidine Uridin und Uracil. In bis zu 3fach niedrigeren Konzentrationen wurden die Purin-Basen Adenin und Xanthin sowie die -Riboside Guanosin und Inosin nachgewiesen. Die geringsten Mengen wurden für Hypoxanthin, Thymidin, Thymin und die Desoxy-Formen von Adenosin, Inosin, Guanosin und Uridin gemessen.

Neben der Erstellung eines Profils von Purinen und Pyrimidinen wurde außerdem der zeitliche Verlauf der Konzentrationen für die Substanzen analysiert. Die Abb. 3.27 zeigt die Mengen an ausgewählten Purinen und Pyrimidinen beim Wildtyp zu Beginn des Experimentes (T_0 , oben) und nach 21 Tagen (T_{21} , unten). Zu Beginn des Experimentes und dem damit verbundenen Wechsel des Kulturmediums wurden für nahezu alle Substanzen niedrigere Konzentrationen als zu späteren Zeitpunkten gemessen. Dies deutet auf eine Sekretion oder passive Freisetzung der Substanzen hin. Mit Zunahme der Kultivierungsdauer erfolgte daher bei den meisten Substanzen eine Zunahme der

Konzentration. Erste Messungen zum extrazellulären Vorkommen von Purinen und Pyrimidinen bestätigen, dass diese im Kulturmedium in nmolaren Mengen vorkommen (Daten nicht gezeigt).

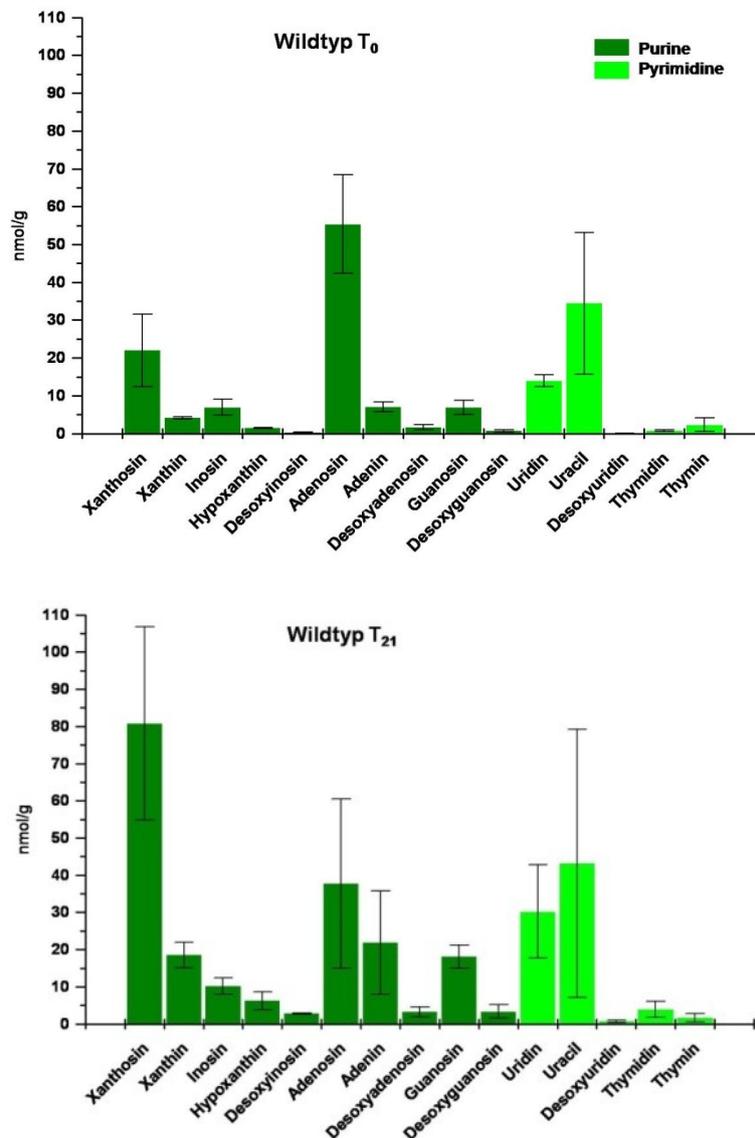


Abb. 3.27 Konzentrationen endogener Purine und Pyrimidine im Wildtyp nach 0 (oben) und 21 tägiger (unten) Kultivierung angegeben in nmol/g TG. Daten wurden mittels LC-MS/MS Messungen erhoben, [¹⁵N₄]Inosin wurde als interner Standard zur Quantifizierung verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte von Messungen aus drei unabhängigen Kulturen eines Experimentes. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. In Einzelfällen wurden stark abweichende Werten von der Berechnung ausgeschlossen. In Kooperation mit Dr. J. Klein (Stoffwechsellabor, Charité Campus Virchow Klinikum, Berlin, D).

Während zu Beginn des Experimentes Adenosin den Hauptanteil aller analysierten Substanzen ausmacht (55,4 ± 13,0 nmol/g TG), ist nach 21 Tagen die Akkumulation von Xanthosin im Vergleich zu den übrigen Substanzen am höchsten (80,8 ± 26,0 nmol/g TG). Die meisten der detektierten Purine und Pyrimidine zeigen eine deutliche Tendenz zu steigenden Konzentrationen während des gesamten Messzeitraumes, die Konzentration von Adenosin nach 21 Tagen hingegen sinkt um den

Faktor 1,4 ab. Die stärkste Zunahme bei den Purinen wurde für Desoxyguanosin (4,8fach), Xanthin (4,5fach) und Hypoxanthin (4,4fach) gemessen, wobei Desoxyguanosin im Vergleich zu den anderen Purinen insgesamt in nur sehr geringen Konzentrationen vorkommt ($3,4 \pm 1,8$ nmol/g TG nach 21 Tagen). Von den Pyrimidinen nimmt Thymidin im zeitlichen Verlauf am stärksten zu (5,3fach).

3.6.5.2 Gehalte von Purinen und Pyrimidinen bei *PpRH-knockouts*

Zur Erfassung des Einflusses von RHs auf die Konzentrationen von intrazellulär vorhandenen Purinen und Pyrimidinen wurden analog zu den Wildtyp-Proben auch LC-MS/MS Messungen an Gewebeprobe von den *RH-KO* Pflanzen *PpRH1-KO #29*, *PpRH2-KO #56* sowie *PpRH3-KO #7* vorgenommen. Der Status der intrazellulär vorkommenden Purine und Pyrimidine nach 21 Tagen ist in Abb. 3.28 dargestellt. Wie im Wildtyp wurden auch im Gewebe der Transformanten die Purine Xanthosin, Xanthin, Inosin, Hypoxanthin, Desoxyinosin, Adenosin, Adenin, Desoxyadenosin, Guanosin und Desoxyguanosin sowie die Pyrimidine Uridin, Uracil, Desoxyuridin, Thymidin und Thymin eindeutig nachgewiesen. Unterschiede im Gehalt der einzelnen Metabolite zwischen den Genotypen werden im Anschluss beschrieben. Desoxyinosin war der einzige Metabolit der übereinstimmend bei allen Mutanten in einer erhöhten Konzentration im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen wurde.

PpRH1-KO #29

Für die Transformante *PpRH1-KO #29* wurde ein gegenüber dem Wildtyp deutlich verändertes Purin- und Pyrimidin-Profil gemessen (Abb. 3.28 A.). Nahezu alle analysierten Substanzen zeigten übereinstimmend höhere Konzentrationen. Besonders auffällig waren hierbei die deutlich erhöhten Niveaus von den Ribosiden Xanthosin (17fach), Inosin (14fach), Uridin (10fach) und Guanosin (2fach) sowie der Base Adenin (3fach). Der *knockout* von *PpRH1* führt somit zu einer teilweise drastischen Akkumulation von Ribosiden und Basen.

PpRH2-KO #56

Bei der Transformante *PpRH2-KO #56* waren im Vergleich zum Wildtyp keine drastischen Veränderungen der intrazellulären Konzentrationen von Purinen und Pyrimidinen zu verzeichnen (Abb. 3.28 B.). Nur für das Ribosid Uridin wurde ein deutlicher Anstieg gemessen (3fach mehr als beim Wildtyp), alle anderen Purin- bzw. Pyrimidin-Vertreter zeigten keine signifikanten Veränderungen.

PpRH3-KO #7

Im Gewebe von *PpRH3-KO #7* war eine um den Faktor 5 niedrigere Guanosin-Konzentration als beim Wildtyp zu messen (Abb. 3.28 C.). Die übrigen Substanzen blieben ähnlich wie bei *PpRH2-KO #56* nahezu unbeeinflusst.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass der Verlust der RHs *PpRH1*, -2 und -3 unterschiedliche Effekte zeigt. Eine Beeinflussung des Purin- und Pyrimidin-Profiles wurden für alle Genotypen nachgewiesen, im Fall des *PpRH1-KO #29* war diese aber deutlicher ausgeprägt, da eine Anhebung der Gehalte von nahezu allen analysierten Purinen und Pyrimidinen gemessen wurde.

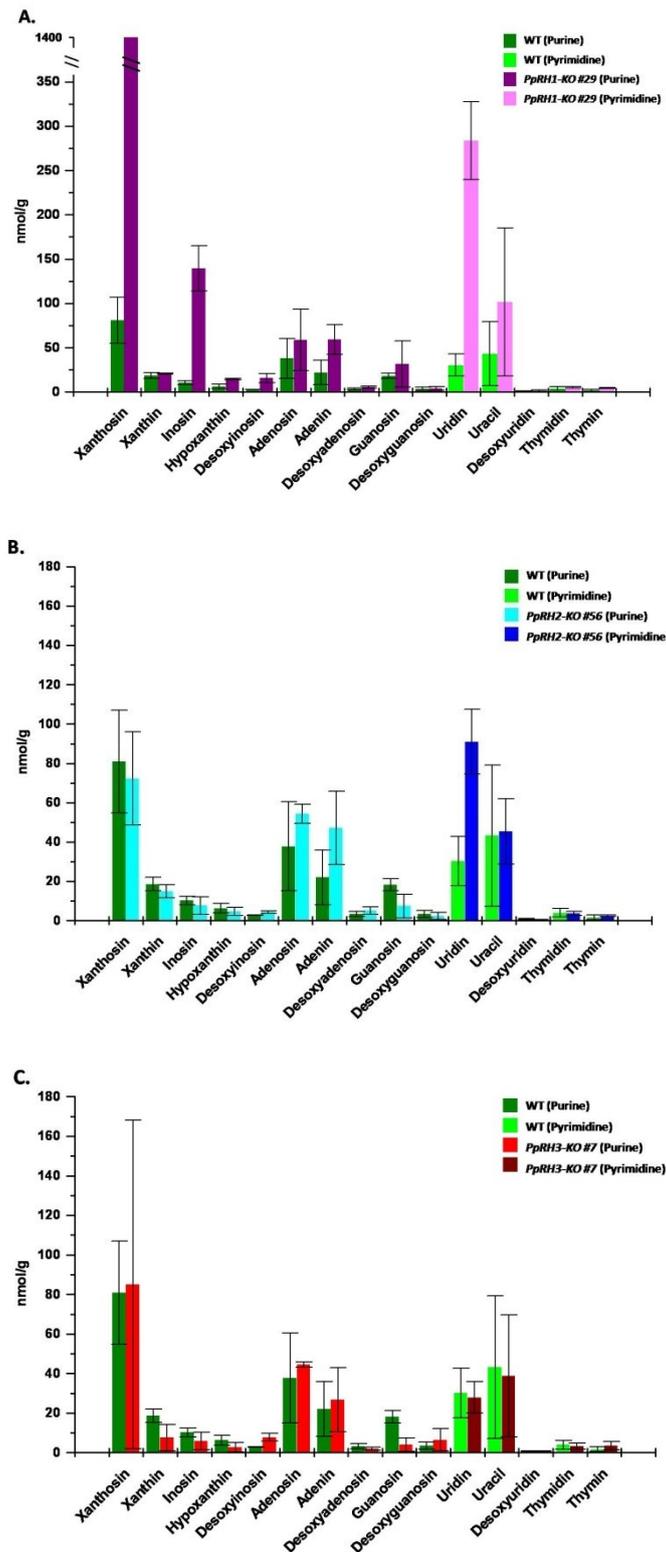


Abb. 3.28 Konzentrationen endogener Purine und Pyrimidine in den Transformanten *PpRH1-KO #29* (A.), *PpRH2-KO #56* (B.) und *PpRH3-KO #7* (C.) im Vergleich zum Wildtyp nach 21 tägiger Kultivierung angegeben in nmol/g TG. Daten wurden mittels LC-MS/MS Messungen erhoben, [$^{15}\text{N}_4$]Inosin wurde als interner Standard zur Quantifizierung verwendet. Dargestellt sind die Mittelwerte von Messungen aus drei unabhängigen Kulturen eines Experimentes. Fehlerbalken geben die Standardabweichung an. In Einzelfällen wurden stark abweichende Werten von der Berechnung ausgeschlossen. Zu beachten ist die unterschiedliche Skalierung der y-Achsen. In Kooperation mit Dr. J. Klein (Stoffwechsellabor, Charité Campus Virchow Klinikum, Berlin, D).

4 Diskussion

Der Metabolismus von Purinen besitzt eine zentrale Bedeutung im pflanzlichen Stoffwechsel. Biochemischen Aspekte zum Purin-Stoffwechsel wurden in der Vergangenheit bereits detailliert untersucht, molekulare Studien wurden hingegen nur in begrenztem Umfang vorgenommen. Auch Gene für Ribohydrolasen, die die hydrolytische Spaltung von Ribosiden in die korrespondierende Base katalysieren, wurden erst kürzlich identifiziert. Hierbei wurde die RH-Familie in *Arabidopsis* hinsichtlich ihrer physiologischen Rolle beschrieben. In dieser Arbeit wurde *in vivo* und *in vitro* RH-Aktivität in dem Bryophyten *Physcomitrella* gemessen sowie molekulare, biochemische und physiologische Aspekte zur RH-Familie aus *Physcomitrella* untersucht. Mögliche Funktionen und die physiologische Rolle von RHs im Purin- und Cytokinin-Stoffwechsel bei *Physcomitrella* werden diskutiert.

4.1 *In vivo* und *in vitro* RH-Aktivität in *Physcomitrella*

Zu Beginn der Studien sollte zunächst festgestellt werden, ob der Modellorganismus *Physcomitrella* generell RH-Aktivität besitzt, d.h. ob nach Applikation eines Ribosids die Bildung der korrespondierenden Base beobachtet werden kann. Allgemein liegen bisher nur wenige Daten zu RHs in Pflanzen vor (1.2). Die zugehörige Enzym-Aktivität wurde für einige Pflanzen beschrieben (z. B. (Abusamhadneh *et al.* 2000, Burch und Stuchbury 1986) und kürzlich wurde eine RH-Genfamilie aus *Arabidopsis* identifiziert (Jung *et al.* 2011, 2009). Zu RHs in Moosen sind bisher keinerlei Informationen veröffentlicht. Die physiologische Bedeutung von RHs im pflanzlichen Stoffwechsel konnte bisher nicht eindeutig geklärt werden. Als eine Komponente des Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsels kommt RHs vermutlich eine Schlüsselfunktion bei der Kontrolle der Ratio zwischen Recycling und Katabolismus von Purin- und Pyrimidin-Metaboliten zu. Außerdem wurde immer wieder eine Beteiligung von RHs an der Kontrolle von Cytokininlevels diskutiert (Mok und Mok 2001, Chen und Kristopeit 1981), so dass sich die vorliegende Arbeit ebenfalls mit dieser Fragestellung befasst.

***Physcomitrella* besitzt RH-Aktivität**

Wie in 3.1 beschrieben, wurde *in vivo* RH-Aktivität nach Applikation des Purin-Ribosids Adenosin zu einer *Physcomitrella* Kultur gemessen. Hierfür wurden Proben aus dem Kulturmedium nach 24 Stunden entnommen und per HPLC analysiert. Die Bildung der Base Adenin konnte eindeutig nachgewiesen werden. Dies stellt die erste Beschreibung von RH-Aktivität in einer Nicht-Samenpflanze dar. Die errechnete *in vivo* Metabolisierungsrate für Adenosin betrug $19 \text{ nmol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ (FG). Bisherige Studien an RHs enthalten zumeist keine Angaben zu *in vivo* Hydrolysierungsraten dieses Enzyms. Lediglich bei *S. tuberosum* wurden an Scheiben der Knolle *in vivo* Messungen der RH-Aktivität mit Adenosin durchgeführt. Riewe *et al.* (2008) ermittelten eine Aktivität von $0,6 \text{ } \mu\text{mol h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ (FG), die somit um den Faktor 30 höher liegt als die für *Physcomitrella* bestimmte *in vivo* Umsatzrate.

Wie bereits zuvor erwähnt, wird in der Literatur die Existenz einer Nukleosid-Phosphorylase in Pflanzen kritisch diskutiert (1.2). Nukleosid-Phosphorylasen sind hauptsächlich aus Tieren bekannt und katalysieren hier die reversible Phosphorolyse von Ribosiden. In Pflanzen erfolgte eine

Beschreibung dieser Enzym-Aktivität bisher nur für Weizenkeimlinge (Chen und Petschow 1978). Das in der Veröffentlichung von Chen und Petschow beschriebene Enzym bevorzugt die Syntheserichtung, d.h. die Ribosid-Bildung aus der Base und Ribose-1-phosphat gegenüber der umgekehrten Reaktion (Basen-Bildung aus Ribosiden). Ganz ausgeschlossen werden kann nicht, dass die bei *Physcomitrella* beobachtete Deribosylierung von Adenosin zu Adenin durch eine Nukleosid-Phosphorylase und nicht durch eine RH erfolgte. Allerdings ist aufgrund der wenigen Beschreibungen des Enzyms das Vorkommen von pflanzlichen Nukleosid-Phosphorylasen als sehr fraglich anzusehen (z.B. Deng und Ashihara 2010). Für den Fall, dass Nukleosid-Phosphorylasen bei Pflanzen vorkommen, steht außerdem der Nachweis der Basen-Bildung aus Ribosiden noch aus. Die bei *Physcomitrella* beobachtete Bildung der Base aus einem Ribosid wird daher der Aktivität von RHs zugeordnet.

Neben *in vivo* Untersuchungen wurden außerdem auch *in vitro* Messungen zur RH-Aktivität in *Physcomitrella* vorgenommen (3.6.3). Proteinextrakte wurden mit Tritium-markiertem Inosin inkubiert und der Umsatz zur Base Hypoxanthin per HPLC vermessen. Für Inosin wurden *in vitro* eine spezifische Aktivität von etwa $0,6-0,8 \text{ pmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ Protein berechnet. Diese erscheinen sehr niedrig, wenn man sie mit Literaturangaben zur RH-Aktivität an Adenosin bei Kaffee ($84 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, Campos *et al.* 2005), Gelber Lupine ($45 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, Abusamhadneh *et al.* 2000), Weizen ($63 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, Chen und Kristopeit 1981) oder Gerste ($90 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$, Guranowski und Schneider 1977) vergleicht. Für *Arabidopsis* wurde von Jung *et al.* (2011) eine *in vitro* Umsatzrate für Inosin an entsalzten Blattextrakten von $17 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ berechnet.

Da der für die *in vitro* Messungen von RH-Aktivität bei *Physcomitrella* verwendete Puffer keinen Phosphat-Zusatz enthielt, kann die bei *Physcomitrella* gemessene Umwandlung des Ribosids zur Base nicht durch die zuvor erwähnte Phosphat-abhängige Nukleosid-Phosphorylase erfolgt sein. Die *in vitro* Messungen stützen daher die Annahme, dass auch die *in vivo* beobachtete Umwandlung von Adenosin zu Adenin durch RHs verursacht wurde.

Bei *Physcomitrella* ist demnach sowohl *in vivo* als auch *in vitro* RH-Aktivität nachweisbar, obgleich beide Aktivitäten im Vergleich zu bisher gemessenen RH-Aktivitäten sehr niedrig sind. Nicht auszuschließen ist, dass die schwachen *in vitro* Aktivitäten beispielsweise durch das Vorliegen eines Inhibitors verursacht werden bzw. bei *in vivo* Messungen andere Enzym-Aktivitäten deutlich stärker ausgeprägt sind und die zu messende RH-Aktivität überlagern.

4.2 Phylogenie von RHs

Phylogenetische Analysen wurden durchgeführt, um einen Überblick über die Verbreitung und die Evolution von RHs im Pflanzenreich zu erhalten und um die aus *Physcomitrella* identifizierten RHs in den Stammbaum von RHs einzuordnen.

Zunächst wurde eine detaillierte BLAST-Suche durchgeführt, bei der in den Datenbanken des NCBI, TIGR (http://blast.jcvi.org/euk-blast/plantta_blast.cgi, TA Accession-Nummern) und DFCI (<http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/plant.html>, TC Accession-Nummern) nach homologen RH-Sequenzen in anderen pflanzlichen Genomen gesucht wurde. Darüberhinaus wurden über das JGI die Genome der Grünalgen *C. reinhardtii* und *V. carteri* sowie das Genom des Moosfarns *S. moellendorffii* gescreent. Bei der Auswahl der Aminosäure-Sequenzen wurde nur solche berücksichtigt, die das RH-spezifische Aspartat-Motiv (Versées und Steyaert 2003) vollständig oder zumindest nahezu

vollständig enthielten. Die in die phylogenetische Stammbaum-Analyse miteinbezogenen Sequenzen finden sich in der Abbildungsunterschrift von Abb. 4.1.

Pflanzliche RHs clustern in zwei Gruppen

Die Homologie-basierte Suche nach *RH*-Genen zeigte, dass diese im Pflanzenreich weit verbreitet sind (Abb. 4.1). In Algen, Moosen, Moosfarne und höheren Pflanzen wurden putative *RH*-Sequenzen gefunden. Ihre Entstehung scheint somit nicht an bestimmte Bedingungen wie den Übergang vom Wasser- zum Landleben angepasst zu sein. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass *RHs* eine grundlegende Funktion in allen pflanzlichen autotrophen Organismen übernehmen.

Die *RH*-Familien in den verschiedenen Organismen weisen ein bis fünf Mitglieder auf, *RHs* werden somit durch relativ kleine Genfamilien repräsentiert. Der Großteil der Spezies verfügt über mehr als ein putatives *RH*-Gen. Für viele der Spezies mit nur einer angeführten putativen *RH*-Sequenz sollte angemerkt werden, dass hierbei häufig noch kein vollständig sequenziertes Genom vorliegt und daher auf unvollständige Datenbanken zugegriffen werden musste.

Wie anhand des erstellten Stammbaumes (Abb. 4.1) deutlich wird, clustern pflanzliche *RHs* hauptsächlich in zwei Gruppen. Somit gibt es größere Sequenzähnlichkeiten zwischen den Gruppenmitgliedern verschiedener Spezies als innerhalb der *RH*-Familien einer Art. Alle Spezies, die über mehr als eine putative *RH*-Sequenz verfügen, haben jeweils mindestens einen Vertreter in beiden Gruppen. Dies deutet auf eine frühe Duplikation von *RHs* während der Evolution hin. Es ist davon auszugehen, dass Mitglieder einer Gruppe ähnliche Eigenschaften aufweisen. Das weit verbreitete Vorkommen von mindestens zwei *RH*-Genen im Genom vieler Pflanzen wirft die Frage nach ihrer unterschiedlichen physiologischen und funktionellen Rolle auf.

Die im Rahmen dieser Arbeit beschriebenen *RHs* aus *Physcomitrella* gruppieren sich ebenfalls in beide Gruppen ein. Während sich PpRH1 in einem Cluster mit AtNSH2, einer Inosin-bevorzugenden *RH* aus *Arabidopsis* (Jung *et al.* 2011), sowie weiteren, nicht genauer charakterisierten *RHs* befindet, clustern PpRH2 und -3 in einer Gruppe mit der zweiten, bisher genauer charakterisierten *RH*, einer Uridin-bevorzugenden *RH* aus *Arabidopsis* (AtNSH1, Jung *et al.* 2009).

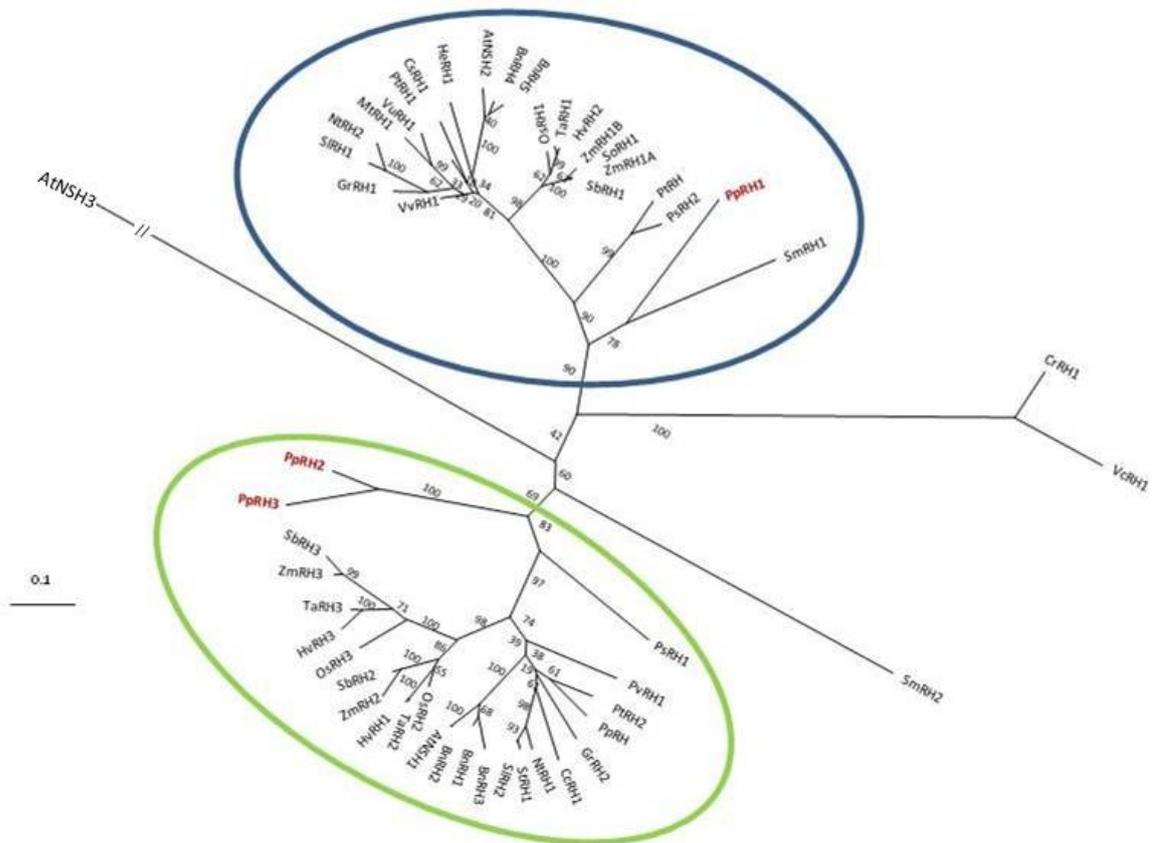


Abb. 4.1 Phylogenetischer Stammbaum für pflanzliche RHs nach *maximum likelihood*-Analyse (PhyML) mit *bootstrap*-Analyse (100 Replikate). Es wurde das LG-Modell der Evolution benutzt. Das zugrunde gelegte Alignment wurde mit dem Programm MUSCLE erstellt; 260 von 918 Positionen (Aminosäuren) wurden nach Bearbeitung mit dem Programm Gblocks verwendet. Die Darstellung erfolgte mit dem Programm TreeView. In rot sind RHs aus *Physcomitrella* dargestellt. Die Berechnung des Stammbaumes erfolgte in Kooperation mit Dr. D. Kopečný (Palacký Universität, Olomouc, CZ). Folgende Sequenzen wurden in die phylogenetische Stammbaum-Analyse miteinbezogen (in Klammern ist jeweils die Anzahl an selektierten Sequenzen je Spezies angegeben): *Physcomitrella patens* (3): PpRH1 (XM_001783178), PpRH2 (XP_001771662), PpRH3 (XP_001752621); *Arabidopsis thaliana* (3): AtNSH1 (At2g36310), AtNSH2 (At1g05620), AtNSH3 (At5g18860); *Brassica napus* (5): BnRH1 (TC127999), BnRH2 (TA33831_3702), BnRH3 (TC115477), BnRH4 (TC117081), BnRH5 (TC114619); *Chlamydomonas reinhardtii* (1): CrRH1 (XM_001696168); *Citrus sinensis* (1): CsRH1 (TA21560_2711, TC12058); *Coffea canephora* (1): CcRH1 (TC9316); *Gossypium raimondii* (2): GrRH1 (TA12637_29730) GrRH2 (TC202453); *Helianthus exilis* (1): HeRH1 (TA415_400408); *Hordeum vulgare* (3): HvrRH1 (AK250537, TA35689_4513, TC200794), HvrRH2 (TA35406_4513), HvrRH3 (AK250050); *Medicago truncatula*: MtrRH1 (TA19359_3880, TC145232); *Nicotiana tabacum* (2): NtrRH1 (TC81540), NtrRH2 (TC91311); *Oryza sativa* (3): OsRH1 (TA42244_4530, NM_001056937), OsRH2 (TA38865_4530, TC331193, NM_001069024), OsRH3 (NM_001070501, TA38865_4530, TC331193); *Phaseolus vulgaris* (1): PvrRH1 (TC22894); *Picea sitchensis* (2): PsrRH1 (EF676318, TA23414_3332, TC99137), PsrRH2 (EF676318, TC109203); *Pinus taeda* (1): PtrRH (TA8237_3352); *Populus trichocarpa* (2): PtrRH1 (XM_002310348, TA16113_3694), PtrRH2 (XM_002309011); *Prunus persica* (1): PprRH (TC14314); *Selaginella moellendorffii* (2): SmRH1 (XM_002974764), SmRH2 (XM_002984237); *Solanum lycopersicum* (2): SlRH1 (AK325443, TA38623_4081, TC226478), SlRH2 (AK322170, TA39295_4081, TC244487); *Solanum tuberosum* (1): StRH1 (TA30129_4113, TC221989); *Sorghum bicolor* (3): SbrRH1 (XM_002455315, TA24750_4558, TC119327), SbrRH2 (TA26675_4558, TC116519), SbrRH3 (XM_002461943, TA25109_4558, TC113907); *Saccharum officinarum* (1): SoRH1 (TA43292_4547); *Triticum aestivum* (3): TarRH1 (TA56209_4565), TarRH2 (TA76228_4565), TarRH3 (TA76014_4565, TC310758); *Vigna unguiculata* (1): VuRH1 (TC12589); *Vitis vinifera* (1): VvrRH1 (XM_002280235); *Volvox carteri*: VcRH1 (XP_002945850); *Zea mays* (4): ZmRH1A (HQ825159), ZmRH1B (HQ825160), ZmRH2 (HQ825161), ZmRH3 (HQ825162).

4.3 Validierung des Genmodells von *PpRH3*

Wie bereits erwähnt, findet sich in der aus dem Genmodell Pp1s5_276V2.1 abgeleiteten Aminosäure-Sequenz von PpRH3 eine leicht abgewandelte Form des RH-typischen Sequenzmotivs, DXXXXXXDD statt DXDXXXDD (3.2). Bisher wurden keine RHs funktionell beschrieben, die dieses Motiv in modifizierter Form aufweisen, so dass unklar ist, ob bei PpRH3 die Fähigkeit zur Hydrolyse von Ribosiden ausgeprägt ist.

Bei der Expression von PpRH3 in verschiedenen *E. coli*-Stämmen unter variierenden Bedingungen konnte kein bzw. nur minimale Mengen an löslichem Protein erhalten werden. Auch die Co-Expression mit einem die Löslichkeit-verbessernden-Tag erbrachte keinen Erfolg (3.3.3). Die Verwendung eukaryotischer Expressionssysteme wie *Pichia pastoris* oder *S. cerevisiae* könnte möglicherweise zur richtigen Faltung des Proteins und damit zu Produktion von löslichem Protein führen.

Vor kurzem wurde mit V1.6 eine neue Assemblierung des *Physcomitrella* Genoms publiziert (V1.6, <http://cosmoss.org/>). Für *PpRH3* wird hierbei ein neues Genmodell vorgeschlagen, aus dem eine veränderte Protein-Sequenz hervorgeht (Pp1s5_276V6.1). Diese enthält das vollständige Sequenzmotiv DXDXXXDD und ist außerdem in seinen Intronpositionen ähnlicher zu den anderen *PpRH*-Familienmitgliedern (Daten nicht gezeigt). Daher wurde angenommen, dass das ursprüngliche Genmodell aus der Assemblierung V1.2 möglicherweise fehlerhaft ist. Zur Überprüfung der cDNA-Sequenz wurde *PpRH3* daher aus einer cDNA-Bank (Reski *et al.* 1995) über PCR amplifiziert und die erhaltenen Produkte sequenziert. Als Primer wurde jeweils ein spezifischer Primer sowie ein Primer aus dem die cDNA-Bank enthaltenen Vektor verwendet. Die erhaltenen Amplifikate bestätigten das neuere Genmodell in großen Teilen. Im 3'-Bereich scheint allerdings keines der zum derzeitigen Zeitpunkt veröffentlichten Genmodelle zutreffend zu sein. Die in Version 1.6 der Genom-Assemblierung mit aufgeführten Sequenzierungsdaten in Form von *illumina reads* (<https://www.cosmoss.org/mgb2/gbrowse/physcome/>) deuten auf eine Translation des in den Genmodellen aus V2.1 und V6.1 als 8. Intron markierten Bereichs hin. Auf Grundlage der über PCR erhaltenen cDNA-Sequenzen wurde daher ein neues Genmodell etabliert (Abb. 4.2, *PpRH3* VPCR). Die aus der cDNA-Bank erhaltene Sequenz deutet darauf hin, dass *PpRH3* acht statt neun Exons enthält und dass ein Großteil des in vorherigen Versionen des Genmodells als 8. Intron markierten Bereichs zur kodierenden Sequenz gehört. Sowohl die auf PCR-Analysen gestützte, neu rekonstruierte cDNA-Sequenz als auch die korrespondierende Protein-Sequenz finden sich im Anhang (6.2.3). Es wäre außerdem auch denkbar, dass es sich bei der erhaltenen cDNA lediglich um eine *splicing*-Variante von *PpRH3* handelt. Zur Analyse des 5'- und 3'-UTRs sowie zum möglichen Auffinden weiterer *splicing*-Varianten, müssten weitere PCR gestützte Analysen vorgenommen werden. Nach gründlicher Verifizierung der cDNA-Sequenz von *PpRH3* könnte die abgeleitete Protein-Sequenz dann erneut zur Herstellung von rekombinantem Protein eingesetzt werden. Außerdem sollten nach Verifizierung der cDNA-Sequenz die in dieser Arbeit vorgenommenen Lokalisierungsexperimente für PpRH3 wiederholt werden (vgl. 4.9). Kinetische Parameter wurden aufgrund der geringen Löslichkeit von PpRH3 nicht bestimmt. Die Validität der *knockout*-Experimente ist von der Korrektur des *PpRH3*-Genmodells nicht betroffen, da hierfür auf genomische Sequenzen zurückgegriffen wurde.

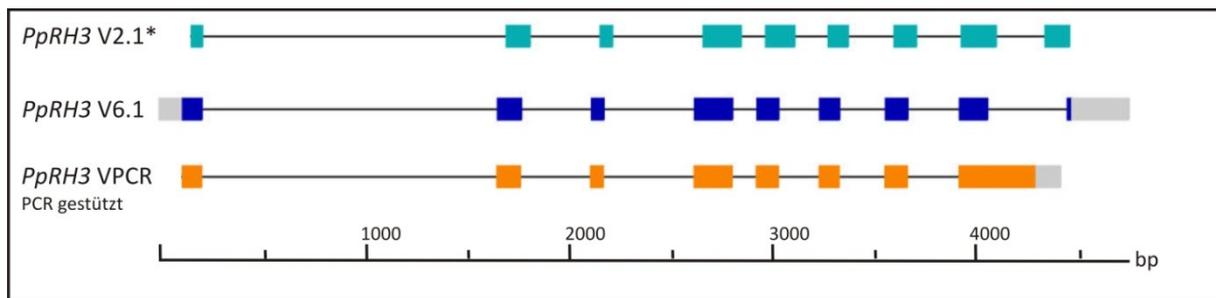


Abb. 4.2 Vergleich verschiedener Genmodells für *PpRH3*. Schematische Darstellung der Intron/Exon-Struktur des Genmodells von *PpRH3* aus der Assemblierung V1.2 und V1.6. (Pp1s5_276V2.1, Pp1s5_276V6.1) sowie der über PCR erhaltenen neuen cDNA-Sequenz (*PpRH3* VPCR). In grau sind untranslatierte Bereiche in der 5'- und 3'-Region dargestellt, farbige Boxen stellen die kodierenden Abschnitte (Exons) dar, die von Introns unterbrochen sind. * Da zu Beginn der Arbeit nur das Genmodell *PpRH3* V2.1 zur Verfügung stand, wurde die daraus abgeleitete cDNA-Sequenz für diese Arbeit verwendet.

4.4 Genomische Organisation von pflanzlichen RHs

Die Untersuchung der genomischen Organisation von *RH*-Genen aus *Physcomitrella* zeigte, dass eine konservierte Intron/Exon-Struktur innerhalb der Gruppe vorliegt. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit werden zunächst die Genmodelle von *PpRH1* und -2 verglichen, wobei folgende Übereinstimmungen gefunden wurden (Abb. 4.3): Die Gene enthalten beide neun Exons und dementsprechend acht Introns. Die größte Länge wurde für das 1. Intron bestimmt (> 692 bp). Das 3. Exon weist mit 59 bp die geringste Anzahl an Basenpaaren auf, wohingegen das 4. Exon die höchste Anzahl an Basenpaaren (> 182 bp) besitzt. Alle Exons stimmen in ihrer Länge nahezu vollständig überein. Im Fall von *PpRH3* wurde im Rahmen dieser Arbeit ein neues Genmodell etabliert, da PCR-Experimente zeigten, dass keines der bisher veröffentlichten Genmodelle richtig ist (4.3). Das neue Genmodell *PpRH3* VPCR weicht wie bereits erwähnt in seiner genomischen Organisation leicht von *PpRH2* und -3 ab: Es enthält acht statt neun Exons, wobei das 8. Exon mit 488 bp das längste Exon darstellt. Das kürzeste Exon bildet auch hier das Exon 3 mit einer Länge von 60 bp. Die Positionen der weiteren Exons sind nahezu identisch mit den Positionen der Exons in den Genmodellen von *PpRH1* und -2. Eine derart übereinstimmende Anordnung von Exons und Introns stützt die Annahme, dass die selektierten *RH*-Gene zu einer hochkonservierten Genfamilie in *Physcomitrella* gehören.

Die Intron/Exon-Struktur ist bei pflanzlichen RHs hoch konserviert

Um einen Überblick über die generelle genomische Organisation von *RH*s im Pflanzenreich zu bekommen, wurden *RH*-Gene aus *Physcomitrella* mit den korrespondierenden Genen der bereits charakterisierten *RH*s *AtNSH1* und *AtNSH2* aus *Arabidopsis* (Loci At2g36310 (*AtNSH1*) und At1g05620 (*AtNSH2*), vgl. Jung *et al.* 2011) sowie putativen *RH*-Sequenzen aus *Z. mays* (*ZmRH1*), dem Moosfarn *S. moellendorffii* (*SmRH1*) und den Grünalgen *V. carteri* (*VcRH1*) und *C. reinhardtii* (*CrRH1*) verglichen (Abb. 4.3). Im Genom von *Z. mays* und *S. moellendorffii* wurden insgesamt vier bzw. zwei putative *RH*-Gene gefunden, von denen hier jeweils nur ein Gen exemplarisch dargestellt ist, da sich die Genstrukturen innerhalb einer Spezies ähnelten.

Wie aus Abb. 4.3 hervorgeht, ist die Intron/Exon-Struktur bei allen untersuchten Sequenzen in ihrer Grundanordnung sehr ähnlich. Lediglich bei den Vertretern von Grünalgen fällt auf, dass die Genarchitektur eine geringere Ähnlichkeit zu den übrigen Sequenzen aufweist. *RH*s aus Dikotylen,

Monokotylen, Moosfarne und Moosen zeigen hingegen eine hoch konservierte genomische Organisation: Die Gene weisen acht Introns auf, wobei das 1. Intron das längste ist (Ausnahme *PpRH3*, *ZmRH1*). Darüberhinaus sind die Intronpositionen zwischen den Organismen hoch konserviert: Außer dem 1. und letzten Exon weisen die übrigen sieben Exons nahezu die gleiche Anzahl an Basenpaaren auf; Exon 4 besitzt die höchste Anzahl an Basenpaaren (Ausnahme *PpRH3*). Die 5'- und 3'-terminalen Exons scheinen entweder grundsätzlich divergenter zu sein oder es handelt sich bei den Längenangaben um fehlerhafte computerbasierte Vorhersagen der entsprechenden Genmodelle. Die Wahrscheinlichkeit, dass Positionen und Länge aller neun Exons hoch konserviert sind, wird aufgrund der Datenlage als relativ hoch eingestuft.

Neben den hohen Übereinstimmungen hinsichtlich der genomischen Organisation der analysierten *RH*-Gene fällt auf, dass die Introns bei *Physcomitrella* (und *Z. mays*) generell länger als bei *Arabidopsis* sind. Während bei *Physcomitrella* die Intronlängen der *RH*-Gene von 154-1454 bp variieren, weisen Introns von *RH*-Genen bei *Arabidopsis* nur 81-276 bp auf. Die bei *Physcomitrella* im Vergleich zu *Arabidopsis* generell größere Intronlänge wurde bereits von Rensing *et al.* (2005) beschrieben.

Die hohe Ähnlichkeit der Intron/Exon-Struktur der *RH*-Gene legt nahe, dass diese aus einem gemeinsamen Vorläufer durch Duplikation entstanden sind. Grünalgen, die sich bereits früher in der Evolution unabhängig von der Linie der Landpflanzen getrennt haben, weisen dementsprechend eine höhere Divergenz auf. Die beschriebene Ähnlichkeit zwischen der Genstruktur bei Bryophyten und Gefäßpflanzen könnte auf eine basale und somit ebenfalls ähnliche Funktion dieser Enzyme im pflanzlichen Stoffwechsel hindeuten. Mögliche Funktionen von RHs werden in 4.11 diskutiert.

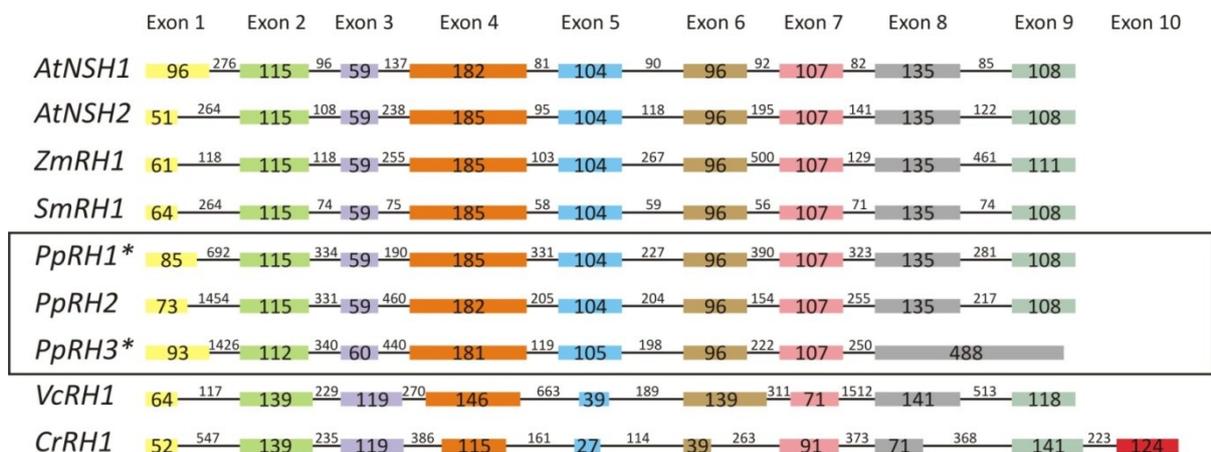


Abb. 4.3 Schematische Darstellung der Intron/Exon-Struktur von ausgewählten *RH*-Genen: *AtNSH1* und -2 aus *Arabidopsis* (Genmodelle: At2g03652.1 (*AtNSH1*) und At1g05620.1 (*AtNSH2*) aus TAIR Datenbank), *ZmRH1* aus *Zea mays* (Genmodell: GRMZM2G029845_T01 aus JGI Datenbank), *SmRH1* aus *Selaginella moellendorffii* (Genmodell: 80581 (e_gw1.3.1381.1) aus JGI Datenbank), *PpRH1*, -2 und -3 aus *Physcomitrella* (Genmodelle: Pp1s357_22V2.1 (*PpRH1*), Pp1s140_172V2.1 (*PpRH2*) aus cosmass genome browser sowie für *PpRH3* das validierte Genmodell *PpRH3* VPCR), *VcRH1* aus *Volvox carteri* (Genmodell: 55637 (e_gw1.1.580.1) aus JGI-Datenbank) sowie *CrRH1* aus *Chlamydomonas reinhardtii* (Genmodell: Cre06.g271050.t1.1 aus JGI Datenbank). *AtNSH3* wurde aufgrund der grundsätzlich anderen Sequenz und seiner Charakterisierung als extrazelluläre RH (Jung *et al.* 2011) nicht in die Analyse miteinbezogen. Aus *Z. mays* und *S. moellendorffii* wurde jeweils nur ein exemplarisches *RH*-Gen dargestellt. Exons sind farbig entsprechend ihrer Länge dargestellt. Die Länge der durchgehenden schwarzen Linie korreliert nicht mit der Länge der Introns. Angegeben sind die jeweiligen Größen in Basenpaaren. * Diese Genmodelle wurden über PCR-Experimente mit cDNA als Template überprüft.

4.5 Funktioneller Nachweis für PpRH1 und PpRH2 als RHs

Rekombinante Proteine von PpRH1 und PpRH2 wurden in *E. coli* hergestellt und über Affinitätschromatografie aufgereinigt. Diese wurden im Anschluss zur Bestimmung der kinetischen Parameter eingesetzt.

4.5.1 Methodendiskussion der eingesetzten Enzym-Assays - Spektrophotometrischer Assay versus HPLC-basierter Assay

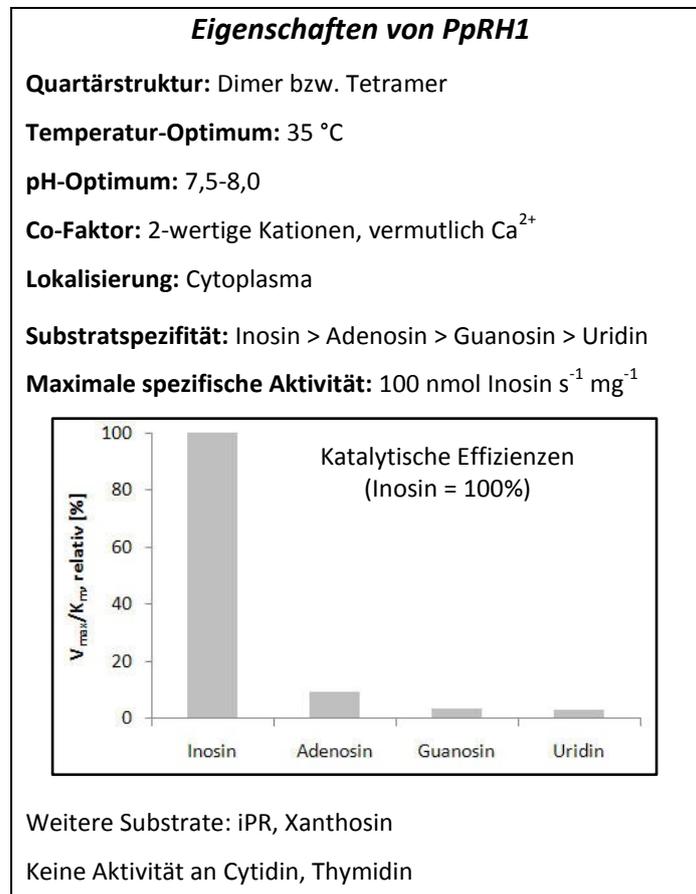
Bevor auf die Ergebnisse zu den gemessenen enzymkinetischen Konstanten der untersuchten RHs eingegangen wird, sollen zunächst die angewandten Enzym-Assays unter methodischen Gesichtspunkten verglichen und diskutiert werden.

Zur Messung von RH-Aktivität wurde zum einen ein spektrophotometrischer Assay nach Parkin (1996), und zum anderen ein HPLC-basierter Assay angewendet. Während beim spektrophotometrischen Assay der Substratverbrauch *online* verfolgt werden kann, ist mit dem HPLC-basierten Assay nur eine Endpunktbestimmung möglich. Daher eignet sich der spektrophotometrische Assay besser, um kinetische Konstanten unter definierten Bedingungen zu messen. Während der Parkin-Assay keine Informationen zur Produktidentität liefert, können sowohl Substrat und Produkt per HPLC eindeutig identifiziert und quantifiziert werden. Daher ist das Anwendungsspektrum des HPLC-basierten Assays größer, da RH-Aktivität auch in inhomogenen Systemen wie Zellextrakten oder Proteinextrakten gemessen werden kann. Ein weiterer Unterschied zwischen den angewandten Methoden besteht darin, dass beim spektrophotometrischen Assay nicht beliebig hohe Substratkonzentrationen eingesetzt werden können bzw. bei hohen Substratkonzentrationen und damit hohen Absorptionen mit einer Limitierung seitens der Photometer-Messtechnik gerechnet werden muss, die dann zu fehlerhaften Messwerten führt. Für Substrate, die eine nur geringe Affinität zum Enzym besaßen und daher in hohen Konzentrationen eingesetzt werden mussten, konnten mittels Parkin-Assay daher teilweise keine kinetischen Parameter ermittelt werden (z.B. Xanthosin). Zur Messung des pH-Optimums wurde der HPLC-basierte Assay verwendet, weil der Anwendung des Parkin-Assays in diesem Fall ebenfalls Grenzen gesetzt sind, da die Differenz der molaren Extinktionskoeffizienten zwischen Substrat und Produkt je nach pH variiert.

Beide Methoden eignen sich prinzipiell, um RH-Aktivität zu messen. Je nach Anwendung wurde daher entschieden, welche Methode besser geeignet erschien und zum Einsatz kam.

4.5.2 Charakterisierung von PpRH1

Zur genaueren Charakterisierung von PpRH1 wurden zunächst einige biochemische Eigenschaften am rekombinanten Protein bestimmt, die zusammenfassend in Box 4.1 dargestellt sind.



Box 4.1 Zusammenfassung der für PpRH1 in dieser Arbeit ermittelten biochemischen Charakteristika.

PpRH1 bildet im Gegensatz zu anderen pflanzlichen RHs neben Dimeren auch Tetramere

Für die Monomere von PpRH1 und PpRH2 wurden anhand der Aminosäure-Sequenzen Molekülmassen von ca. 35 kDa berechnet und *via* SDS-PAGE bestätigt. Die Monomere von bisher beschriebene RHs aus Prokaryoten, Protozoen und verschiedenen Pflanzen weisen Molekülmassen in der Größenordnung von 30-40 kDa auf (z.B. Campos *et al.* 2005, Atkins *et al.* 1989). Insofern fügen sich die RHs aus *Physcomitrella* mit ihrer Molekülmasse in die Reihe der bereits beschriebenen RHs ein.

Hinsichtlich ihrer Quartärstruktur bilden die bisher charakterisierten RHs zumeist Dimere, Trimere oder Tetramere aus. Die Bildung von Oligomeren scheint demnach ein wichtiges generelles Merkmal von RHs zu sein. Daher wird ein Zusammenhang zwischen der Oligomerisierung und der Funktion oder Regulation dieser Proteine angenommen. Für PpRH1 aus *Physcomitrella* wurden zur Bestimmung des Oligomerisierungsgrades native PAGE und Gelfiltration mit rekombinantem Protein durchgeführt (3.4.1). Die anschließend kalkulierten Molekulargewichte zeigen, dass PpRH1 als natives Protein vornehmlich als Homodimer vorliegt, aber auch Tetramere bilden kann. Auch die

vorgenommenen Ansätze zur Aufklärung der Kristallstruktur zeigten, dass PpRH1 als Dimer vorliegt (3.4.2). Während derzeit bekannte pflanzliche RHs nur als Homodimere vorkommend beschrieben wurden (z.B. Campos *et al.* 2005, Abusamhadneh *et al.* 2000), wurden in *E. coli* (z.B. Giabbai und Degano 2004) und einigen Protozoen (z.B. Parkin *et al.* 1991) RHs identifiziert, die in ihrer nativen Form ebenfalls Tetramere bilden. Für die erst kürzlich beschriebenen RHs aus *Arabidopsis* (Jung *et al.* 2011, 2009) ist nicht bekannt, welche Quartärstruktur sie ausbilden. PpRH1 bildet insofern eine Besonderheit, da es die erste pflanzliche RH ist, für die neben der Dimerisierung auch die Tetramerisierung unter nativen Bedingungen beschrieben werden konnte. Allerdings ist zu berücksichtigen, dass die Quartärstruktur von PpRH1 an einem heterolog exprimierten Protein bestimmt wurde, während alle anderen pflanzlichen RHs aus Pflanzenmaterial aufgereinigt und angereichert wurden. Es besteht also die Möglichkeit, dass PpRH1 *in planta* eine andere Quartärstruktur einnimmt. Zur Bestätigung der Quartärstruktur von nativem PpRH1 Protein könnte man PpRH1 homolog in *Physcomitrella* exprimieren (vgl. z.B. Bauer *et al.* 2005) und nach Aufreinigung eine Bestimmung des Oligomerisierungsgrades des Proteins vornehmen.

Das pH-Optimum von PpRH1 ist kompatibel zur cytosolischen Lokalisierung

Als optimale Reaktionsbedingungen für die Aktivität von PpRH1 - getestet anhand des Substrates Inosin - wurde eine Temperatur von 35 °C und ein pH von 7,5-8,0 ermittelt. Diese gemessenen Optima werden im Folgenden mit aus der Literatur bekannten Werten verglichen.

Für das Temperatur-Optimum von RHs existieren nur wenige Daten in der Literatur. Eine aus Gerste isolierte RH weist mit 58 °C ein ungewöhnlich hohes Temperatur-Optimum auf (Guranowski und Schneider 1977). Aus Tee aufgereinigte RHs besitzen ebenfalls relativ hohe Temperatur-Optima von 45-50 °C (Imagawa *et al.* 1979). Da es sich hierbei jeweils um natives und nicht wie bei PpRH1 um rekombinantes Protein handelte, könnten die Unterschiede auch auf die verschiedene Herkunft der Proteine zurückzuführen sein. Das rekombinante AtNSH1 Protein aus *Arabidopsis* besitzt hingegen mit 35 °C das gleiche Temperatur-Optimum wie PpRH1 (Engel und Moffatt, persönliche Mitteilung).

Bezüglich ihres pH-Optimums variieren die bisher beschriebenen RHs sehr stark. Viele RHs scheinen tolerant gegenüber Änderungen des pHs zu sein, weisen also kein eng gefasstes pH-Optimum auf. Eine aus Kaffee isolierte RH beispielsweise besitzt ein pH-Optimum bei pH 6,0, behält aber 50 % der maximalen Aktivität auch bei pH 4,5 und pH 7,7 (Campos *et al.* 2005). Die meisten pflanzlichen RHs entfalten ihre höchste Aktivität in niedrigeren pH-Bereichen. Das pH-Optimum einer aus Weizen isolierten RH (Chen und Kristopeit 1981) liegt beispielsweise im sauren Bereich bei pH 4,7, ähnlich wie das einer aus Rosenkohl isolierten RH (pH-Optimum: 4,0; Mazelis und Creveling 1963). Andere RHs bevorzugen einen pH von 6,0 (z. B. Tomate, Burch und Stuchbury 1986). Nur wenige RHs weisen wie PpRH1 ein noch höheres pH-Optimum auf. Hierzu zählt eine aus Gelber Lupine isolierte RH mit einem pH-Optimum von 7,5 (Abusamhadneh *et al.* 2000 bzw. Guranowski 1982), die aus *Arabidopsis* isolierte AtNSH1 mit einem pH-Optimum von pH 7,5-8,0 (Engel und Moffatt, persönliche Mitteilung) sowie viele der aus Mikroorganismen isolierten RHs (z.B. Magni *et al.* 1975, Parkin 1996).

Lokalisierungsstudien auf zellulärer Ebene wiesen eine cytoplasmatische Lokalisierung für PpRH1 (sowie PpRH2 und -3) nach (3.5), was im Einklang mit dem gemessenen pH-Optimum steht, dass offenbar auf die im Cytoplasma vorherrschenden pH-Bedingungen (pH 7) abgestimmt ist.

Calcium könnte als Co-Faktor von PpRH1 fungieren

Für einige RHs wurde eindeutig nachgewiesen, dass Calcium als Co-Faktor fungiert (z.B. *T. vivax*, Versées *et al.* 2001). Suzwart *et al.* (2006) beschreiben beispielsweise für eine RH aus Gelber Lupine eine Stimulation der Enzym-Aktivität durch Zugabe von Calcium. Die Anwesenheit von Calcium in einer Konzentration von 2 mM führte zu einer 6fach gesteigerten Enzym-Aktivität. Für alle weiteren isolierten RHs aus Pflanzen liegen entweder keine Messungen hierzu vor oder es konnte keine positive Auswirkung von Calcium auf die Aktivität gemessen werden (z.B. Imagawa *et al.* 1979, Guranowski und Schneider 1977). Die enzymatische Charakterisierung von RHs aus Prokaryoten und Protozoen ist in der Literatur weitaus umfassender beschrieben als für RHs aus Pflanzen. Insbesondere durch die Aufklärung der Kristallstrukturen von protozoischen RHs (z.B. Giabbai und Degano 2004, Shi *et al.* 1999) liegen viele Daten zur strukturellen Basis der Substratspezifität und dem katalytischen Mechanismus der RH-Reaktion vor (z.B. Giabbai und Degano 2004, Versées und Steyaert 2003). Verschiedene Autoren bestätigen, dass im aktiven Zentrum von RHs Ca^{2+} als 2-wertiges Kation gebunden ist, welches in die Bindung und Umsetzung des Substrates involviert ist (Versées *et al.* 2001, Degano *et al.* 1998). Das bereits genannte RH-typische Sequenzmotiv DXDXXXDD ist hierbei sowohl für die richtige Koordination des Calcium-Ions als auch für die Interaktion mit dem Substrat verantwortlich. Dass Calcium als Co-Faktor von RHs fungiert, wurde außerdem auch experimentell beispielsweise für eine RH aus *C. fasciculata* über spektroskopische Elementanalyse bestätigt (Degano *et al.* 1998). Während das Vorhandensein von Calcium als Co-Faktor für mikrobielle RHs als gesichert angesehen werden kann, bleibt die Frage nach dem Co-Faktor bei pflanzlichen RHs noch offen. Diese Frage ist vermutlich erst zu beantworten, wenn die erste Kristallstruktur einer pflanzlichen RH aufgeklärt ist. Die mit rekombinantem PpRH1 Protein vorgenommenen Enzym-Assays konnten nicht eindeutig bestätigen, dass Calcium als Co-Faktor fungiert, da eine Addition von Calcium nicht zu einer Aktivitätssteigerung führte (3.4.4.3). Möglicherweise war das PpRH1 Protein bereits vor der Ca^{2+} -Zugabe gesättigt. Da aber nach Inkubation mit EDTA und EGTA eine Minderung der RH-Aktivität zu messen war, ist es als sehr wahrscheinlich anzusehen, dass Ca^{2+} oder andere 2-wertige Kationen von PpRH1 als Co-Faktoren benötigt werden.

PpRH1 kodiert für eine Purin-bevorzugende RH

Die Messung des Substratspektrums von PpRH1 am rekombinanten Protein aus *E. coli* erfolgte unter Anwendung des spektrophotometrischen Enzym-Assays. Als bevorzugtes Substrat wurde eindeutig Inosin (K_m 82 μM , Tab. 3.2) identifiziert. Als weitere Substrate wurden Adenosin (K_m 101 μM), Guanosin (K_m 166 μM), Uridin (K_m 1485 μM) sowie Xanthosin und das Cytokinin iPR bestimmt. Basierend auf der katalytischen Effizienz (V_{\max}/K_m) ergibt sich folgende Reihung für die PpRH1-Substrate Inosin > Adenosin > Guanosin > Uridin. Keine Aktivität wurde an den Pyrimidinen Cytidin und Thymidin gemessen. Die gemessenen K_m -Werte zeigen, dass PpRH1 Purin-Riboside eindeutig mit höherer Affinität als Pyrimidin-Riboside bindet. Die Maximalgeschwindigkeit für Uridin ist zwar deutlich höher als für einige Purine, führt aber durch den hohen K_m insgesamt nicht zu einer hohen katalytischen Effizienz ($V_{\max}/K_m = 0,03$).

Vergleicht man die katalytischen Effizienzen der Substrate von PpRH1, so fällt auf, dass diese im Vergleich zu Inosin bei allen anderen Substraten deutlich niedriger sind. Bereits für das 2. beste Substrat - Adenosin - reduziert sich die katalytische Effizienz um den Faktor 10. Das ist insofern

bemerkenswert, als dass sich die beiden Substanzen strukturell lediglich geringfügig unterscheiden. Für Guanosin und Uridin wurde sogar eine Reduktion um Faktor 42 bzw. 125 gemessen. PpRH1 scheint somit in hohem Maße spezifisch für Inosin zu sein.

Für Vergleiche mit anderen pflanzlichen RHs hinsichtlich des Substratspektrums sowie der katalytischen Effizienz des rekombinanten Proteins liegen derzeit nur Daten aus *Arabidopsis* vor (Jung *et al.* 2011, 2009). Das Substratspektrum von AtNSH1 umfasst das Pyrimidin Uridin, sowie die Purine Inosin, Adenosin, Xanthosin und iPR mit K_m -Werten von 0,8; 1,4; 0,7; 1,7 und 0,4 mM. Berücksichtigt man die maximale katalytische Aktivität für die genannten Substrate, ergibt sich für AtNSH1 die folgende Reihung: Uridin > Xanthosin > Inosin > Adenosin > iPR. AtNSH1 und PpRH1 unterscheiden sich somit hinsichtlich ihres Hauptsubstrates: Während AtNSH1 das Pyrimidin Uridin bevorzugt, setzt PpRH1 bevorzugt das Purin Inosin um. Die gemessenen K_m -Werte liegen außerdem im Fall von PpRH1 im μ molaren Bereich, während für AtNSH1 Werte im mmolaren Bereich gemessen wurden. Daraus lässt sich ableiten, dass PpRH1 eine deutlich höhere Affinität zu seinen Substraten besitzt bzw. an deutlich geringere Substratkonzentrationen angepasst ist. In der Literatur wurde bisher nur fragmentarisch beschrieben, in welchen Konzentrationen Purine und Pyrimidine *in planta* auftreten. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher auch LC-MS/MS-basierte Messungen der Gehalte an Purinen und Pyrimidinen im Gewebe von *Physcomitrella* durchgeführt (3.6.5). Berechnet man anhand dieser Daten näherungsweise die intrazellulären Konzentrationen bezogen auf das Frischgewicht (Annahmen: 1 g TG entspricht ca. 90 g FG; 1 g FG entspricht ca. 1 ml Zellvolumen), ergeben sich nmolare Gewebe-Konzentrationen für die gemessenen Purin- und Pyrimidin-Riboside (3.6.5.1). Die μ molaren K_m -Werte für PpRH1 liegen somit deutlich oberhalb der gemessenen Gewebe-Konzentration.

Inosin-umsetzende RHs sind aus Bakterien (Petersen und Møller 2001), Hefe (Kurtz *et al.* 2002), Pilzen (Abdel-Fatah *et al.* 2003) und Protozoen (Shi *et al.* 1999, Parkin *et al.* 1991) bekannt. Für Pflanzen sind einige Purin-bevorzugende RHs beschrieben, wobei es Adenosin-spezifische RHs gibt, d.h. solche die Inosin nicht umsetzen (Riewe *et al.* 2008, Le Floc'h und Lafleuriel 1981, Imagawa *et al.* 1979) und andere RHs, die auch geringe Aktivität an Inosin zeigen (Abusamhadneh *et al.* 2000).

Inosin-bevorzugende RHs aus Pflanzen wurden in der Literatur bisher nur drei beschrieben. Von Jung *et al.* (2011) wurde in *Arabidopsis* eine Inosin-bevorzugende RH (AtNSH2) durch die Charakterisierung entsprechender Überexpressionsmutanten identifiziert. Nach Überexpression von AtNSH2 wurden deutlich gesteigerte Hydrolyse-Raten für Inosin gemessen, während die Hydrolyse-Raten für andere Purin- und Pyrimidin-Riboside weitestgehend unbeeinflusst blieben. Da kein rekombinantes AtNSH2 Protein erhalten wurde, können keine Vergleiche mit den kinetischen Daten von PpRH1 gezogen werden. Eine weitere Inosin-bevorzugende RH wurde von Le Floc'h und Lafleuriel (1981) aus Jerusalem-Artischocke isoliert. Der gemessene K_m -Wert für Inosin von 2,5 μ M spiegelt eine hohe Inosin-Affinität wider, die noch über der des rekombinanten PpRH1 Proteins liegt. Als weiteres Substrat dieser RH wurde zusätzlich Guanosin identifiziert. Außerdem wurde aus Gelber Lupine eine Inosin-bevorzugende RH aufgereinigt (Guranowski 1982) und ein K_m von 65 μ M für Inosin ermittelt. Neben Inosin wurden von dieser RH auch Adenosin und Guanosin umgesetzt. Zumindest hinsichtlich der Substratspezifität scheinen sich dieses Enzym und PpRH1 sehr zu ähneln. Da keine weiteren Daten zu kinetischen Parametern oder zur Aminosäure-Sequenz der RH aus Gelber Lupine vorliegen, können keine weiteren Vergleiche zwischen den beiden Proteinen gezogen werden.

4.5.3 Charakterisierung von PpRH2

PpRH2 besitzt schwach ausgeprägte RH-Aktivität und bevorzugt Pyrimidine

Für das rekombinante Protein von PpRH2 wurde eine insgesamt nur sehr geringe Aktivität in Relation zur Menge an eingesetztem Protein festgestellt (Tab. 3.2). Dieses Ergebnis wurde anhand unterschiedlicher Expressions- und Aufreinigungsansätze mehrfach bestätigt. Schwache Umsätze wurden für Xanthosin und iPR gemessen, für das Pyrimidin Uridin wurde ein K_m von 1015 μM zusammen mit einer maximalen katalytischen Aktivität von 27 $\text{nmol s}^{-1} \text{mg}^{-1}$ bestimmt. Die Purine Inosin, Adenosin und Guanosin wurden nicht umgesetzt, ebenso wie die Pyrimidine Cytidin und Thymidin.

Derart geringe enzymatische Aktivitäten von PpRH2 könnten damit zu erklären sein, dass die Expression in einem prokaryotischen System zu einer inkorrekten Faltung des Proteins und damit zu einer reduzierten Aktivität führt. Außerdem wäre denkbar, dass das getestete Substratspektrum für PpRH2 nicht weit genug gewählt wurde. Die Protein-Sequenzen von PpRH1 und PpRH2 stimmen zwar in den Aminosäuren an katalytisch wichtigen Positionen nach Versées *et al.* (2001) überein (Abb. 3.3), die vorgenommenen phylogenetischen Analysen gruppieren PpRH1 und -2 allerdings in zwei verschiedene Gruppen ein (Abb. 4.1). Ob ein ähnliches Substratspektrum für PpRH1 und PpRH2 zu erwarten ist, kann daher zu diesem Zeitpunkt nicht eindeutig bestimmt werden (vgl. 4.6). Auch Kim *et al.* (2006) stellten bei der Charakterisierung zweier RHs aus dem Bakterium *Corynebacterium ammoniagenes* fest, dass die Enzyme trotz der Übereinstimmung von katalytisch wichtigen Aminosäuren ein unterschiedliches Substratspektrum aufwiesen.

Hinsichtlich der schwachen Aktivität von PpRH2 konnten Jung *et al.* (2011) eine ähnliche Beobachtung für eine RH aus *Arabidopsis* machen: Für AtNSH2 konnte zwar heterolog exprimiertes Protein erhalten werden, jedoch wurde weder nach Expression in einem prokaryotischen noch nach Expression in einem eukaryotischen System Aktivität des Proteins nachgewiesen. Da PpRH2 bisher nur in einem prokaryotischen Organismus exprimiert wurde, besteht die Möglichkeit, dass durch die Expression von PpRH2 in einem Eukaryoten, z.B. *P. pastoris*, lösliches Protein mit einer höheren Aktivität erhalten werden kann. Eine methodische Alternative wäre es, PpRH2 in seinem Ursprungsorganismus *Physcomitrella* zu überexprimieren (vgl. z.B. Bauer *et al.* 2005), um auf diesem Weg eventuell funktionelles PpRH2 Protein zu erhalten.

Die kürzlich veröffentlichte neue Assemblierung des *Physcomitrella* Genoms (V1.6, <http://cosmoss.org/>) enthält ein leicht verändertes Genmodell für *PpRH2* (Pp1s140_172V6.1). Die abgeleitete Protein-Sequenz enthält am N-Terminus 13 zusätzliche Aminosäuren (MVGEETMDRSADL) und weist einen veränderten C-Terminus auf (siehe Anhang, 6.2.2). Es wäre daher auch denkbar, dass die verwendete Aminosäure-Sequenz von PpRH2 (basierend auf dem Genmodell Pp1s140_172V2.1) nicht vollständig bzw. inkorrekt war und das Protein daher nur geringe Aktivität zeigte. Das neue Genmodell der Assemblierung V1.6 wird zumindest im 5'-Bereich durch neue Sequenzierungsdaten in Form von *illumina reads* gestützt (<https://www.cosmoss.org/mgb2/gbrowse/physcome/>). Bei durchgeführten PCR-Ansätzen zur Amplifikation von *PpRH2* aus verschiedenen cDNA-Templates (Daten nicht gezeigt) konnte das neue Genmodell im 5'-Bereich allerdings nicht bestätigt werden. Für den 3'-Bereich wurden keine eindeutigen Ergebnisse erhalten. Zur Verifizierung der cDNA-Sequenz von *PpRH2* sollten daher weitere PCR-basierte Experimente vorgenommen werden. Die erhaltene

cDNA-Sequenz könnte dann erneut zur Herstellung von rekombinantem Protein in einem pro- oder eukaryotischen System verwendet werden.

Aus der Literatur ist bekannt, dass einige Proteine zur Erlangung ihrer Funktionalität Heterodimere ausbilden. Auch wenn bisher das Auftreten eines Heterodimers für RHs nicht beschrieben wurde, wäre es denkbar, dass PpRH2 zur vollständigen Ausprägung der Aktivität ein Heterodimer mit einem anderen Protein bildet. Versuche zur Formung eines Heterodimers aus PpRH2 und PpRH1 konnten dies weder eindeutig bestätigen noch widerlegen (3.4.4.4). Die erhaltenen Ergebnisse deuten auf eine mögliche Interaktion von PpRH1 und -2 hin, die allerdings in einer Hemmung der Aktivität von PpRH1 resultiert. Weitere Experimente sind nötig, um diese Annahme zu verifizieren.

Die sehr hohe Sequenzähnlichkeit (67 %) zwischen den Aminosäure-Sequenzen von PpRH2 und PpRH3 könnte auch für die Bildung eines Heterodimers aus diesen beiden Proteinen sprechen. Leider konnten Versuche hierzu nicht durchgeführt werden, da kein lösliches Protein von PpRH3 erhalten wurde (3.3.3). Eine Co-Expression von PpRH2 und PpRH3 beispielsweise im pETDuet™-Expressionssystem (Novagen) könnte zum einen die Löslichkeit von PpRH3 verbessern und zum anderen die Frage nach der Heterodimerbildung beantworten.

4.6 Sequenz-basierte Klassifizierung von RHs aus *Physcomitrella*

Bisher charakterisierte RHs lassen sich aufgrund ihrer Substratspezifität in drei Gruppen einteilen (Tab. 4.1). Die erste Gruppe umfasst RHs die als Substrate Purine bevorzugen, die zweite solche, die als Substrate Pyrimidine bevorzugen und zur dritten Gruppe gehören RHs, die in ihrer Substratspezifität Basen-unspezifisch sind, d.h. sowohl Purine als auch Pyrimidine umsetzen können. Diese Klassifizierung wurde auf Grundlage der aus Protozoen charakterisierten RHs eingeführt (Versées *et al.* 2001). Aufgrund ihrer Substratspezifität gruppieren sich pflanzlichen RHs aus *Physcomitrella* und *Arabidopsis* wie folgt ein: PpRH1, AtNSH2 und AtNSH3 gehören zu der ersten Gruppe, den Purin-bevorzugenden RHs. PpRH2 hingegen bevorzugt Pyrimidine und bei AtNSH1 handelt es sich um eine Basen-unspezifische RH.

Tab. 4.1 Eingruppierung mikrobieller und pflanzlicher RHs aufgrund ihrer Substratspezifität nach (Versées *et al.* 2001).

Purin-bevorzugende* RHs	Pyrimidin-bevorzugende* RHs	Basen-unspezifische* RHs
IAG-RH aus <i>Trypanosoma brucei brucei</i> (Parkin 1996) - IG-RH aus <i>Crithidia fasciculata</i> (Estupiñán und Schramm 1994) - IAG-RH aus <i>Trypanosoma vivax</i> (Versées <i>et al.</i> 2001) - AtNSH2 aus <i>Arabidopsis</i> (Jung <i>et al.</i> 2011) - AtNSH3 aus <i>Arabidopsis</i> (Jung <i>et al.</i> 2011)	- CU-RH aus <i>E. coli</i> (RihA und RihB) (Giabbai und Degano 2004, Petersen und Møller 2001)	- IU-RH aus <i>Crithidia fasciculata</i> (Parkin <i>et al.</i> 1991) - IU-RH aus <i>Leishmania major</i> (Shi <i>et al.</i> 1999) - IU-RH aus <i>E. coli</i> (RihC) (Petersen und Møller 2001) - AtNSH1 aus <i>Arabidopsis</i> (Jung <i>et al.</i> 2011, 2009)
- PpRH1 aus <i>Physcomitrella</i> (diese Arbeit)	- PpRH2 aus <i>Physcomitrella</i> (diese Arbeit)	

*auf die zwei Hauptsubstrate bezogen

Zusätzlich zu den Ähnlichkeiten bezüglich der Substratspezifität werden auch immer wieder Zusammenhänge zwischen Substratspezifität und Sequenzhomologien beschrieben (Versées und Steyaert 2003). Hierbei geht es zum einen um die Homologie über die gesamte Protein-Sequenz und zum anderen um die Übereinstimmung einzelner Aminosäuren an katalytisch wichtigen Positionen.

Vergleicht man die Sequenzen von PpRHs über ihre gesamte Länge mit bereits klassifizierten RHs so kann die höchste Ähnlichkeit auf Aminosäure-Ebene für PpRH1 mit einer Pyrimidin-bevorzugenden RH aus *E. coli* (RihA, Petersen und Møller 2001) gefunden werden (34 %), während PpRH2 und -3 Ähnlichkeit mit RihC (Petersen und Møller 2001), einer Basen-unspezifischen RH aus *E. coli*, aufweisen (jeweils 33 %).

Versées *et al.* (2001) identifizierten anhand der 3D-Struktur einer RH aus *T. vivax* katalytisch wichtige Aminosäure-Reste (in Abb. 3.3 markiert), die mit dem Ribose-Anteil und/oder der Base des Substrates interagieren. Während die mit dem Zucker-Anteil interagierenden Aminosäuren relativ konserviert bei den verschiedenen mikrobiellen RHs sind, treten Varianzen bei den mit der Base interagierenden Resten auf. Laut den Autoren kann sogar lediglich anhand der An- oder Abwesenheit eines Histidins bzw. Tryptophans an einer bestimmten Position innerhalb des aktiven Zentrums zwischen Purin-bevorzugenden und Basen-unspezifischen Enzymen unterschieden werden. Basen-unspezifische RHs weisen einen Histidin-Rest innerhalb des Sequenzmotives VHDP auf, während bei Purin-bevorzugenden RHs an der gleichen Position ein Tryptophan-Rest zu finden ist (Sequenzmotiv YAWD). Demnach würden alle drei RHs aus *Physcomitrella* in die Gruppe der Basen-unspezifischen RHs clustern, was nach bisheriger Kenntnis der Substratspezifität zumindest für PpRH1 jedoch nicht zutreffend ist. Auch Versées und Steyaert (2003) äußerten bereits die Vermutung, dass die bisher angenommene Korrelation zwischen Aminosäure-Sequenz und Substratspezifität und die damit verbundene Klassifizierung der RHs nicht mehr zutreffend ist. So gruppieren sich beispielsweise auch die aus *E. coli* identifizierten RHs RihA und RihB aufgrund ihrer Sequenz in die 3. Gruppe (Basen-unspezifische RHs) ein, zählen aber aufgrund ihrer experimentell ermittelten Substratspezifität (Petersen und Møller 2001) zu den Pyrimidin-bevorzugenden RHs.

Demnach ist es nach bisherigem Kenntnisstand nicht möglich, lediglich aufgrund der vorliegenden Aminosäure-Sequenz zutreffende Vorhersagen zur Substratspezifität von RHs zu machen.

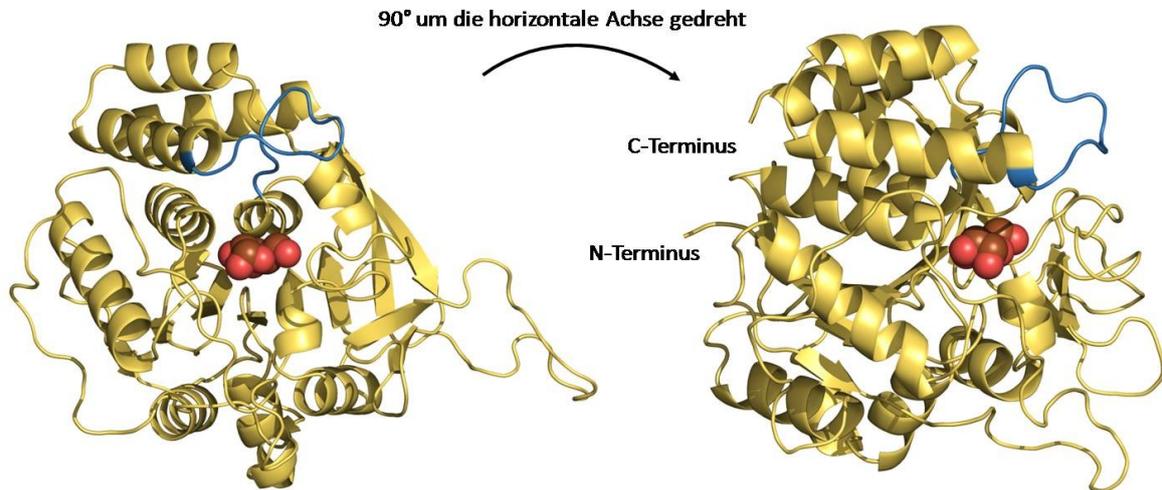
Wie erwähnt, wurden pflanzliche RHs bisher nur im Detail aus *Arabidopsis* und *Physcomitrella* beschrieben. Zur Erstellung eines RH-Stammbaumes wurde in pflanzlichen Genomen nach RH-Sequenzen gesucht. Wie die Abb. 4.1 zeigt, gibt es in Pflanzen zwei Gruppen von RHs, von denen anzunehmen ist, dass sie sich in ihren biochemischen Eigenschaften wie der Substratspezifität unterscheiden. Erste Daten zu katalytisch wichtigen Aminosäuren in pflanzlichen RHs wurden im Rahmen dieser Arbeit erhoben (4.7). Die Entschlüsselung der 3D-Struktur einer RH aus Pflanzen würde sicherlich einen entscheidenden Beitrag zu einem besseren Verständnis des Zusammenhangs zwischen Aminosäure-Sequenz und biochemischen Eigenschaften von pflanzlichen RHs liefern.

4.7 Hypothetische 3D-Struktur von PpRH1 und Hinweise auf katalytisch wichtige Aminosäuren

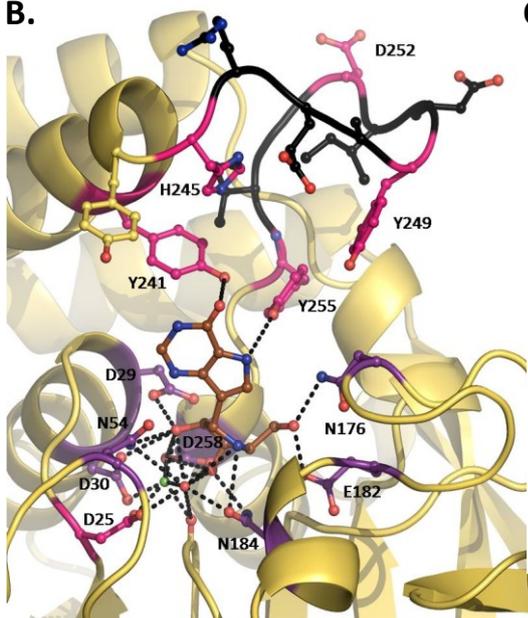
Wie bereits erwähnt, besitzen die RHs aus *Physcomitrella* nur eine sehr geringe Homologie mit bereits im Detail charakterisierten RHs aus Protozoen und Bakterien (< 33 %). Über ein Homologie-

basiertes-Modelling wurde die mögliche Struktur des aktiven Zentrums von PpRH1 etabliert, um solche Aminosäure-Reste zu identifizieren, die an der Bindung des Substrates beteiligt sein könnten.

A.



B.



C.

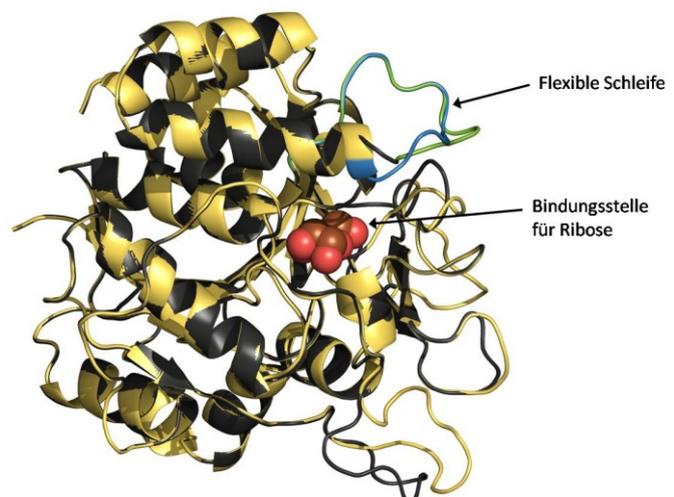


Abb. 4.4 Hypothetische 3D-Strukturen von (A.) PpRH1 Monomer, (B.) Aktives Zentrum von PpRH1, (C.) Übereinanderlegung der Monomere von PpRH1 und PpRH2. Als Template diente die Struktur einer Pyrimidinbevorzugenden RH aus *E. coli* (PDB 1YOE, Ähnlichkeit zu PpRH1 33 %). In (A.) ist das Monomer von PpRH1 aus zwei verschiedenen Ansichten dargestellt. Die flexible Schleife ist blau, in rot sind die Sauerstoff-Atome der Ribose zu sehen. In (B.) ist das hypothetische Modell zum katalytischen Zentrum von PpRH1 dargestellt. In Schwarz ist die flexible Schleife, in violett die mit der Ribose interagierenden Aminosäure-Reste und in pink die mutagenisierten Aminosäure-Reste dargestellt. Im aktiven Zentrum ist der Inhibitor Immucillin-H gebunden (in braun), der aus dem PDB-File einer RH aus *T. vivax* übertragen wurde (PDB 2FF2, Versées *et al.* 2006). (C.) zeigt eine Superposition von PpRH1 (gelb) und PpRH2 (schwarz). Die Position der flexiblen Schleife fehlt in den meisten 3D-Strukturen. Die 3D-Strukturmodelle wurden mit den Programmen Swiss-Model und ESyPred3D, Abbildungen wurden mit PyMOL (Delano Scientific LLC, <http://www.pymol.org/>) erstellt. In Kooperation mit Dr. D. Kopečný (Palacký Universität, Olomouc, CZ).

Neben einem Beitrag zum besseren Verständnis der Substratspezifität wurde außerdem die Erzeugung einer inaktiven Form des PpRH1 Proteins angestrebt. Diese wäre besonders gut für Co-Kristallisierungsansätze geeignet, bei dem zusammen mit dem Protein kristallisiertes Substrat nicht umgesetzt und im aktiven Zentrum gebunden vorliegen würde und somit Einblicke in die Mechanismen der Substratbindung liefern könnte.

Als Template für das Homologie-basierte Modelling wurde die Kristallstruktur einer Pyrimidin-bevorzugenden RH aus *E. coli* (PDB 1YOE) ausgewählt, da diese von allen vorliegenden RH-Kristallstrukturen die höchste Ähnlichkeit mit PpRH1 (33 %) besaß. Die Berechnung der 3D-Strukturen erfolgte unter Verwendung des Programmes Swiss-Model (<http://swissmodel.expasy.org>, Arnold *et al.* 2006) und ESyPred3D (<http://www.fundp.ac.be/sciences/biologie/urbm/bioinfo/esypred/>, Lambert *et al.* 2002). Basierend auf dem in Abb. 4.4 gezeigten Modell, wurden angenommene katalytisch wichtige Aminosäure-Reste für eine *site directed mutagenesis* ausgewählt, um deren Beteiligung an der Substratbindung zu überprüfen. Nach heterologer Überexpression in *E. coli* wurden die biochemischen Eigenschaften der erzeugten Mutanten Proteine untersucht und mit denen des nativen Proteins verglichen. Diese Arbeiten wurden in Kooperation mit Dr. D. Kopečný und Dr. M. Tylichová (Palacký Universität, Olomouc, CZ) durchgeführt und werden an dieser Stelle auszugsweise diskutiert.

Die folgenden Mutanten Proteine von PpRH1 wurden mit Hilfe des QuikChange® Site-Directed Mutagenesis Kits von Stratagene hergestellt: D25A, Y241A, H245A, Y249A, D252A und Y255A (pink in Abb. 4.4 B.). Während D25 anhand der hypothetischen 3D-Struktur eine Funktion bei der Ausbildung des katalytischen Zentrums zugeschrieben wird, könnten die anderen Aminosäure-Reste eine Interaktion über Wasserstoffbrückenbindungen mit der 6-Oxo bzw. 6-Amino-Gruppe von Inosin bzw. Adenosin eingehen. Bei D252 handelt es sich um eine Aminosäure die innerhalb einer flexiblen Schleife lokalisiert ist. Da die Positionierung der flexiblen Schleife nur schwer vorherzusagen ist, ist eine Interaktion mit dem Substrat nicht auszuschließen.

Nach Überexpression in *E. coli* (Vektor pCDFDuet, Novagen) wurden die kinetischen Parameter, wie bereits für PpRH1 beschrieben (3.4.4.2), ermittelt (Tab. 4.2, Abb. 4.5). Hierbei wurden zunächst kinetische Konstanten mit dem Substrat Inosin gemessen und dann die Aktivität an weiteren Substraten (Adenosin, Guanosin, Uridin und iPR) getestet. Von allen oben aufgeführten Mutanten wies die Mutante D25A die stärksten Veränderungen auf: Für keines der getesteten Substrate wurde Aktivität nachgewiesen ($< 0,01 \text{ nmol s}^{-1} \text{ mg}^{-1}$). Die vermutete Beteiligung dieser Aminosäure an der Ausbildung des aktiven Zentrums von PpRH1 konnte somit bestätigt werden. Die Mutanten D252A und H245A zeigten keine nennenswerten Änderungen hinsichtlich der Substratspezifität. Die Aktivität war insgesamt aber deutlich niedriger. Es wurde somit gefolgert, dass die mutierten Aminosäuren an der Ausbildung des aktiven Zentrums beteiligt sind, aber nicht unbedingt einen entscheidenden Einfluss auf die Substratspezifität haben. Für Y241A hingegen wurden auffällige Änderungen hinsichtlich der Substratspezifität gemessen: Anders als beim Wildtyp werden Guanosin und Uridin effektiver hydrolysiert als Adenosin. Ähnliche Veränderungen bezogen auf die Substratspezifität, lediglich schwächer ausgeprägt, wurden auch für die Mutanten Y255A und D252A festgestellt. Nach Mutierung von Y249 zu Alanin wurde ebenfalls eine Veränderung der Substratspezifität nachgewiesen: Die Spezifische Aktivität für Inosin reduzierte sich, während die für iPR deutlich erhöht war. Interessanterweise wurde aber wie beim Wildtyp Protein für alle Mutanten

Proteine Inosin als bevorzugtes Substrat nachgewiesen. Möglicherweise gibt es daher noch weitere, katalytisch wichtige Aminosäure-Reste, die die Substratspezifität beeinflussen und die im Rahmen dieser Experimente nicht mutiert wurden.

Aus diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass D25 eine für die Enzym-Aktivität entscheidende Aminosäure darstellt. Als weitere wichtige, die Substratspezifität beeinflussende Aminosäuren bei PpRH1, konnten Y241, D252A, Y255 sowie Y249 identifiziert werden. Die hergestellte Mutante D25A kann aufgrund ihres nahezu vollständigen Verlustes der Aktivität für Kristallisierungsexperimente eingesetzt werden.

Tab. 4.2 Enzymkinetische Parameter für das Substrat Inosin von rekombinatem Protein von PpRH1 Wildtyp und verschiedenen Mutanten Proteinen, bei denen über site *directed mutagenesis* eine Aminosäure ausgetauscht war. Enzym-Assays wurden unter Verwendung des spektrophotometrischen Assays (Parkin 1996) durchgeführt. In Kooperation mit Dr. M. Tylichová (Palacký Universität, Olomouc, CZ).

	K_m [μM]	V_{max} [$nmol\ s^{-1}\ mg^{-1}$]	V_{max}/K_m [relativ]
WT	87	176	100,0
D252A	220	81	18,2
H245A	810	26	1,6
Y249A	1190	18	0,7
Y255A	761	14	0,9
Y241A	630	1,8	0,1
D25A	n. d.	n. d.	n. d.

n. d. nicht detektierbar ($< 0,1\ nmol\ s^{-1}\ mg^{-1}$)

Für V_{max}/K_m [relativ] wurde der für das Wildtyp Protein berechnete Wert = 100 % gesetzt

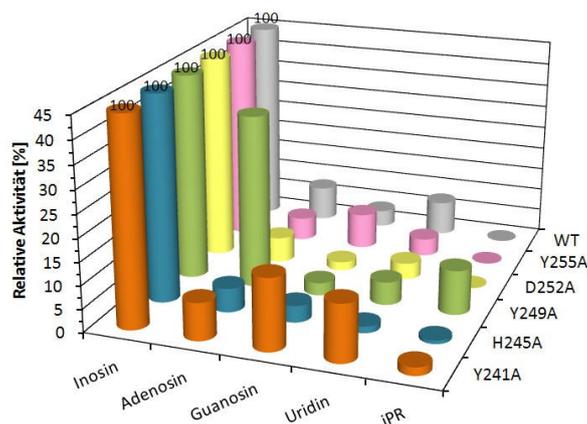


Abb. 4.5 Relative Aktivität von rekombinatem Protein von PpRH1 Wildtyp und verschiedenen Mutanten Proteinen, bei denen über site *directed mutagenesis* eine Aminosäure ausgetauscht war. Die spezifische Aktivität an Inosin wurde gleich 100 gesetzt (für alle untersuchten Proteine das bevorzugte Substrat). Enzym-Assays wurden unter Verwendung des spektrophotometrischen Assays (Parkin 1996) durchgeführt. In Kooperation mit Dr. M. Tylichová (Palacký Universität, Olomouc, CZ).

4.8 Charakterisierung des Purin-Metabolismus beim Wildtyp

4.8.1 *In vivo* Metabolismusstudien

Bevor auf die Charakterisierung des Purin-Metabolismus eingegangen wird, soll zunächst die zur Untersuchung des Purin-Metabolismus angewandte Methode der Markierungsexperimente kritisch betrachtet werden.

4.8.1.1 Methodendiskussion zur *in vivo* Markierung mit ^3H -Adenosin und ^3H -Inosin

Zur Untersuchung des Purin-Stoffwechsels bei *Physcomitrella* wurden Markierungsexperimente sowohl mit ^3H -Adenosin als auch mit -Inosin durchgeführt. Diese wurden *Physcomitrella* Flüssigkulturen zugefügt und der Metabolismus über 60 Minuten durch Analyse von Proben mittels HPLC-online-LSC verfolgt (3.6.4.1). Aufgrund der Position der Tritium-Markierung am C2- und C8-Atom der verwendeten Purine Adenosin und Inosin können theoretisch eine Vielzahl an Metaboliten aus dem Purin-Stoffwechsel detektiert werden. Hierzu zählen u.a. Hypoxanthin, Adenin, Xanthosin, Xanthin, Guanosin, Guanin und Harnsäure. Aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeiten sind diese jedoch mittels der zur Verfügung stehenden reverse Phase HPLC nur schwer voneinander zu trennen. Die erhaltenen Chromatogramme sowohl der Medium- als auch der Gewebeprouben zeigten deutlich, dass insbesondere nach Markierung mit ^3H -Inosin viele Substanzen ko-eluierten und die Peaks somit nicht mehr eindeutig einer Substanz zuzuordnen waren. Es konnten bei der Auswertung der Daten daher nicht alle gebildeten Metabolite erfasst und quantifiziert werden. Außerdem wurde festgestellt, dass das zugegebene Ribosid sowie die durch RH-Aktivität gebildete Base nicht oder nur in sehr geringen Mengen während des Experimentes nachzuweisen war. Dies deutet auf eine sehr rasche Metabolisierung von Adenosin und Inosin hin. Bei zukünftigen Markierungsexperimenten sollten daher kürzere Inkubationszeiten und/oder geringere Gewebemengen verwendet werden, um die Metabolisierung von Adenosin und Inosin verfolgen zu können.

Deng und Ashihara (2010) untersuchten in ihren Experimenten an Sämlingen von *C. sinensis* den *in vivo* Metabolismus von verschiedenen Purinen durch Applikation von ^{14}C -markierten Substanzen zu Blatt- und Wurzelsegmenten. Auch hier wurde eine rasche Verstoffwechslung der zugegebenen Substrate gemessen. Allerdings wurden nach 10 stündiger Inkubation noch geringe Mengen der applizierten Substanzen nachgewiesen. Außerdem war durch die Verwendung eines TLC-basierten Systems zur Proben-Analyse eine hohe Anzahl an Metaboliten nachweisbar. Im Vergleich zu der hier angewandten HPLC-basierten Methode scheint das TLC-basierte System aufgrund seiner Trenneigenschaften besser geeignet zu sein, die zahlreichen, strukturell sehr ähnlichen Substanzen voneinander zu trennen. Für zukünftige Studien des Purin-Metabolismus in *Physcomitrella* sollte daher ebenfalls ein TLC-basiertes System zur Analyse der Proben erprobt werden.

4.8.1.2 Metabolisierung von Purinen beim Wildtyp

RH-Aktivität scheint eine untergeordnete Enzym-Aktivität im Purin-Stoffwechsel zu repräsentieren

Wie anhand von *in vivo* und *in vitro* Messungen nachgewiesen wurde, besitzt *Physcomitrella* RH-Aktivität (4.1). Die errechneten Umsatzraten deuten allerdings auf eine eher schwach ausgeprägte RH-Aktivität hin (*in vivo* 19 nmol Adenosin $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ (FG), *in vitro* 0,6-0,8 pmol Inosin $\text{min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ Protein). Nach Markierung mit ^3H -Adenosin und -Inosin konnten, wie bereits erwähnt, das applizierte ^3H -Ribosid und die durch RH-Aktivität entstandene Base im Gewebe nicht oder nur in sehr geringen Mengen detektiert werden. Es wird daher davon ausgegangen, dass die Enzym-Aktivität der RH im Purin-Stoffwechsel bei *Physcomitrella* gegenüber anderen Enzymen eine untergeordnete Aktivität darstellt. *In vivo* RH-Aktivität ist folglich kaum zu messen, da die durch RHs katalysierte Reaktion durch die Aktivität anderer Enzyme überlagert wird.

Möglicherweise stellt die rasche Metabolisierung von Adenosin und Inosin zusammen mit einer nur schwach ausgeprägten RH-Aktivität eine Besonderheit von *Physcomitrella* dar. In der Literatur finden sich zahlreiche Hinweise, dass der Purin-Metabolismus bei verschiedenen Pflanzenarten sehr stark variiert (z.B. Deng und Ashihara 2010).

Purin-Recycling dominiert über Purin-Katabolismus

Nach Applikation von ^3H -Adenosin zu *Physcomitrella* Kulturen wurden im Gewebe lediglich die Adenin-Nukleotide AMP, ADP und ATP detektiert sowie weitere nicht näher bestimmte Metabolite (Abb. 3.22). Weder Adenosin noch Adenin konnten im Gewebe nachgewiesen werden. Die gebildeten Adenin-Nukleotide können entweder zum Einbau in Nucleinsäuren verwendet werden oder in den Purin-Katabolismus eingeschleust werden, der u.a. der Rückgewinnung von reduziertem Stickstoff in Form von NH_3 dient (vgl. Abb. 1.1 bzw. Abb. 4.6). Adenosin kann direkt durch ADK in AMP umgewandelt oder zunächst durch RH in Adenin und dann über APRT in AMP umgesetzt werden. Während in einigen Pflanzen der indirekte Weg über Adenin bevorzugt wird (z.B. *P. glauca*, Ashihara *et al.* 2001), scheint in anderen Arten die durch ADK-katalysierte Reaktion zu dominieren, da keine oder nur sehr geringe RH-Aktivität messbar ist (z.B. *Helianthus tuberosus*, Le Floc'h und Lafleuriel 1981, *Arabidopsis*, Moffatt *et al.* 2000)).

Markierungsexperimente mit ^3H -Inosin zeigten dessen Metabolisierung zu Hypoxanthin und weiteren, aufgrund von methodischen Einschränkungen nicht näher identifizierte Substanzen (Abb. 3.22). Inosin wird über RH-Aktivität in Hypoxanthin umgewandelt, dass entweder über Xanthin in den Purin-Katabolismus eingeschleust wird und zur Bildung von NH_3 und CO_2 führt oder durch die Bildung von IMP über Kinasen für den Einbau in Nucleinsäuren in Form von ATP und GTP zur Verfügung steht (vgl. Abb. 1.1, Abb. 4.6). Ebenso wie für ^3H -Adenosin beschrieben, konnte auch nach Markierung mit ^3H -Inosin im Gewebe keine oder nur sehr geringe Mengen des Substrates nachgewiesen werden. Das durch RH-Aktivität gebildete Hypoxanthin wurde zwar nachgewiesen, war aber mit den angewandten chromatografischen Methoden nicht zu quantifizieren.

Die vorliegenden Daten lassen somit keine direkten Schlüsse zu, in welchen Stoffwechselweg die extern applizierten ^3H -Riboside eingegangen sind. Auch liegen keine Literaturdaten zur Aktivität der beteiligten Enzyme in *Physcomitrella* vor, die Rückschlüsse auf den bevorzugten Stoffwechselweg in *Physcomitrella* zulassen würden.

Anhand des enorm hohen Anteils an Radioaktivität die zwar während der Inkubation aufgenommen, aber anschließend nicht aus dem Gewebe extrahiert werden konnte (> 80-95 % der gesamten intrazellulären Radioaktivität, Tab. 3.4), kann man schließen, dass der Hauptanteil der Radioaktivität in Form von Nukleotiden in Nukleinsäuren eingebaut wurde. In *Physcomitrella* scheint unter den gegebenen Bedingungen daher sowohl bei Adenosin als auch bei Inosin das Recycling über den Katabolismus zu dominieren. Hätte der Katabolismus dominiert, wäre der Großteil der Radioaktivität gebunden in niedermolekulare Substanzen extrahierbar gewesen. Im Fall von Adenosin konnte in Übereinstimmung mit diesem Ergebnis bei Markierungsexperimenten mit Sämlingen von *C. sinensis* (Deng und Ashihara 2010), Knollescheiben von *S. tuberosum* (Katahira und Ashihara 2006) und Zellsuspensionskulturen von *Catharantus roseus* (Yabuki und Ashihara 1991) ebenfalls gezeigt werden, dass bei diesen Arten der überwiegende Anteil des applizierten Adenosins in Recycling-Produkten wie Nukleotiden und Nukleinsäuren zu finden ist. Studien zum Inosin-Metabolismus bei somatischen Embryonen von *P. glauca* beschreiben, dass nach externer Applikation von radioaktiv-markiertem Inosin der Hauptanteil der Radioaktivität in Ureiden und CO₂ gefunden wurde, der Katabolismus somit hier über das Recycling dominiert (Ashihara *et al.* 2001). Wie bereits zuvor erwähnt, ist bekannt, dass der Purin-Metabolismus in verschiedenen Pflanzenarten und teilweise sogar in verschiedenen Gewebetypen innerhalb einer Pflanze sehr unterschiedlich ausgeprägt sein kann (z.B. Deng und Ashihara 2010).

Die zügige Abnahme von Adenosin und Inosin im Medium sowie das fehlende Auftreten von Adenosin und Inosin im Gewebe, deuten auf einen sehr aktiven Purin-Stoffwechsel bei *Physcomitrella* hin. Vergleicht man die Abnahmeraten für Adenosin und Inosin kann man feststellen, dass Inosin schneller als Adenosin aufgenommen und/oder metabolisiert wird. Das Gegenteil konnten Katahira und Ashihara (2006) bei Markierungsexperimenten von Kartoffelknollescheiben beobachten; ¹⁴C-markiertes Adenosin wurde schneller aufgenommen als ¹⁴C-markiertes Inosin.

Bei zukünftigen Experimenten zum Purin-Stoffwechsel sollten neben der Analyse des Metabolismus der extern applizierten Purine auch Messungen der *in vitro* Aktivitäten der zugehörigen Enzyme (vgl. Abb. 1.1, Abb. 4.6) vorgenommen werden. Um den Purin-Stoffwechsel bei *Physcomitrella* genauer zu charakterisieren, könnte außerdem die bereits erwähnte, von Katahira und Ashihara (2002) beschriebene, TLC-basierte Methode angewandt werden, um eine größere Anzahl an Metaboliten nach Markierungsexperimenten identifizieren zu können. Insbesondere der Vergleich der Menge an inkorporierter Radioaktivität in Nukleinsäuren gegenüber der Freisetzung von CO₂ bzw. anderen Metaboliten des Purin-Katabolismus würden helfen, ein genaueres Profil des Purin-Metabolismus bei *Physcomitrella* zu erstellen und zu bestätigen, dass in diesem Organismus das Purin-Recycling über den -Katabolismus dominiert.

4.8.2 Vorkommen von Purinen und Pyrimidinen beim Wildtyp

Zur Bestimmung der Gehalte von Nukleotiden, Ribosiden und Basen in pflanzlichen Geweben wurden bisher nur wenige Arbeiten veröffentlicht, wobei hauptsächlich Bestimmungen der Nukleotid-Poolgrößen vorgenommen wurden (zusammengefasst von Wagner und Backer 1992). Ein umfassendes *profiling* für Purine und Pyrimidine in Pflanzen wurde bisher nicht beschrieben. Für *Physcomitrella* wurden im Rahmen dieser Arbeit LC-MS/MS Messungen zur Bestimmung der intrazellulär vorhandenen Purine und Pyrimidine durchgeführt (3.6.5.1). 15 Purin/Pyrimidin-Metabolite wurden dabei im Gewebe nachgewiesen. Xanthosin war über den gesamten

Messzeitraum am stärksten vertreten (bis zu 80 nmol/g TG). Gruppieren man die Substanzen in Familien ein, so waren die Xanthosin-Familie (ca. 99 nmol/g TG, bestehend aus Xanthosin, Xanthin), die Uridin-Familie (ca. 73 nmol/g TG, bestehend aus Uridin, Uracil) und die Adenosin-Familie (ca. 60 nmol/g TG, bestehend aus Adenosin, Adenin) am stärksten vertreten. Darüberhinaus zeigten Messungen zum Vorkommen von Purinen und Pyrimidinen im Kulturmedium bei *Physcomitrella*, dass eine Sekretion der Substanzen erfolgt (Daten nicht gezeigt). Extrazellulär wurden nmolare Konzentrationen für ausgewählte Purine und Pyrimidine nachgewiesen. Zur Quantifizierung und für einen Vergleich der intra- und extrazellulären Gehalte dieser Metabolite müssen allerdings noch weitere Messungen erfolgen.

Für Vergleiche mit in der Literatur vorhandenen Angaben zu Purin- oder Pyrimidin-Gehalten im pflanzlichen Gewebe sind die Mengen ausgewählte Metabolite einiger Pflanzenspezies in Tab. 4.3 dargestellt. Sawert *et al.* (1987) bestimmten die Mengen an Inosin, Adenosin, Adenin, Guanosin und Uridin in verschiedenen Getreidearten. Die ermittelten Konzentrationen dieser Substanzen liegen deutlich höher als die für *Physcomitrella* bestimmten Konzentrationen. Übereinstimmend mit *Physcomitrella* ist Adenosin der Vertreter mit der höchsten Konzentration und Inosin der Vertreter mit der niedrigsten Konzentration. In Blättern von *Arachis hypogaea* und *Nicotiana sp.* wurden weder Inosin noch Adenin nachgewiesen (Wagner und Backer 1992, Meyer und Wagner 1985). Uridin war mit 2 nmol/g (FG) das häufigste Ribosid bei *Nicotiana sp.* (Meyer und Wagner 1985). Für *Arabidopsis* beschreiben Möhlmann *et al.* (2010) eine Adenosin-Konzentration von 2,6 nmol/g (FG) in Blättern. Im Vergleich zu den Gehalten bei Monokotylen sind also die Konzentrationen an Ribosiden (und Basen) bei Dikotylen deutlich niedriger. Der Vergleich von Literaturdaten mit den in dieser Arbeit ermittelten Werten für Purin- und Pyrimidin-Konzentrationen lässt darauf schließen, dass in *Physcomitrella* Purine und Pyrimidine in deutlich niedrigeren Konzentrationen als bei Mono- und Dikotylen vorkommen.

Tab. 4.3 Konzentrationen ausgewählter Purine und Pyrimidine in pflanzlichen Geweben.

	Inosin	Adenosin	Adenin	Guanosin	Uridin	Quelle
	in nmol/g (FG)					
<i>Triticum sp.</i>	15	42	13	22	15	Sawert <i>et al.</i> 1988
<i>Secale cereale</i>	0	40	9	5	4	
<i>Hordeum vulgare</i>	3	69	43	27	56	
<i>Nicotiana sp.</i>	-	-	-	-	2	Meyer und Wagner 1985
<i>Arachis hypogaea</i>	-	9	-	k. A.	-	Wagner und Backer 1992
<i>Arabidopsis</i>	k. A.	3	k. A.	k. A.	k. A.	Möhlmann <i>et al.</i> 2010
<i>Physcomitrella*</i>	0,11	0,44	0,25	0,21	0,30	diese Arbeit

- nicht detektiert; k. A. keine Angabe in der Literatur

* aus LC-MS/MS Daten abgeleitet (Annahme: 1 g TG entspricht ca. 90 g FG)

Zur Erstellung eines Gesamtprofils von Purinen und Pyrimidinen beim Wildtyp von *Physcomitrella* sollten ebenfalls die Gehalte von Nukleotiden in zukünftige Analysen miteinbezogen werden. Die vorgenommene Vermessung von Triplikaten zeigte außerdem, dass die einzelnen Werte teilweise stark schwankten, so dass zur Bestätigung der berechneten Konzentrationen das Experiment

wiederholt und die Methodik nochmals validiert bzw. gegebenenfalls optimiert werden sollte (z.B. durch Verwendung von weiteren mit stabilen Isotopen markierten Standards).

4.9 Subzelluläre Lokalisierung von PpRHs

Die Untersuchung der subzellulären Lokalisierung von PpRH1, -2 und -3 erfolgte anhand der Expression von PpRH-GFP-Fusionsproteinen. Für alle drei PpRHs ließ sich sowohl durch transiente Transformation von Zwiebelepidermiszellen als auch von *Physcomitrella* Protoplasten eine Lokalisierung im Cytoplasma eindeutig nachweisen (Abb. 3.13). Auch vorherige bioinformatische Analysen der Aminosäure-Sequenz ergaben keine Hinweise auf ein Signalpeptid für den Transport in ein anderes Kompartiment. Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit der Lokalisierung weiterer Enzyme aus dem Purin-Recycling bzw. -Abbau im Cytoplasma (z.B. ADK, Moffatt *et al.* 2000) oder APRT (Allen *et al.* 2002). Die RHs AtNSH1 und AtNSH2 aus *Arabidopsis* sind ebenso im Cytoplasma lokalisiert (Jung *et al.* 2011, 2009). Ein weiteres Familienmitglied dieser Genfamilie, AtNSH3, wurde hingegen als eine extrazelluläre RH charakterisiert. Außerdem wurde eine extrazellulär lokalisierte RH für *S. tuberosum* beschrieben (Riewe *et al.* 2008). BLAST-Analysen unter Verwendung der Aminosäure-Sequenz von AtNSH3 lieferten keine Kandidaten die auf das Vorliegen einer extrazellulär-lokalisierten RH im Genom von *Physcomitrella* hinweisen. Allerdings konnten in anderen höheren Pflanzen wie *Vitis vinifera*, *Populus trichocarpa* sowie *O. sativa* putative Homologe zu AtNSH3 gefunden werden (Daten nicht gezeigt). Dies deutet darauf hin, dass diese Gruppe von RHs möglicherweise in Stoffwechselwege eingebunden ist, die erst in der Linie der höheren Pflanzen entstanden sind.

Die Validierung des Genmodells für *PpRH3* (4.3) zeigte, dass die für *PpRH3* vorhergesagten Genmodelle vom cosmoss Server nicht zutreffend sind. Anhand von PCR-Experimenten wurde ein neues Genmodell etabliert (*PpRH3* VPCR). Vorhersagen zur Lokalisierung der aus *PpRH3* VPCR abgeleiteten Protein-Sequenz bestätigten ebenfalls die cytoplasmatische Lokalisierung (Daten nicht gezeigt). Die Verifizierung *in planta* steht noch aus. Es ist derzeit davon auszugehen, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit alle drei PpRH Proteine im Cytoplasma lokalisiert sind.

4.10 Funktionelle Untersuchungen zu RHs anhand von *knockout* Mutanten

Um Einblicke in die Bedeutung der RH-Genfamilie in *Physcomitrella* zu erhalten, wurden *single-knockout* Mutanten für alle drei RH-Gene generiert. Aus mehreren Transformationsexperimenten wurden zunächst Antibiotika-resistente Linien selektiert, die per PCR auf die vollständige Integration der Resistenzkassette in den betreffenden Locus analysiert wurden (3.6.2.1). Durchschnittlich wurden aus 10 bis 15 stabilen Transformanten fünf *knockout* Linien mit einer vollständigen Integration des Transgens im jeweiligen RH-Locus identifiziert. Die für *Physcomitrella* beschriebene hohe Frequenz der homologen Rekombination (Schaefer 2001) ist eng korreliert mit der Länge der eingesetzten homologen DNA-Fragmente. Laut Kamisugi *et al.* (2005) reicht die Verwendung von 1 kb langen homologen DNA-Fragmenten aus, um eine Rekombinationsrate von ca. 50 % zu erreichen. Bei den in dieser Arbeit verwendeten *knockout*-Konstrukten wurde die jeweilige Resistenzkassette von ca. 1 kb langen, homologen Sequenzabschnitten auf jeder Seite flankiert (3.6.1). Die beobachtete Frequenz der homologen Rekombination (fünf verifizierte *knockout* Linien aus 10 bis 15 stabilen Linien) liegt demzufolge in einer ähnlichen Größenordnung wie die von Kamisugi *et al.* (2005) beschriebene Rate der homologen Rekombination.

Morphologische Veränderungen konnten an den generierten *RH-knockout* Mutanten unter Standardbedingungen nicht beobachtet werden (3.6.2.4). Auch für *RH*-Mutanten aus *Arabidopsis* wurden keine morphologischen Veränderungen nach Kultivierung unter Standardbedingungen beschrieben (Jung *et al.* 2011, 2009).

4.10.1 Veränderungen der *RH*-Aktivität nach *PpRH1-knockout*

Nach Selektion von *PpRH1-knockout* Pflanzen wurde deren Fähigkeit zur Hydrolyse von Inosin im Vergleich zum Wildtyp gemessen. Während entsalzte Proteinextrakte aus Wildtypgewebe 0,6-0,8 pmol Inosin h⁻¹ mg⁻¹ Protein hydrolysierten, konnte für *PpRH1-KO #29* praktisch keine Inosin-Hydrolyse mehr gemessen werden (< 0,02 pmol h⁻¹ mg⁻¹ Protein, 3.6.3). Diese nahezu 100 %ige Reduktion der *RH*-Aktivität bestätigt *PpRH1-KO #29* als einen eindeutigen *PpRH1-knockout*. Außerdem deutet dieses Ergebnis darauf hin, dass es keine weiteren *RH*s in *Physcomitrella* gibt, die in der Lage sind Inosin zu hydrolysieren. Mit den *PpRH1-knockout* Pflanzen steht somit ein effektives Werkzeug zur Verfügung, um die Rolle von *PpRH1* im Stoffwechsel von Purinen, Pyrimidinen und Cytokininen bei *Physcomitrella in planta* zu analysieren.

Jung *et al.* (2011) untersuchten in ihrer Arbeit *knockout* Mutanten der *RH*-Genfamilie aus *Arabidopsis*. T-DNA-Insertionsmutanten von *AtNSH1* zeigten nach Fütterung von ¹⁴C-markiertem Uridin eine deutlich verminderte Freisetzung von markiertem CO₂ im Vergleich zum Wildtyp. Da keine vollständige Reduktion der Freisetzung des aus Uridin hervorgegangenen CO₂ erfolgte, gehen die Autoren von der Existenz einer weiteren Uridin-hydrolysierenden Enzym-Aktivität aus. Für *AtNSH3*, eine weitere putative *RH* aus *Arabidopsis*, wurden von den zuvor genannten Autoren ebenfalls T-DNA-Insertionsmutanten charakterisiert. Aufgrund einer postulierten extrazellulären Lokalisierung von *AtNSH3* wurde die Hydrolyse von Inosin und Adenosin in apoplastischen Flüssigkeiten dieser Mutanten gemessen. Während beim Wildtyp die Umwandlung von Inosin und Adenosin zur korrespondierenden Base detektiert wurde, fand bei den Mutanten keine Hydrolyse dieser Purine mehr statt. Für den extrazellulären Raum bei *Arabidopsis* kann daher davon ausgegangen werden, dass *AtNSH3* die Hauptaktivität zur Hydrolyse von Inosin und Adenosin darstellt. Wie in 4.9 beschrieben, scheint in *Physcomitrella* keine extrazelluläre *RH* zu existieren.

4.10.2 Beeinflussung des Purin- und Cytokininstoffwechsels nach *PpRH-knockout*

Die Charakterisierung von *PpRH-KO* Mutanten anhand von *in vivo* Metabolismusstudien unter Verwendung von Tritium-markiertem Adenosin, Inosin und iPR sowie LC-MS/MS Messungen zur Bestimmung der Gehalte von Purinen und Pyrimidinen zeigten deutlich, dass nach *RH-knockout* Veränderungen im Purin- und Pyrimidin- sowie im Cytokininstoffwechsel zu beobachten sind (3.6.4, 3.6.5). Da die *KOs* der einzelnen *RH*-Gene unterschiedliche Effekte zeigten, werden diese im Anschluss separat diskutiert.

4.10.2.1 Effekte des *PpRH1-knockout*

Gesteigerte Aufnahme von extern applizierten Ribosiden aus dem Kulturmedium

Die durchgeführten Markierungsexperimente mit ³H-Adenosin, -Inosin und -iPR zeigten übereinstimmend, dass die Abnahme des applizierten Ribosids bei der Transformante *PpRH1-KO #29* deutlich schneller erfolgt als beim Wildtyp (Abb. 3.20, Abb. 3.23). Eine gesteigerte Aufnahme der Riboside aus dem Medium könnte als die Folge einer gesteigerten Metabolisierung gedeutet werden.

Eine extrazelluläre Metabolisierung wird nahezu ausgeschlossen, da es keine Hinweise auf eine extrazelluläre Lokalisierung von Ribosid-metabolisierenden Enzymen gibt. Intrazellulär können die aufgenommenen Riboside entweder durch andere RHs zu den korrespondierenden Basen oder durch Kinasen zu den korrespondierenden Nukleotiden umgesetzt werden, was zu erhöhten Base- bzw. Nukleotid-Konzentrationen führen würde. Messungen der *steady state* Level ausgewählter Purine und Pyrimidine bei den Transformanten zeigten keine signifikant erhöhten Base-Gehalte (3.6.5.2.). Nukleotid-Gehalte wurden nicht bestimmt, so dass anhand der vorliegenden Daten eine gesteigerte Kinase-Aktivität als Ursache für die erhöhte Abnahmekinetik weder bestätigt noch ausgeschlossen werden kann. Messungen der Größe der Nukleotid-Pools sowie die Erstellung von Purin/Pyrimidin-Profilen nach Applikation von Ribosiden könnten zeigen, ob Veränderungen der Nukleotid-Level und möglicherweise Substrat-induzierte Verschiebungen des Purin/Pyrimidin-Profiles vorliegen.

Die schnellere Abnahme extrazellulärer Riboside kann darüberhinaus auch durch eine erhöhte Durchlässigkeit der Zellmembran oder durch vermehrten Carrier-gestützten Transport verursacht werden. Eine generelle Beeinflussung der Purin-Transportraten durch externe Applikation von Purinen wurde z.B. bei dem Pilz *Aspergillus nidulans* beschrieben: Die Expression von Purin-Transporter-Genen konnte durch Applikation von Purinen zum Kulturmedium deutlich stimuliert werden (Amillis *et al.* 2004). Für Pflanzen sind verschiedene Transporter für Stickstoff-Metabolite bekannt, deren Transport-Raten vom Stickstoff-Angebot beeinflusst werden. Bei Gerste wurden erhöhte Transkript-Level von *high affinity* Nitrat-Transportern (HATS) nach Behandlung mit NO_3^- zusammen mit einer erhöhten NO_3^- -Aufnahme gemessen (Vidmar *et al.* 2000). Die Applikation von Aminosäuren wie Glutamin führte hingegen zu einer Reduktion des Influx von NO_3^- . Einstimmigkeit besteht darüber, dass die Aufnahmeraten für anorganischen Stickstoff wie Nitrat über einen Feedback-Mechanismus über die Menge an akkumuliertem Stickstoff reguliert werden. Anhand von welchen Stickstoff-enthaltenden Substanzen Pflanzen ihren Stickstoff-Status messen, ist allerdings noch unbekannt (Vidal und Gutiérrez 2008). Hierfür kämen beispielsweise Ammonium, Glutamin oder Glutamat in Frage. Der *knockout* von *PpRH1* könnte zu einer Blockade im Ribosid-Abbau und damit zu einem verminderten Recycling von Stickstoff geführt haben. Die reduzierten Stickstoff-Gehalte könnten in der Folge die Expression von Ribosid-Transporter-Genen auslösen und zu einer gesteigerten Aufnahme dieser u.a. extern vorliegenden Stickstoff-Verbindungen führen.

Zur Prüfung dieser Hypothese könnten Purin-Transporter in *Physcomitrella* identifiziert und deren Expression in *PpRH-KOs* über Microarray-Analysen untersucht werden. Vergleichbare Messungen von Aufnahmeraten von Purinen oder Pyrimidinen bei pflanzlichen *RH*-Mutanten oder anderen Purin-Stoffwechsel-Mutanten waren in der Literatur nicht zu finden.

Multiple Effekte auf die Metabolit-Verteilung im Gewebe

Nach Markierung mit ^3H -Adenosin und -Inosin konnte in den Gewebeextrakten von *PpRH1-KO #29* bezüglich der RH-Aktivität keine *KO*-gebundenen Effekte nachgewiesen werden (Abb. 3.22). Falls der *knockout* von *PpRH1* zu Verschiebungen des intrazellulären Profils der markierten Metabolite führte, wurden RH-Effekte durch andere Enzym-Aktivitäten überlagert. Weder Substrat noch Produkt der RH-katalysierten Reaktion konnten intrazellulär nachgewiesen werden.

Nach Markierung mit dem Cytokinin ^3H -iPR wurde für *PpRH1-KO #29* intrazellulär eine veränderte Verteilung der Cytokinin-Metabolite im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen. Neben einem

unerwarteterweise gesteigerten Base/Ribosid-Verhältnis wurde außerdem ein gegenüber dem Wildtyp erhöhter Anteil an Cytokinin-Abbauprodukten bestimmt (Abb. 3.24, Abb. 3.25). Beide Beobachtungen können keine direkte Folge des *RH-knockouts* darstellen, sondern repräsentieren vermutlich sekundäre Effekte, die die primären Auswirkungen überlagern. Der beobachtete höhere Gehalt an iP gegenüber iPR kann beispielsweise dadurch zustande kommen, dass iPR verstärkt durch Aktivität der ADK zur Bildung von Cytokinin-Nukleotiden verbraucht wird, da diese nur vermindert aus der reduzierten Menge an iP über APRT gebildet werden können. Somit wäre ein RH-gebundener Effekt, die Akkumulation von iPR, nicht mehr nachzuweisen. Die gesteigerte Aufnahme von ³H-iPR aus dem Kulturmedium sowie die erhöhte Menge an Abbauprodukten im Gewebe können ebenfalls auf einen gesteigerten Cytokinin-Katabolismus, durch erhöhte CKX-Aktivität, als eine sekundäre Folge des *PpRH1-knockouts* hinweisen.

Neben *in vivo* Markierungsexperimenten wurden auch LC-MS/MS Messungen von Purin- und Pyrimidin-Konzentrationen im Gewebe von *PpRH1-KO #29* vorgenommen. Diese ergaben eine deutliche Verschiebung des Gesamtprofils der analysierten Purin- und Pyrimidin-Metabolite (Abb. 3.28). Ein Großteil der untersuchten Purin- und Pyrimidin-Vertreter wurde in höheren Konzentrationen als beim Wildtyp nachgewiesen. Ein Vergleich der Gesamtmengen von Ribosiden zu Basen zeigte, dass bei *PpRH1-KO* eine deutliche Erhöhung der Ribosid-Konzentrationen vorlag. Während der Wildtyp ein Ribosid/Base-Verhältnis von 1,9 aufwies, wurde für *PpRH1-KO #29* ein Ribosid/Base-Verhältnis von 13,3 berechnet (nach 21 Tagen Kultivierungsdauer). Der enorme Anstieg des Ribosid/Base-Verhältnisses ist vorrangig auf die Konzentrationszunahme der Riboside Xanthosin, Inosin, Guanosin und Uridin zurückzuführen. Diese Riboside wurden interessanterweise auch als Substrate des rekombinanten PpRH1 Proteins identifiziert (Tab. 3.2). Die Ergebnisse der LC-MS/MS Messungen nach *PpRH1-KO* stehen somit in Einklang mit den am rekombinanten Protein erhobenen Daten zum Substratspektrum von PpRH1.

Bei transgenen Mäusen denen das Gen für Uridin-Phosphorylase fehlte, die die reversible Phosphorolyse von Uridin zu Uracil katalysiert, konnten ähnliche Beobachtungen gemacht werden: Die Konzentration an Uridin nahm nach Deletion der Uridin-Phosphorylase je nach Gewebetyp auf eine bis zu 6fach höhere Menge im Vergleich zum Wildtyp zu (Cao *et al.* 2005).

Auch an Xanthin-Dehydrogenase-(*XDH*)-Mutanten wurden vergleichbare Beobachtungen gemacht. *XDH* katalysiert sowohl die Umwandlung von Hypoxanthin zu Xanthin als auch die von Xanthin zu Harnsäure. *XDH*-Mutanten von *Arabidopsis* mit reduzierter *XDH*-Aktivität zeigten eine starke Akkumulation großer Mengen von Xanthin (Brychkova *et al.* 2008). Pérez-Vicente *et al.* (1991) führten Markierungsexperimente mit radioaktiv-markierten Hypoxanthin und Xanthin an *C. reinhardtii* durch. Hierbei wurde eine Stimulation der Transporter-vermittelten Aufnahme der Purin-Basen durch die extrazellulär applizierten Purine gemessen. Neben dem Wildtyp wurden auch *XDH*-Mutanten in die Experimente miteinbezogen. Für *XDH*-Mutanten konnte eine verstärkte intrazelluläre Akkumulation der extern zugefügten Purin-Basen gemessen werden, da durch die fehlende *XDH*-Aktivität vermutlich der Abbau der Purine zu Harnsäure blockiert war. Welche Schlüsse sich für *Physcomitrella* aus den Ergebnissen der Markierungsexperimente und LC-MS/MS Messungen auf die Bedeutung von PpRH1 ableiten lassen, wird in 4.11 diskutiert.

4.10.2.2 Effekte eines *PpRH2*- bzw. *PpRH3*-knockouts

Bei der Untersuchung der *RH*-KO-Effekte konnten bei *PpRH2*- und *PpRH3*-knockout Linien gewisse Ähnlichkeiten gemessen werden. Insgesamt wurde im Vergleich zum *PpRH1*-KO ein deutlich schwächer ausgeprägter metabolischer Phänotyp nachgewiesen.

In vivo Markierungsexperimente zur Charakterisierung von *PpRH2*- und *PpRH3*-KOs wurden mit ^3H -iPR vorgenommen und zeigten eine nahezu dem Wildtyp identische Abnahmekinetiken für das Substrat im Medium. Intrazellulär wurde eine leichte Abnahme des Base/Ribosid-Verhältnisses bestimmt. Außerdem wurden bei beiden Genotypen etwas niedrigere Mengen an Abbauprodukten als beim Wildtyp detektiert. Interessanterweise stehen diese Beobachtungen im Gegensatz zu den bei *PpRH1*-KO beobachteten Effekten, da dort eine Zunahme des Base/Ribosid-Verhältnisses zusammen mit einer größeren Menge an Abbauprodukten im Vergleich zum Wildtyp gemessen wurde. Dieser Befund deutet auf eine andere Bedeutung von *PpRH2* und -3 im Cytokininstoffwechsel hinweisen.

Die vorgenommenen LC-MS/MS Messungen an Gewebeextrakten aus Kulturen von *PpRH2*-KO #56 und *PpRH3*-KO #7 zur Bestimmung der Menge an Purinen und Pyrimidinen zeigten ebenfalls gegenüber dem Wildtyp nur geringfügige Veränderungen (Abb. 3.28). Die meisten der analysierten Purine und Pyrimidine blieben unbeeinflusst. Bei *PpRH2*-KO #56 war lediglich die Zunahme des Ribosids Uridin auffällig, das auch das einzige bisher bekannte Substrat des rekombinanten *PpRH2* Proteins darstellt (Tab. 3.2). Die Analyse der intrazellulären Verhältnisse von Purinen und Pyrimidinen bei der Mutante *PpRH3*-KO #7 zeigte keine deutlichen Verschiebungen der Konzentrationen einzelner Metabolite. Bildet man allerdings das Verhältnis von Ribosiden zu Basen, ergibt sich für beide *knockouts* ebenfalls ein im Vergleich zum Wildtyp zugunsten des Ribosids verschobenes Ribosid/Base-Verhältnis: 3,5 (*PpRH2*-KO #56) bzw. 3,2 (*PpRH3*-KO #7) gegenüber 1,9 beim Wildtyp.

Eine Erhöhung der endogenen Ribosid-Gehalte scheint somit ein für *PpRH1*-, *PpRH2*- und *PpRH3*-KO gemeinsamer Effekt des *RH*-knockouts zu sein, der beim *PpRH1*-KO allerdings weitaus deutlicher ausgeprägt ist. Dieser Befund bestätigt die Funktion aller drei *PpRHs* als Ribosid-hydrolysierende Enzyme.

Darüberhinaus wurden übereinstimmend bei allen *PpRH*-knockouts Änderungen der Gehalte an Desoxy-Formen von Ribosiden gemessen. Für die meisten bisher beschriebenen *RHs* bilden die Desoxyriboside keine Substrate, da wie von Degano *et al.* (1996) angenommen wird, vermutlich alle drei Hydroxyl-Gruppen der Ribose für eine effiziente Katalyse benötigt werden. Bei bisherigen Bestimmungen der Substratspezifität von *PpRHs* wurden Desoxyriboside nicht getestet. Aufgrund der Daten aus den LC-MS/MS-Analysen sollten diese aber in zukünftige Messungen der Substratspezifität miteinbezogen werden.

4.11 Zusammenfassende Schlüsse auf mögliche Funktionen von RHs bei *Physcomitrella*

Die physiologische Rolle von RHs im pflanzlichen Stoffwechsel wurde bisher kaum untersucht. Erst die Identifizierung der *RH*-Genfamilie aus *Arabidopsis* lieferte - vorrangig anhand der Analyse von Mutanten mit veränderter RH-Aktivität - Hinweise auf mögliche Rollen dieser Enzyme bei der Samenpflanze *Arabidopsis*. Die in dieser Arbeit erhobenen Daten zur Substratspezifität, zur Lokalisierung und vor allem die Charakterisierung der hergestellten *knockout* Mutanten von *Physcomitrella* lassen Schlüsse auf mögliche Rollen der RHs beim Laubmoos *Physcomitrella* zu.

Wie bereits anhand der Bestimmung des Substratspektrums deutlich wurde, weisen PpRH1 und -2 ein unterschiedliches Substratspektrum auf (Tab. 3.2). PpRH3 konnte heterolog nicht in löslicher Form erhalten werden. Die erzeugten *RH-single-knockouts* zeigten unterschiedliche metabolische Phänotypen. Übereinstimmend zu der hohen Sequenzähnlichkeit zwischen den Aminosäure-Sequenzen von PpRH2 und -3 (76 %) wurden nach dem *knockout* von PpRH2 und PpRH3 ähnliche Effekte beobachtet. Es wird somit ein direkter Zusammenhang zwischen dem jeweiligen ausgeschalteten *RH*-Familienmitglied und den beobachteten Auswirkungen angenommen. Im Anschluss an die Frage nach einer Beteiligung von RHs am Cytokinin-Stoffwechsel, werden mögliche Funktionen der einzelnen RHs aus *Physcomitrella* diskutiert.

Sind RHs in den Cytokinin-Stoffwechsel involviert?

Neben dem Nachweis des Umsatzes des Cytokinin-Ribosids iPR (Tab. 3.2) durch rekombinante PpRH1 und PpRH2 Proteine wurden Vorversuche zur Cytokinin-Ribosid-Toleranz der Mutanten vorgenommen. Cytokinine, insbesondere die Basen, gelten prinzipiell als wachstumsfördernd, wirken aber in hohen Konzentrationen (> 250 nM) hemmend auf das Wachstum. Ein RH-vermittelter Umsatz des Ribosids Benzyladenosin (BAR) zur Base Benzyladenin (BA) resultiert somit in einer höheren Konzentration an wachstumshemmendem BA. Eine Reduktion der RH-Aktivität würde dementsprechend zu einer gesteigerten Toleranz gegenüber extern appliziertem BAR führen. Für einige der *PpRH-KO* Mutanten wurde in der Tat eine höhere Toleranz gegenüber BAR festgestellt, was eine Beteiligung von PpRHs am Cytokinin-Metabolismus impliziert (Daten nicht gezeigt).

Anhand der Markierungsexperimente konnte weiterhin nachgewiesen werden, dass der *knockout* von *RHs* zu Verschiebungen des intrazellulären Profils markierter Cytokinine führt. Neben Verschiebungen des Base/Ribosid-Verhältnisses, änderte sich auch das Verhältnis von Abbauprodukten zu Metaboliten mit Isopentenyl-Seitenkette (Abb. 3.24, Abb. 3.25). Aufgrund der starken Aktivität anderer Enzyme, vornehmlich vermutlich CKX, war es nahezu unmöglich, den Einfluss der reduzierten/fehlenden RH-Aktivität direkt zu messen und eine Vorhersage zur Rolle von PpRH1, -2 und -3 im Cytokinin-Stoffwechsel zu treffen. In zukünftigen Studien könnte durch *in vivo* Markierung mit BAR, einem schlechten Substrat der CKX (Armstrong 1994), eine Reduktion des Katabolismus erreicht werden, um den durch Minderung der RH-Aktivität entstandenen Effekt auf das Base/Ribosid-Verhältnis besser sichtbar zu machen.

Jung *et al.* (2009) konnten ebenfalls iPR-Hydrolyse-Aktivität des rekombinanten AtNSH1 Proteins aus *Arabidopsis* messen und postulierten daher eine mögliche Funktion für AtNSH1 im Cytokinin-

Stoffwechsel. Bei der Analyse von *AtNSH1*-Mutanten wurden dafür allerdings keine Hinweise gefunden.

Eine Beeinflussung des Cytokinin-Profiles durch *RH-knockout* könnte auch als Folge eines Stickstoff-Mangels erfolgen. Möglicherweise führte der *knockout* von *PpRHs* aufgrund der Blockade im Purin-Abbau und der damit verbundenen verminderten Rückführung von reduziertem Stickstoff zu der Auslösung einer Stickstoff-Mangel-Kaskade. Eine Beeinflussung der Isopentenyltransferase-(IPT)-abhängigen Cytokinin-Biosynthese durch Nitrat wurde anhand einer gesteigerten Expression von *AtIPT3* nach Nitrat-Applikation von Miyawaki *et al.* (2004) für *Arabidopsis* beispielsweise beschrieben.

Zur Beantwortung der Frage, ob *PpRHs* in den Cytokinin-Stoffwechsel bei *Physcomitrella* involviert sind, wurden außerdem analog zu den LC-MS/MS Messungen von Purinen und Pyrimidinen bei *PpRH-KOs* (2.7) auch Experimente zur Untersuchung des Cytokinin-Spektrums vorgenommen. Die entsprechenden LC-MS/MS Daten wurden in Kooperation mit Prof. M. Strnad (Palacký Universität, Olomouc, CZ) erhoben und lagen zum Abschluss der Arbeit noch nicht vor.

Wie eingangs erwähnt (1.3) sind für die „Aktivierung“ von Cytokinin-Basen (Bildung der physiologisch aktiveren Basen) zwei Wege in Pflanzen beschrieben: Die Bildung von Cytokinin-Basen aus -Ribosiden über *RHs* sowie die Bildung von Cytokinin-Basen ausgehend von -Nukleotiden über Phosphoribohydrolasen (*LOG*). Inwieweit der letztgenannte von Kuroha *et al.* (2009) und Kurakawa *et al.* (2007) beschriebene Weg zur Bildung der Basen aus Nukleotiden in *Physcomitrella* Bedeutung hat, konnte anhand der in dieser Arbeit erhobenen Daten nicht festgestellt werden. Zur Untersuchung des „Cytokinin-Aktivierungsweges“ in *Physcomitrella* könnte zukünftig folgender Ansatz gewählt werden: Schwartzberg *et al.* (2003) konnten zeigen, dass die Bildung von Cytokinin-Nukleotiden *via* *APRT* in *Physcomitrella* einen untergeordneten Stoffwechselweg darstellt. Die Bildung der Nukleotide erfolgt daher hauptsächlich über die *ADK*-katalysierte Reaktion aus den Ribosiden. Durch Verwendung eines Inhibitors für *ADK* wie beispielsweise (Iodo-)Tubercidin oder den Einsatz von *ADK-knockout* Mutanten könnte eine Reduktion des Gehalts an Cytokinin-Nukleotiden erreicht werden. Anschließende Messungen der Konzentration an Cytokinin-Basen würden zeigen, ob ausreichend Basen über eine *RH*-katalysierte Reaktion gebildet werden. Außerdem würden Expressionsanalysen von *PpRHs* und *LOGs* Aufschluss darüber geben, welches die bevorzugten Stoffwechselwege zur „Aktivierung“ von Cytokinin-Basen bei *Physcomitrella* sind.

Für *Arabidopsis* wurde von Kuroha *et al.* (2009) anhand von Überexpressionsmutanten eine zentrale Bedeutung der *LOG*-Gene im „Cytokinin-Aktivierungsmechanismus“ nachgewiesen. Möglicherweise scheint dieser Weg zur „Aktivierung“ von Cytokinin-Basen in *Arabidopsis* vorherrschend zu sein. Im *Physcomitrella* Genom konnten anhand von BLAST-Analysen ebenfalls putative Kandidaten für *LOG*-Gene selektiert werden (Daten nicht gezeigt). Grundsätzlich wäre eine parallele Existenz von zwei verschiedenen Aktivierungswegen für Cytokinine in *Physcomitrella* denkbar. Die Vielfalt von unterschiedlichen Stoffwechselwegen in *Physcomitrella* wurde bereits mehrfach beschrieben (z.B. Rensing *et al.* 2007). Die Frage nach den Einzelheiten der möglichen Beteiligung von *PpRHs* am Cytokinin-Stoffwechsel kann anhand der vorliegenden Daten nicht abschließend beantwortet werden.

Die Rolle von PpRH3 kann nicht eindeutig bestimmt werden

Im Fall von PpRH3 ist es nahezu unmöglich, Aussagen über mögliche Funktionen zu machen. Zum einen konnte kein rekombinantes Protein hergestellt werden, so dass keine Daten zur Substratspezifität vorliegen. Zum anderen lieferte die Analyse von *PpRH3-knockout* Mutanten nur wenige Einblicke in die Bedeutung von PpRH3, weswegen PpRH3 nach derzeitigem Datenstand eher eine untergeordnete Rolle beigemessen wird. EST-Datenbanken zu verschiedenen Entwicklungsstufen zeigen, dass eine Expression von *PpRH3* auch im Sporophyten erfolgt (40 % der ESTs). Zur Bedeutung von PpRH3 sollte zunächst rekombinantes Protein auf Grundlage der verifizierten cDNA-Sequenz (4.3) hergestellt und für Untersuchungen der Substratspezifität eingesetzt werden. Außerdem sollten Expressionsstudien für *PpRH3* mit sporophytischem Gewebe vorgenommen werden, um die entwicklungspezifische Expression von *PpRH3* zu analysieren.

PpRH2 übernimmt möglicherweise Rolle im Pyrimidin-Abbau im Entwicklungsstadium des Gametophoren

Am rekombinanten Protein vorgenommene Messungen der Substratspezifität identifizierten PpRH2 als eine Pyrimidin-bevorzugende RH mit einer im Vergleich zu PpRH1 schwach ausgeprägten katalytischen Aktivität. Neben Uridin wurden auch Xanthosin und iPR umgesetzt, wobei für die letzten beiden Substrate keine kinetischen Parameter bestimmt wurden. LC-MS/MS Messungen von intrazellulären Purinen und Pyrimidinen beim *PpRH2-knockout* zeigten leichte Verschiebungen des Profils von Purinen und Pyrimidinen, wobei das Ribosid Uridin der größten Änderung unterlag (3fach mehr als beim Wildtyp). Die Uridin-Akkumulation erfolgte aufgrund der fehlenden PpRH2-Aktivität zur Hydrolyse von Uridin, die offenbar nicht durch PpRH1-Aktivität (Uridin ist ebenfalls Substrat von PpRH1) kompensiert werden konnte. Der „Uridin-Anstau“ war erst nach 21 Tagen Kultivierungsdauer zu messen, wenn auch die Entwicklung von Gametophoren bereits begonnen hatte. Die auf dem cosmos Server publizierten ESTs sowie eigene *real time*-PCR Experimente (Daten nicht gezeigt) deuten auf eine Expression von *PpRH2* im Gametophoren hin. Für PpRH2 wird aufgrund der bislang vorliegenden Daten daher eine Rolle im Abbau des Pyrimidin-Ribosids Uridin während der späten Entwicklung bei *Physcomitrella* angenommen. Für ein breiteres Verständnis der Bedeutung von PpRH2 sind zunächst detaillierte Expressionsstudien am Gametophoren anvisiert.

PpRH1 übernimmt Schlüsselrolle im Ribosid-Abbau

Wie Messungen der Substratspezifität zeigten, handelt es sich bei PpRH1 um eine Purin-bevorzugende RH. Inosin wurde als Hauptsubstrat des rekombinanten PpRH1 Proteins identifiziert, dann folgen Adenosin, Guanosin und Uridin mit abnehmender katalytischer Effizienz. Ebenso wurde Aktivität an Xanthosin und iPR nachgewiesen, wobei für diese Substrate keine kinetischen Parameter bestimmt wurden. Das Substratspektrum von PpRH1 umfasst somit alle wichtigen Vertreter der Purin-Riboside sowie das Pyrimidin-Ribosid Uridin und das Cytokinin-Ribosid iPR. Das breit gefasste Substratspektrum in Verbindung mit der exponierten Stellung von RHs im Stoffwechsel als Schnittstelle zwischen Katabolismus und Recycling, weisen auf eine zentrale Bedeutung von PpRH1 hin. Der *knockout* von *PpRH1* führte zu einem vollständigen Verlust der Fähigkeit der Inosin-Hydrolyse. Daher wird angenommen, dass mit großer Wahrscheinlichkeit kein weiteres Enzym in *Physcomitrella* den Abbau von Inosin zu Hypoxanthin katalysiert. Da Inosin zusammen mit Xanthosin das Haupt-Zwischenprodukt im Purin-Katabolismus repräsentiert (Zrenner

et al. 2006), kommt PpRH1 vermutlich eine wichtige Funktion im Katabolismus zu. Neben dem Verlust zur Inosin-Hydrolyse wurde beim *PpRH1-KO* eine drastische Akkumulation von Purin- und Pyrimidinen, insbesondere der Riboside Xanthosin, Inosin, Uridin und Guanodin gemessen. Dies steht im Einklang mit den Messungen der Substratspezifität und bestätigt die am rekombinanten Protein erhobenen Daten zur Substratspezifität. Da für Xanthosin die höchste Akkumulation (17fach höher als beim Wildtyp) gemessen wurde, könnte dies auch ein Hinweis darauf sein, dass Xanthosin *in planta* ein besseres Substrat für PpRH1 als Inosin darstellt.

Die generelle Akkumulation von Ribosiden als Folge des *PpRH1-knockouts* unterstreicht die zentrale Bedeutung von PpRH1 im Ribosid-Abbau mit einer übergreifenden Rolle im Purin- und Pyrimidin-Stoffwechsel. In Abb. 4.6 ist ein hypothetisches Schema der veränderten Stoffwechsel-Situation für Purine und Pyrimidine nach *PpRH1-KO* dargestellt. Bei der Mutante resultiert die fehlende Aktivität von PpRH1 in einem drastischen „Ribosid-Anstau“. Da die Rückführung von Nucleosid-gebundenem Stickstoff nicht erfolgen konnte, wird folglich von der Pflanze eine reduzierte Menge an Stickstoff zum Einbau in Aminosäuren perzipiert. Dies wiederum führte zu einer Stimulation der Aufnahme von extrazellulär vorhandenen Stickstoff-Quellen, wie anhand der gesteigerten Ribosid-Aufnahme aus dem Kulturmedium bei Markierungsexperimenten beobachtet wurde.

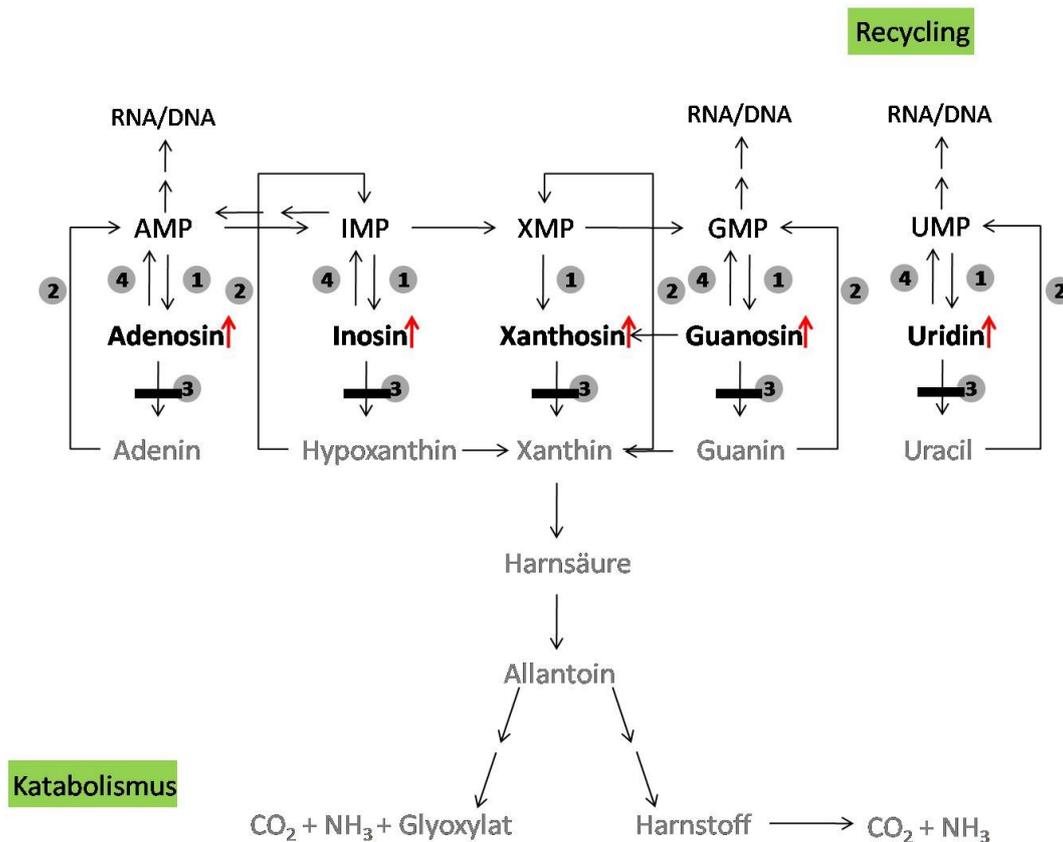


Abb. 4.6 Hypothetisches, stark vereinfachtes Schema zur veränderten Stoffwechsel-Situation im Purin- und Pyrimidin-Metabolismus nach *knockout* von *PpRH1*. Wichtige Enzyme: 1 – 5'-Nucleotidase; 2 – Phosphoribosyltransferase; 3 – Ribohydrolase; 4 – Kinase. Rote Pfeile weisen auf eine Akkumulation der Substanzen hin. Schema modifiziert nach Deng und Ashihara (2010).

PpRH1 repräsentiert demnach eine Hauptaktivität im Katabolismus von Ribosiden. Daten zur Expression von *PpRH1* stützen die Annahme, dass PpRH1 eine zentrale Funktion innerhalb der *PpRH*-Genfamilie besitzt: *Real time*-PCR Experimente zeigten eine höhere Expression von *PpRH1* im Vergleich zu *PpRH2* und -3 (Daten nicht gezeigt), was in Übereinstimmung mit der höchsten Anzahl an publizierten ESTs innerhalb der *PpRH*-Genfamilie steht (Tab. 3.1).

Die bereits mehrfach betonte Schlüsselfunktion von RHs als Schnittstelle am Übergang zwischen Katabolismus und Recycling von Purinen und Pyrimidinen, konnte anhand der erhobenen Daten für RHs aus *Physcomitrella* bestätigt werden: Die Produkte der *PpRH*-Genfamilie, insbesondere PpRH1, stellen gewissermaßen ein Nadelöhr dar, dass die Riboside „durchlaufen“ müssen, um in den Katabolismus einzutreten. Da der Abbau von Ribosiden auch der Rückführung von Stickstoff dient, kommt den RHs möglicherweise eine bedeutende Rolle im Stickstoff-Stoffwechsel zu.

Von Vlietland-Nowotny (2010) wurden im Rahmen einer Masterarbeit Vorversuche zur Testung der Hypothese der Beteiligung von PpRHs am Stickstoff-Recycling durchgeführt. Hierfür wurden Wildtyp und *PpRH1*-, *PpRH2*- und *PpRH3*-KO Mutanten auf Medium angezogen, das Purin-Riboside als einzige Stickstoff-Quelle enthielt. Einige *PpRH1*-, *PpRH2*- und *PpRH3*-KO Mutanten zeigten eine Reduktion des Wachstums im Vergleich zum Wildtyp wenn Adenosin oder Xanthosin als einzige Stickstoff-Quelle angeboten wurde. Zusammen mit der gemessenen Ribosid-Akkumulation deuten diese Ergebnisse eine Rolle von PpRHs bei der Stickstoff-Rückgewinnung an. Kim *et al.* (2006) beschreiben Versuche, bei denen bakterielle Deletionsmutanten von RHs auf Medium mit Purinen bzw. Pyrimidinen als einziger Stickstoff-Quelle angezogen wurden. In Übereinstimmung mit dem Substratspektrum der deletierten RH zeigten die Mutanten reduziertes Wachstum. Daher wurde den charakterisierten RHs von den Autoren eine Beteiligung am Recycling von Purin- und Pyrimidin-Ribosiden zugeordnet. Zur Verifizierung der Annahme, dass PpRHs tatsächlich am Stickstoff-Recycling beteiligt sind, sind weitere Tests zur Kultivierung der Transformanten unter Stickstoff-Mangel-Bedingungen anvisiert. Außerdem sollen Markierungsexperimente mit ¹⁴C-markierten Purinen und anschließender Messung der ¹⁴CO₂-Freisetzung vorgenommen werden, um die durch *PpRH*-KO verursachte Blockade im Katabolismus zu bestätigen.

Neben Experimenten zur detaillierten Erfassung der veränderten Stoffwechsel-Situation nach *knockout* von *PpRHs*, wären zukünftig auch Kenntnisse über gewebespezifische Expressionsmuster von *PpRHs* in *Physcomitrella* von Interesse. Das Vorkommen größerer Mengen an Ribosiden wie Adenosin, Guanosin, Uridin im Boden wurde von Phillips *et al.* (1997) beschrieben (µmol je kg Boden). Über equilibrative Nukleosid-Transporter (1.1.5) könnte eine Aufnahme dieser extrazellulären Riboside erfolgen, die von in den Wurzelzellen lokalisierten RHs abgebaut werden können. Für AtNSH1 aus *Arabidopsis* konnte anhand von Promotor-GUS-Studien gezeigt werden, dass diese vornehmlich in Wurzeln von *Arabidopsis* exprimiert wird, während RHs aus anderen Pflanzen wie beispielsweise Kaffee (Campos *et al.* 2005) und Gelber Lupine (Abusamhadneh *et al.* 2000) aus Blättern isoliert wurden. Ob RHs aus *Physcomitrella* in Rhizoiden exprimiert werden, könnte anhand von Promotor-GUS-Studien untersucht werden.

Funktionelle Rückschlüsse aus dem Vergleich von RHs aus *Physcomitrella* und *Arabidopsis*

Die RH-Genfamilie aus *Arabidopsis*, die von Jung *et al.* (2011, 2009) beschrieben wurde, stellt zum jetzigen Zeitpunkt die einzige pflanzliche RH-Genfamilie dar, die neben der in dieser Arbeit untersuchten RH-Genfamilie aus *Physcomitrella*, charakterisiert wurde. In *Arabidopsis* wurden wie in *Physcomitrella* drei Isoformen von RHs beschrieben, die sich hinsichtlich ihrer biochemischen Eigenschaften und ihrer postulierten Funktion voneinander unterscheiden. In beiden Organismen wurde neben einer Purin-bevorzugenden RH (PpRH1 bzw. AtNSH2) auch eine Pyrimidin-bevorzugende RH (PpRH2 bzw. AtNSH1) identifiziert. Die experimentell ermittelten Substratspezifitäten dieser RHs sind kompatibel mit den Ergebnissen der phylogenetischen Analysen, nach denen pflanzliche RHs in zwei Hauptgruppen clustern. PpRH1 und AtNSH2 gruppieren sich in die eine, PpRH2 und AtNSH1 in die andere Gruppe von RHs ein.

AtNSH3, als extrazelluläre RH, konnte keiner der beiden Gruppen zugeordnet werden, da sich seine Aminosäure-Sequenz grundlegend von den anderen RH-Aminosäure-Sequenzen unterscheidet. PpRH3 gruppiert sich in die gleiche Gruppe wie PpRH2 und AtNSH1 ein, es liegen jedoch hier keine experimentellen Daten zur Substratspezifität vor, da kein rekombinantes PpRH3 Protein erhalten werden konnte (3.3.3).

Vergleicht man die physiologische Rolle der verschiedenen RHs auf der Grundlage der vorhandenen Daten, so wurde in *Physcomitrella* und in *Arabidopsis* übereinstimmend jeweils eine RH mit stark ausgeprägter katalytischer Aktivität (PpRH1 bzw. AtNSH1) nachgewiesen. Es ist davon auszugehen, dass PpRH1 und AtNSH1 mit hoher Wahrscheinlichkeit eine essentielle Funktion im Katabolismus von Ribosiden und dem damit verbundenen Recycling von Stickstoff übernehmen. Ohne RH-Aktivität kann der von der Basen-Form ausgehende Katabolismus von Purinen und Pyrimidinen nicht stattfinden. Obwohl sich PpRH1 und NSH1 hinsichtlich ihres Hauptsubstrates deutlich voneinander unterscheiden (PpRH1: Inosin, AtNSH2: Uridin), kommt beiden Enzymen möglicherweise eine übergreifende Rolle im Stoffwechsel von Purinen und Pyrimidinen zu, da für beide Enzyme sowohl an Purinen als auch an Pyrimidinen Aktivität nachgewiesen wurde. Sowohl in *Physcomitrella* als auch in *Arabidopsis* existieren zweite RHs (PpRH2 bzw. AtNSH2) die jeweils in beiden Organismen vermutlich RH-Nebenaktivität besitzen und vorrangig während einer bestimmten Entwicklungsphase eine Rolle spielen. Während PpRH2, die bevorzugt das Pyrimidin Uridin umsetzt, laut EST Evidenzen höchstwahrscheinlich insbesondere im Gametophor von *Physcomitrella* exprimiert wird, setzt AtNSH2 bevorzugt das Purin Inosin um und ist in den Ribosid-Abbau während der späten Phase der Seneszenz involviert. *Arabidopsis* besitzt zusätzlich, wie bereits zuvor erwähnt, eine weitere Isoform (AtNSH3), die sich aufgrund ihrer extrazellulären Lokalisierung von den anderen RHs abhebt. *Physcomitrella*, als eine basale Landpflanze, verfügt nach derzeitigem Kenntnisstand über keine extrazelluläre RH.

RHs scheinen somit in beiden, phylogenetisch weit voneinander entfernten Organismen, eine grundlegende zelluläre Funktion durch ihre Beteiligung am Katabolismus von Nukleosiden und der damit verbundenen Rückführung von Stickstoff zu übernehmen. Neben den genannten Übereinstimmungen zwischen RHs aus *Physcomitrella* und *Arabidopsis* bestehen ebenfalls Unterschiede hinsichtlich der bevorzugenden Substrate sowie der gewebe- oder entwicklungspezifischen Expression der jeweiligen Haupt- und Neben-RHs. Weitere Untersuchungen

sind notwendig um zu einem detaillierteren Kenntnisstand bezüglich der Funktionen von RHs zu gelangen.

4.12 Perspektiven

Im Rahmen der vorgelegten Arbeit wurde die *RH*-Genfamilie aus *Physcomitrella* identifiziert und funktionell beschrieben. Neben der biochemischen Charakterisierung von rekombinanten RH Proteinen lag ein Hauptschwerpunkt der Arbeit auf der Generierung und Charakterisierung von *PpRH-knockout* Mutanten, anhand derer Einblicke in die physiologische Rolle von RHs erhalten wurden. Die folgenden Experimente könnten dazu beitragen das Verständnis zu RHs noch weiter zu vertiefen:

* Generierung von *triple-knockout* Mutanten bzw. *triple knockdown* Linien *via* RNAi. Transgene Pflanzen zum gleichzeitigen *knockdown* von *PpRH1*, -2 und -3 wurden bereits hergestellt. Nach Charakterisierung dieser Linien könnte anhand von Markierungsexperimenten mit ^{14}C -markierten Purinen und der anschließenden Messung der Produktion von $^{14}\text{CO}_2$ zusammenfassend die Bedeutung der gesamten *PpRH*-Genfamilie für den Katabolismus von Purinen (und Pyrimidinen) erfasst werden. Außerdem könnten anhand von verbleibenden Rest-Aktivitäten zur Ribosid-Hydrolyse Hinweise auf das mögliche Vorhandensein weiterer RHs im *Physcomitrella* Genom erhalten werden.

* Anhand von Expressionsstudien von *PpRH*- und *LOG*-Genen in Wildtyp und *PpRH-KOs* sowie Bewertungen der LC-MS/MS Messungen von Cytokininen bei *PpRHs* könnte die Frage nach der Bedeutung von RHs im Cytokinin-Stoffwechsel und nach der Gewichtung der „Cytokinin-Aktivierungswege“ bei *Physcomitrella* geklärt werden.

* Über Kristallisierungsansätze unter Verwendung von *PpRH1* ohne N-terminalen *Tag* bzw. der *PpRH1* Mutante D25A könnten geeignete Kristalle zur Entschlüsselung der ersten 3D-Struktur einer pflanzlichen RH sowie Einblicke in die Substratbindung erhalten werden.

Eine genaue Kenntnis der Funktionen und Rollen von RHs eröffnet Möglichkeiten der biotechnologischen Nutzung dieser Enzyme sowie der Verbesserung von Nutzpflanzen.

5 Literaturverzeichnis

- Abdel-Fatah, O.M., M.A. Elsayed, A.M. Elshafei (2003) Hydrolytic cleavage of purine ribonucleosides in *Aspergillus phoenicis*. *Journal of Basic Microbiology* 43 (6): 439-448.
- Abusamhadneh, E., N.E. McDonald, P.C. Kline (2000) Isolation and characterization of adenosine nucleosidase from yellow lupin (*Lupinus luteus*). *Plant Science* 153: 25-32.
- Allen, M., W. Qin, F. Moreau, B.A. Moffatt (2002) Adenine phosphoribosyltransferase isoforms of *Arabidopsis* and their potential contributions to adenine and cytokinin metabolism. *Physiologia Plantarum* 115 (1): 56-68.
- Amillis, S., G. Cecchetto, V. Sophianopoulou, M. Koukaki, C. Scazzocchio, G. Diallinas (2004) Transcription of purine transporter genes is activated during the isotropic growth phase of *Aspergillus nidulans* conidia. *Molecular Microbiology* 52 (1): 205-216.
- Armstrong, D.J. (1994) Cytokinin oxidase and the regulation of cytokinin degradation. In: D.W.S. Mok, M.C. Mok (Hrsg.) *Cytokinins: chemistry, activity, and function*. CRC Press, Boca Raton: 139-154.
- Arnold, K., L. Bordoli, J. Kopp, T. Schwede (2006) The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* (22): 195-201.
- Ashihara, H. (1983) Changes in activities of purine salvage and ureide synthesis during germination of black gram (*Phaseolus mungo*) seeds. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 113: 47-60.
- Ashihara, H., Y. Takasawa, T. Suzuki (1997) Metabolic fate of guanosine in higher plants. *Physiologia Plantarum* 100: 909-916.
- Ashihara, H., C. Stasolla, N. Loukanina, T.A. Thorpe (2001) Purine metabolism during white spruce somatic embryo development: salvage of adenine, adenosine, and inosine. *Plant Science* 160: 647-657
- Ashihara, H., S. Wakahara, M. Suzuki, A. Kato, H. Sasamoto, S. Baba (2003) Comparison of adenosine metabolism in leaves of several mangrove plants and a poplar species. *Plant Physiology and Biochemistry* 41: 133-139.
- Ashihara, H., T. Suzuki (2004) Distribution and biosynthesis of caffeine in plants. *Frontiers in Bioscience* 9: 1864-1876.
- Ashton, N.W., D.J. Cove (1977) The isolation and preliminary characterisation of auxotrophic and analogue resistant mutants of the moss, *Physcomitrella patens*. *Molecular and General Genetics* 154: 87-95.
- Ashton, N.W., N.H. Grimsley, D.J. Cove (1979) Analysis of gametophytic development in the moss, *Physcomitrella patens*, using auxin and cytokinin resistant mutants. *Planta* 144: 427-435.
- Atkins, C.A., P.J. Storer, B.J. Shelp (1989) Purification and properties of purine nucleosidase from N₂-fixing nodules of cowpea (*Vigna unguiculata*). *Journal of Plant Physiology* 134: 447-452.
- Atkins, C.A., P.M.C. Smith, P. Storer (1997) Reexamination of intracellular localization of de novo purine synthesis in cowpea nodules. *Plant Physiology* 113: 127-135.
- Bauer, A., F. Kaufmann, H. Rolli, A. Weise, R. Luethje, B. Berg, M. Braun, W. Baeumer, M. Kietzmann, R. Reski, G. Gorr (2005) A fast and flexible PEG-mediated transient expression system in plants for high level expression of secreted recombinant proteins. *Journal of Biotechnology* 119: 332-342.
- Bezanilla, M., A. Pan, R.S. Quatrano (2003) RNA interference in the moss *Physcomitrella patens*. *Plant Physiology* 133: 470-474.

- Bieleski, R.L. (1964) The problem of halting enzyme action when extracting plant tissues. *Analytical Biochemistry* 9: 431-442.
- Boldt, R., S. Messutat (2003) Nucleotide metabolism in higher plants. The purine and pyrimidine phosphoribosyltransferase gene family in *A. thaliana*. In: B. Wittmann-Liebold, C. Schnarrenberger (Hrsg.) Gene families and isozymes. Medimont Int. Proc, Berlin: 229-234.
- Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Brychkova, G., Z. Alikulov, R. Fluhr, M. Sagi (2008) A critical role for ureides in dark and senescence-induced purine remobilization is unmasked in the *Atxdh1 Arabidopsis* mutant. *The Plant Journal* 54 (3): 496-509.
- Burch, L.R., T. Stuchbury (1986) Purification and properties of adenosine nucleosidases from tomato (*Lycopersicon esculentum*) roots and leaves. *Journal of Plant Physiology* 125: 267-273.
- Bürkle, L., A. Cedzich, C. Döpke, H. Stransky, S. Okumoto, B. Gillissen, C. Kühn, W.B. Frommer (2003) Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 34: 13-26.
- Campos, A., M.J. Rijo-Johansen, M.F. Carneiro, P. Fevereiro (2005) Purification and characterisation of adenosine nucleosidase from *Coffea arabica* young leaves. *Phytochemistry* 66 (2): 147-151.
- Cao, D., J.J. Leffert, J. McCabe, B. Kim, G. Pizzorno (2005) Abnormalities in uridine homeostatic regulation and pyrimidine nucleotide metabolism as a consequence of the deletion of the uridine phosphorylase gene. *The Journal of Biological Chemistry* 280 (22): 21169-21175.
- Castresana, J. (2000) Selection of conserved blocks from multiple alignments for their use in phylogenetic analysis. *Molecular Biology and Evolution* 17: 540-552.
- Chen, C.-M., B. Petschow (1978) Metabolism of cytokinin. Ribosylation of cytokinin bases by adenosine phosphorylase from wheat germ. *Plant Physiology* 62: 871-874.
- Chen, C.-M., S.M. Kristopeit (1981) Metabolism of cytokinin: deribosylation of cytokinin ribonucleoside by adenosine nucleosidase from wheat germ cells. *Plant Physiology* 68: 1020-1023.
- Cove, D. (2000) The moss, *Physcomitrella patens*. *Journal of Plant Growth Regulation* 19: 275-283.
- Cove, D. (2005) The moss, *Physcomitrella patens*. *Annual Review of Genetics* 39: 339-358.
- Cove, D., M. Bezanilla, P. Harries, R. Quatrano (2006) Mosses as model systems for the study of metabolism and development. *Annual Review of Plant Biology* 57: 497-520.
- Danyluk, J., F. Sarhan (1990) Differential mRNA transcription during the induction of freezing tolerance in spring and winter wheat. *Plant Cell Physiology* 31 (5): 609-619.
- Decker, E.L., W. Frank, E. Sarnighausen, R. Reski (2006) Moss systems biology en route: phytohormones in *Physcomitrella* development. *Plant Biology* 8: 397-406.
- Degano, M., D.N. Gopaul, G. Scapin, V.L. Schramm, J.C. Sacchettini (1996) Three-dimensional structure of the inosine-uridine nucleoside *N*-ribohydrolase from *Crithidia fasciculata*. *Biochemistry* 35: 5971-5981.
- Degano, M., S.C. Almo, J.C. Sacchettini, V.L. Schramm (1998) Trypanosomal nucleoside hydrolase. A novel mechanism from the structure with a transition-state inhibitor. *Biochemistry* 37: 6277-6285.
- Deng, W.-W., H. Ashihara (2010) Profiles of purine metabolism in leaves and roots of *Camellia sinensis* seedlings. *Plant Cell Physiology* 51 (12): 2105-2118.

- Desimone, M., E. Catoni, U. Ludewig, M. Hilpert, A. Schneider, R. Kunze, M. Tegeder, W.B. Frommer, K. Schumacher (2002) A novel superfamily of transporters for allantoin and other oxo derivatives of nitrogen heterocyclic compounds in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 14: 847-856.
- Edgar, R.C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Research* 32 (5): 1792-1797.
- Emanuelsson, O., S. Brunak, G. von Heijne, H. Nielsen (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP, and related tools. *Nature Protocols* 2: 953-971.
- Estupiñán, B., V.L. Schramm (1994) Guanosine-inosine-preferring nucleoside *N*-glycohydrolase from *Crithidia fasciculata*. *The Journal of Biological Chemistry* 269 (37): 23068-23073.
- Frahm, J-P., W. Frey (2007) Moosflora. Eugen Ulmer, Stuttgart.
- Galuszka, P., H. Popelková, T. Werner, J. Frébortová, H. Pospíšilová, V. Mik, I. Köllmer, T. Schmülling, I. Frébort (2007) Biochemical characterization of cytokinin oxidases/dehydrogenases from *Arabidopsis thaliana* expressed in *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Growth Regulation* 26 (3): 255-267.
- Geigenberger, P., B. Regierer, A. Nunes-Nesi, A. Leisse, E. Urbanczyk-Wochniak, F. Springer, J.T. van Dongen, J. Kossmann, A.R. Fernie (2005) Inhibition of de novo pyrimidine synthesis in growing potato tubers leads to a compensatory stimulation of the pyrimidine salvage pathway and a subsequent increase in biosynthetic performance. *The Plant Cell* 17: 2077-2088.
- Giabbai, B., M. Degano (2004) Crystal structure to 1.7 Å of the *Escherichia coli* pyrimidine nucleoside hydrolase YeiK, a novel candidate for cancer gene therapy. *Structure* 12 (5): 739-749.
- Gillissen, B., L. Bürkle, B. André, C. Kühn, D. Rentsch, B. Brandl, W.B. Frommer (2000) A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 12: 291-300.
- Guindon, S., O. Gascuel (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systematic Biology* 52 (5): 696-704.
- Guranowski, A., Z. Schneider (1977) Purification and characterization of adenosine nucleosidase from barley leaves. *Biochimica et Biophysica Acta* 482: 145-158.
- Guranowski, A., J. Pawelkiewicz (1978) Adenosylhomocysteinase and adenosine nucleosidase activities in *Lupinus luteus* cotyledons during seed formation and germination. *Planta* 139: 245-247.
- Guranowski, A., J. Barankiewicz (1979) Purine salvage in cotyledons of germinating lupin seeds. *FEBS Letters* 104: 95-98.
- Guranowski, A. (1982) Purine catabolism in plants. Purification and some properties of inosine nucleosidase from yellow lupin (*Lupinus luteus* L.) seeds. *Plant Physiology* 70: 344-349.
- Hanahan, D. (1985) Techniques for transformation of *E. coli*. In: D.M. Glover (Hrsg.) *DNA-Cloning: A Practical Approach*. Oxford: 109-135.
- Hansen, M.R., G. Dandanell (2005) Purification and characterization of RihC, a xanthosine-inosine-uridine-adenosine-preferring hydrolase from *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *Biochimica et Biophysica Acta* 1723: 55-62.
- Henderson, J.F., A.R.P. Paterson (1973) *Nucleotide Metabolism - An Introduction*. Academic Press, New York.
- Herrmann, M.M., S. Pinto, J. Kluth, U. Wienand, R. Lorbiecke (2006) The PTI1-like kinase ZmPti1a from maize (*Zea mays* L.) co-localizes with callose at the plasma membrane of pollen and facilitates a competitive advantage to the male gametophyte. *BMC Plant Biology* doi:10.1186/1471-2229-6-22.

- Heyl, A., T. Schmülling (2003) Cytokinin signal perception and transduction. *Current Opinion in Plant Biology* 6: 480-488.
- Hirose, N., N. Makita, T. Yamaya, H. Sakakibara (2005) Functional characterization and expression analysis of a gene, *OsENT2*, encoding an equilibrative nucleoside transporter in rice suggest a function in cytokinin transport. *Plant Physiology* 138: 196-206.
- Höglund, A., P. Dönnies, T. Blum, H.-W. Adolph, O. Kohlbacher (2006) MultiLoc: prediction of protein subcellular localization using N-terminal targeting sequences, sequence motifs, and amino acid composition. *Bioinformatics* 22 (10): 1158-1165.
- Imagawa, H., H. Yamano, K. Inoue, Y. Takino (1979) Purification and properties of adenosine nucleosidase from tea leaves. *Agricultural Biology and Chemistry* 43 (11): 2337-2342.
- Inoue, T., M. Higuchi, Y. Hashimoto, M. Seki, M. Kobayashi, T. Kato, S. Tabata, K. Shinozaki, T. Kakimoto (2001) Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 409: 1060-1063.
- Jung, B., M. Flörchinger, H.-H. Kunz, M. Traub, R. Wartenberg, W. Jeblick, H.E. Neuhaus, T. Möhlmann (2009) Uridine-ribohydrolase is a key regulator in the uridine degradation pathway of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* doi: 10.1105/tpc.108.062612.
- Jung, B., C. Hoffmann, T. Möhlmann (2011) *Arabidopsis* nucleoside hydrolases involved in intracellular and extracellular degradation of purines. *The Plant Journal* 65: 703-711.
- Kamisugi, Y., A.C. Cuming (2005) Gene targeting. In: C.D. Knight, P.-F. Perroud, D.J. Cove (Hrsg.) *Annual Plant Reviews - The Moss *Physcomitrella patens**. Wiley-Blackwell, Oxford: 76-112.
- Kamisugi, Y., A.C. Cuming, D.J. Cove (2005) Parameters determining the efficiency of gene targeting in the moss *Physcomitrella patens*. *Nucleic Acid Research* doi:10.1093/nar/gni172.
- Katahira, R., H. Ashihara (2002) Profiles of pyrimidine biosynthesis, salvage and degradation in disks of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Planta* 215: 821-828.
- Katahira, R., H. Ashihara (2006) Profiles of purine biosynthesis, salvage and degradation in disks of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. *Planta*, 225: 115-126.
- Khraiwesh, B., S. Ossowski, D. Weigel, R. Reski, W. Frank (2008) Specific gene silencing by artificial microRNAs in *Physcomitrella patens*: an alternative to targeted gene knockouts. *Plant Physiology* 148: 684-693.
- Kim, H.-S., J.-H. Lee, W.-S. Lee, W.-G. Bang (2006) Genes encoding ribonucleoside hydrolase 1 and 2 from *Corynebacterium ammoniagenes*. *Microbiology* 152: 1169-1177.
- Kirchberger, S., J. Tjaden, H.E. Neuhaus (2008) Characterization of the *Arabidopsis* Brittle 1 transport protein and impact of reduced activity on plant metabolism. *The Plant Journal* 56: 51-63.
- Knight, C.D., D.J. Cove, P.J. Boyd, N.W. Ashton (1988) The isolation of biochemical and developmental mutants in *Physcomitrella patens*. In: J. M. Glime (Hrsg.) *Methods in Bryology*. The Hattori Botanical Laboratory, Nichinan: 47-58.
- Koshiishi, C., A. Kato, S. Yama, A. Crozier, H. Ashihara (2001) A new caffeine biosynthetic pathway in tea leaves: utilisation of adenosine released from the S-adenosyl-L-methionine cycle. *FEBS Letters* 499: 50-54.
- Kurakawa, T., N. Ueda, M. Maekawa, K. Kobayashi, M. Kojima, Y. Nagato, H. Sakakibara, J. Kyojuka (2007) Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* doi:10.1038/nature05504.

- Kuroha, T., H. Tokunaga, M. Kojima, N. Ueda, T. Ishida, S. Nagawa, H. Fukuda, K. Sugimoto, H. Sakakibara (2009) Functional analyses of *LONELY GUY* cytokinin-activating enzymes reveal the importance of the direct activation pathway in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 21: 3152-3169.
- Kurtz, J.-E., F. Exinger, P. Erbs, R. Jund (2002) The *URH1* uridine ribohydrolase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* 41: 132-141.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- Lambert, C., N. Léonard, X. De Bolle, D. Depiereux (2002) ESyPred3D: prediction of proteins 3D structures. *Bioinformatics* 18 (9): 1250-1256.
- Lang, D., J. Eisinger, R. Reski, S.A. Rensing (2005) Representation and high-quality annotation of the *Physcomitrella patens* transcriptome demonstrates a high proportion of proteins involved in metabolism in mosses. *Plant Biology* 7 (3): 238-250.
- Lang, D., A. Zimmer, S.A. Rensing, R. Reski (2008) Exploring plant biodiversity: the *Physcomitrella* genome and beyond. *Trends in Plant Science* 13 (10): 542-549.
- Larkin, M.A., G. Blackshields, N.P. Brown, R. Chenna, P.A. McGettigan, H. McWilliam, F. Valentin, I.M. Wallace, A. Wilm, R. Lopez, J.D. Thompson, T.J. Gibson, D.G. Higgins (2007) Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23 (21): 2947-2948.
- Le, S.Q., O. Gascuel (2008) An improved general amino acid replacement matrix. *Molecular Biology and Evolution* 25 (7): 1307-1320.
- Le Floc'h, F., J. Lafleuriel (1981) The purine nucleosidases of Jerusalem artichoke shoots. *Phytochemistry* 20 (9): 2127-2129.
- Le Floc'h, F., J. Lafleuriel (1983) The role of mitochondria in the recycling of adenine into purine nucleotides in the Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.). *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 113: 61-71.
- Leszczynska, D., Z. Schneider, M. Tomaszewski, M. Maćkowiak (1984) Comparative studies on adenosine nucleosidase occurrence in plants. *Annals of Botany* 54: 847-849.
- Li, G., K. Liu, S.A. Baldwin, D. Wang (2003) Equilibrative nucleoside transporters of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 278 (37): 35732-35742.
- Liang, L., X. He, G. Liu, H. Tan (2008) The role of a purine-specific nucleoside hydrolase in spore germination of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiology* 154: 1333-1340.
- Liu, X., W. Qian, X. Liu, H. Qin, D. Wang (2007) Molecular and functional analysis of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* 175 (3): 448-461.
- Magni, G., E. Fioretti, P.L. Ipata, P. Natalini (1975) Baker's yeast uridine nucleosidase. Purification, composition, and physical and enzymatic properties. *The Journal of Biological Chemistry* 250 (1): 9-13.
- Matthews, B.W. (1968) Solvent content of protein crystals. *Journal of Molecular Biology* 33: 491-497.
- Maurino, V.G., E. Grube, J. Zielinski, A. Schild, K. Fischer, U.I. Flügge (2006) Identification and expression analysis of twelve members of the nucleobase-ascorbate transporter (NAT) gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant & Cell Physiology* 47 (10): 1381-1393.
- Mazelis, M., R.K. Creveling (1963) An adenosine hydrolase from brussel sprouts. *The Journal of Biological Chemistry* 238 (10): 3358-3361.
- Meyer, R., K.G. Wagner (1985) Determination of nucleotide pools in plant tissue by high-performance liquid chromatography. *Analytical Biochemistry* 148: 269-276.

- Miyawaki, K., M. Matsumoto-Kitano, T. Kakimoto (2004) Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant Journal* 37: 128-138.
- Moffatt, B.A., C. Somerville (1988) Positive selection for male-sterile mutants of *Arabidopsis* lacking adenine phosphoribosyl transferase activity. *Plant Physiology* 86: 1150-1154.
- Moffatt, B.A., E.A. McWhinnie, S.K. Agarwal, D.A. Schaff (1994) The adenine phosphoribosyltransferase-encoding gene of *Arabidopsis thaliana*. *Gene* 143: 211-216.
- Moffatt, B.A., L. Wang, M.S. Allen, Y.Y. Stevens, W. Qin, J. Snider, K.v. Schwartzberg (2000) Adenosine kinase of *Arabidopsis*. Kinetic properties and gene expression. *Plant Physiology* 124 (4): 1775-1785.
- Moffatt, B.A., Y.Y. Stevens, M.S. Allen, J.D. Snider, L.A. Pereira, M.I. Todorova, P.S. Summers, E.A. Weretilnyk, L. Martin-McCaffrey, C. Wagner (2002) Adenosine kinase deficiency is associated with developmental abnormalities and reduced transmethylation. *Plant Physiology* 128 (3): 812-821.
- Moffatt, B.A., H. Ashihara (2002) Purine and pyrimidine nucleotide synthesis and metabolism. In: C.R. Somerville, E.M. Meyerowitz (Hrsg.) *The Arabidopsis Book*. American Society of Plant Biologists.
- Möhlmann, T., Z. Mezher, G. Schwerdtfeger, H.E. Neuhaus (2001) Characterisation of a concentrative type of adenosine transporter from *Arabidopsis thaliana* (ENT, At). *FEBS Letters* 509: 370-374.
- Möhlmann, T., C. Bernard, S. Hach, H.E. Neuhaus (2010) Nucleoside transport and associated metabolism. *Plant Biology* 12: 26-34.
- Mok, D.W.S., M.C. Mok (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52: 89-118.
- Mülhardt, C. (2009) *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics*. Spectrum Akademischer Verlag, Heidelberg.
- Page, R.D.M (1996) TreeView: an application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12 (4): 357-358.
- Parkin, D.W., B.A. Horenstein, D.R. Abdulah, B. Estupiñán, V.L. Schramm (1991) Nucleoside hydrolase from *Crithidia fasciculata*. Metabolic role, purification, specificity, and kinetic mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 266 (31): 20658-20665.
- Parkin, D. W. (1996) Purine-specific nucleoside *N*-ribohydrolase from *Trypanosoma brucei brucei*. Purification, specificity, and kinetic mechanism. *The Journal of Biological Chemistry* 271 (36): 21713-21719.
- Pérez-Vicente, R., J. Cárdenas, M. Pineda (1991) Distinction between hypoxanthine and xanthine transport in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 95: 126-130.
- Petersen, C., L.B. Møller (2001) The RihA, RihB, and RihC ribonucleoside hydrolases of *Escherichia coli*. Substrate specificity, gene expression, and regulation. *The Journal of Biological Chemistry* 276 (2): 884-894.
- Phillips, D.A., C.M. Joseph, P.R. Hirsch (1997) Occurrence of flavonoids and nucleosides in agricultural soils. *Applied and Environmental Microbiology* 63 (11): 4573-4577.
- Pils, B., A. Heyl (2009) Unraveling the evolution of cytokinin signaling. *Plant Physiology* 151: 782-791.
- Pospíšilová, H., M. Sebelá, O. Novák, I. Frébort (2008) Hydrolytic cleavage of N⁶-substituted adenine derivatives by eukaryotic adenine and adenosine deaminases. *Bioscience Reports* 28 (6): 335-347.
- Price, C.E., A.W. Murray (1969) Purine metabolism in germinating wheat embryos. *Biochemical Journal* 115: 129-133.

- Prigge, M.J., M. Bezanilla (2010) Evolutionary crossroads in developmental biology: *Physcomitrella patens*. *Development* 137: 3535-3543.
- Rensing, S.A., S. Rombauts, A. Hohe, D. Lang, E. Duwenig, P. Rouze, Y. Van de Peer, R. Reski, (2002) The transcriptome of the moss *Physcomitrella patens*: comparative analysis reveals a rich source of new genes. http://www.plant-biotech.net/Rensing_et_al_transcriptome2002.pdf.
- Rensing, S.A., D. Fritzowsky, D. Lang, R. Reski (2005) Protein encoding genes in an ancient plant: analysis of codon usage, retained genes and splice sites in a moss, *Physcomitrella patens*. *BMC Genomics* doi:10.1186/1471-2164-6-43.
- Rensing, S.A., J. Ick, J.A. Fawcett, D. Lang, A. Zimmer, Y. Van de Peer, R. Reski (2007) An ancient genome duplication contributed to the abundance of metabolic genes in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Evolutionary Biology* doi:10.1186/1471-2148-7-130.
- Rensing, S.A., D. Lang, A.D. Zimmer, A. Terry, A. Salamov, H. Shapiro, T. Nishiyama, P.-F. Perroud, E.A. Lindquist, Y. Kamisugi, T. Tanahashi, K. Sakakibara *et al.* (2008) The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319: 64-69.
- Reski, R., W.O. Abel (1995) Induction of budding on chloronemata and caulonemata of the moss, *Physcomitrella patens*, using isopentenyladenine. *Planta* 165: 354-358.
- Reski, R., K. Reutter, B. Karsten, M. Faust, S. Kruse, G. Gorr, R. Strepp, W.O. Abel (1995) Molecular analysis of chloroplast division. In: M. Terzi, R. Cella, A. Falavigna (Hrsg.) *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht: 291-296.
- Ribeiro, J.M., J.G. Valenzuela (2003) The salivary purine nucleosidase of the mosquito, *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 33: 13-22.
- Richter, H. (2008) Organisation and transcriptional regulation of the polyphenol oxidase (PPO) multigene family of the moss *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. and functional gene knockout of PpPPO1. Dissertation, Hamburg.
- Riewe, D., L. Grosman, A.R. Fernie, H. Zauber, C. Wucke, P. Geigenberger (2008) A cell wall-bound adenosine nucleosidase is involved in the salvage of extracellular ATP in *Solanum tuberosum*. *Plant Cell Physiology* 49 (10): 1572-1579.
- Robert, F., G. Pétel, G. Risser, M. Gendraud (1997) Determination of the growth potential of strawberry plants (*Fragaria x ananassa* Duch.) by morphological and nucleotide measurements in relation to chilling. *Canadian Journal of Plant Science* 77 (1): 127-132.
- Rolfes, R.J. (2006) Regulation of purine nucleotide biosynthesis: in yeast and beyond. *Biochemical Society Transactions* 34 (5): 786-790.
- Sakakibara, H. (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review in Plant Biology* 57: 431-449.
- Sakakibara, H. (2007) Cytokinin biosynthesis and metabolism. In: P.J. Davies (Hrsg.) *Plant Hormones - biosynthesis, signal transduction, action!* Springer, Dordrecht: 95-114.
- Sawahel, W., S. Onde, C.D. Knight, D.J. Cove (1992) Transfer of foreign DNA into *Physcomitrella patens* protonemal tissue by using the gene gun. *Plant Molecular Biology Reporter* 10 (4): 314-315.
- Sawert, A., A.I. Backer, K.-H. Plank-Schumacher, K.G. Wagner (1987) Determination of nucleotides and nucleosides in cereal leaves by high performance liquid chromatography. *Journal of Plant Physiology* 127: 183-186.
- Sawert, A., A.I. Backer, K.G. Wagner (1988) Age-dependent decrease of nucleoside pools in cereal leaves. *Plant Cell Physiology* 29 (1): 61-65.

- Schaefer, D.G., J.-P. Zyrd, C.D. Knight, D.J. Cove (1991) Stable transformation of the moss *Physcomitrella patens*. *Molecular Genetics and Genomics* 226: 418-424.
- Schaefer, D.G. (2001) Gene targeting in *Physcomitrella patens*. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 143-150.
- Schaefer, D.G. (2002) A new moss genetics: targeted mutagenesis in *Physcomitrella patens*. *Annual Review of Plant Biology* 53: 477-501.
- Schwartzberg, K.v., S. Kruse, R. Reski, B. Moffatt, M. Laloue (1998) Cloning and characterization of an adenosine kinase from *Physcomitrella* involved in cytokinin metabolism. *The Plant Journal* 13 (2): 249-257.
- Schwartzberg, K.v., C. Pethe, M. Laloue (2003) Cytokinin metabolism in *Physcomitrella patens* - differences and similarities to higher plants. *Plant Growth Regulation* 39: 99-106.
- Schwartzberg, K.v. (2006) Moss biology and phytohormones - Cytokinins in *Physcomitrella*. *Plant Biology* 8: 382-388.
- Schwartzberg, K.v., M. Fernández Núñez, H. Blaschke, P.I. Dobrev, O. Novák, V. Motyka, M. Strnad (2007) Cytokinins in the bryophyte *Physcomitrella patens*: analyses of activity, distribution and cytokinin oxidase/dehydrogenase overexpression reveal the role of extracellular cytokinins. *Plant Physiology* 145 (3): 786-800.
- Schween, G., A. Hohe, J. Schulte, R. Reski (2005) Effect of ploidy level on growth, differentiation, and morphology in *Physcomitrella patens*. *The Bryologist* 108 (1): 27-35.
- Senecoff, J.F., R.B. Meagher (1993) Isolating the *Arabidopsis thaliana* genes for de novo purine synthesis by suppression of *Escherichia coli* mutants. I. 5'-phosphoribosyl-5-aminoimidazole synthetase. *Plant Physiology* 102: 387-399.
- Senecoff, J.F., E.C. McKinney, R.B. Meagher (1996) De novo purine synthesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The *PUR7* gene encoding 5'-phosphoribosyl-4-(*N*-succinocarboxamide)-5-aminoimidazole synthetase is expressed in rapidly dividing tissues. *Plant Physiology* 112 (3): 905-917.
- Shi, W., V.L. Schramm, S.C. Almo (1999) Nucleoside hydrolase from *Leishmania major*. Cloning, expression, catalytic properties, transition state inhibitors, and the 2.5-Å crystal structure. *The Journal of Biological Chemistry* 274 (30): 21114-21120.
- Smith, P.M.C., C.A. Atkins (2002) Purine biosynthesis. Big in cell division, even bigger in nitrogen assimilation. *Plant Physiology* 128: 793-802.
- Song, C.J., I. Steinebrunner, X. Wang, S.C. Stout, S.J. Roux (2006) Extracellular ATP induces the accumulation of superoxide via NADPH oxidases in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 140: 1222-1232.
- Stasolla, C., N. Loukanina, H. Ashihara, E.C. Yeung, T.A. Thorpe (2001) Ascorbic acid changes the pattern of purine metabolism during germination of white spruce somatic embryos. *Tree Physiology* 21: 359-367.
- Stasolla, C., R. Katahira, T.A. Thorpe, H. Ashihara (2003) Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. *Journal of Plant Physiology* 160: 1271-1295.
- Strnad, M. (1997) The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* 101: 674-688.
- Sugiura, M., Y. Takeda (2000) Nucleic acids. In: B.B. Buchanan, W. Gruissem, R.L. Jones (Hrsg.) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. American Society of Plant Physiologists: 260-310.
- Sugirua, C., Y. Kobayashi, S. Aoki, C. Sugita, M. Sugita (2003) Complete chloroplast DNA sequence of the moss *Physcomitrella patens*: evidence for the loss and relocation of *rpoA* from the chloroplast to the nucleus. *Nucleic Acids Research* 31 (18): 5324-5331.

- Suzuki, T., K. Ishikawa, T. Yamashino, T. Mizuno (2002) An *Arabidopsis* histidine-containing phosphotransfer (hpt) factor implicated in phosphorelay signal transduction: overexpression of AHP2 in plants results in hypersensitiveness to cytokinin. *Plant and Cell Physiology* 43 (1): 123-129.
- Szuwart, M., E. Starzyńska, M. Pietrowska-Borek, A. Guranowski (2006) Calcium-stimulated guanosine-inosine nucleosidase from yellow lupin (*Lupinus luteus*). *Phytochemistry* 67: 1476-1485.
- Terasawa, K., M. Odahara, Y. Kabeya, T. Kikugawa, Y. Sekine, M. Fujiwara, N. Sato (2007) The mitochondrial genome of the moss *Physcomitrella patens* sheds new light on mitochondrial evolution in land plants. *Molecular Biology and Evolution* 24 (3): 699-709.
- Towbin, H., T. Staehelin, J. Gordon (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS* 76 (9): 4350-4354.
- Verseés, W., K. Decanniere, R. Pelle, J. Depoorter, E. Brosens, D.W. Parkin, J. Steyaert (2001) Structure and function of a novel purine specific nucleoside hydrolase from *Trypanosoma vivax*. *Journal of Molecular Biology* 307: 1363-1379.
- Verseés, W., J. Steyaert (2003) Catalysis by nucleoside hydrolases. *Current Opinion in Structural Biology* 13: 731-738.
- Verseés, W., E. Van Holsbeke, S. De Vos, K. Decanniere, I. Zegers, J. Steyaert (2003) Cloning, preliminary characterization and crystallization of nucleoside hydrolases from *Caenorhabditis elegans* and *Campylobacter jejuni*. *Acta Crystallographica Section D, Biological Crystallography* 59: 1087-1089.
- Verseés, W., J. Barlow, J. Steyaert (2006) Transition-state complex of the purine-specific nucleoside hydrolase of *T. vivax*: enzyme conformational changes and implications for catalysis. *Journal of Molecular Biology* 359: 331-346.
- Vidal, E.A., R.A. Gutiérrez (2008) A systems view of nitrogen nutrient and metabolite responses in *Arabidopsis*. *Current Opinion in Plant Biology* 11: 1-9.
- Vidmar, J.J., D. Zhuo, M.Y. Siddiqi, J.K. Schjoerring, B. Touraine, A.D.M. Glass (2000) Regulation of high-affinity nitrate transporter genes and high-affinity nitrate influx by nitrogen pools in roots of barley. *Plant Physiology* 123: 307-318.
- Vlietland-Nowotny, P. (2010) Characterisation of ribohydrolases in the bryophyte *Physcomitrella patens* (Hedw.) B.S.G. Masterarbeit, Hamburg.
- Wagner, K.G., A.I. Backer (1992) Dynamics of nucleotides in plants studied on a cellular level. In: K.W. Jeon, M. Friedlander (Hrsg.) *International Review of Cytology*. Academic Press, San Diego: 1-84.
- Wang, T.L., D.J. Cove, P. Beutelmann, E. Hartmann (1980) Isopentenyladenine from mutants of the moss *Physcomitrella patens*. *Phytochemistry* 19: 1103-1105.
- Waterhouse, A.M., J.B. Procter, D.M. Martin, M. Clamp, G.J. Barton (2009) Jalview Version 2 - a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics* 25: 1189-1191.
- Weretilnyk, E.A., K.J. Alexander, M. Drebenstedt, J.D. Snider, P.S. Summers, B.A. Moffatt (2001) Maintaining methylation activities during salt stress. The involvement of adenosine kinase. *Plant Physiology* 12: 856-865.
- Winkler, R.G., D.G. Blevins, J.C. Polacco, D.D. Randall (1988) Ureide catabolism in nitrogen-fixing legumes. *Trends in Biochemical Sciences* 13 (3): 97-100.
- Wormit, A., M. Traub, M. Flörchinger, H.E. Neuhaus, T. Möhlmann (2004) Characterization of three novel members of the *Arabidopsis thaliana* equilibrative nucleoside transporter (ENT) family. *Biochemical Journal* 383: 19-26.

- Xu, J., H.Y. Zhang, C.H. Xie, H.W. Xue, P. Dijkhuis, C.M. Liu (2005) *EMBRYONIC FACTOR I* encodes an AMP deaminase and is essential for zygote to embryo transition in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 42: 743-756.
- Yabuki, N., H. Ashihara (1991) Catabolism of adenine nucleotides in suspension-cultured plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta* 1073: 474-480.
- Yang, J., K.H. Han (2004) Functional characterization of allantoinase genes from *Arabidopsis thaliana* and a nonureide-type legume black locust. *Plant Physiology* 134: 1039-1049.
- Yesbergenova, Z., G.H. Yang, H. Oron, D. Soffer, R. Fluhr, M. Sagi (2005) The plant Mo-hydroxylases aldehyde oxidase and xanthine dehydrogenase have distinct reactive oxygen species signatures and are induced by drought and abscisic acid. *The Plant Journal* 42: 862-876.
- Zalkin, H., P.P. Nygaard (1996) Biosynthesis of purine nucleotides. In: F.C. Neidhardt *et al.* (Hrsg.) *Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington: 561-579.
- Zeidler, M., E. Hartmann, J. Hughes (1999) Transgene expression in the moss *Ceratodon purpureus*. *Journal of Plant Physiology* 154: 641-650.
- Zrenner, R., M. Stitt, U. Sonnewald, R. Boldt (2006) Pyrimidine and purine biosynthesis and degradation in plants. *The Annual Review of Plant Biology* 57: 805-836.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Chemische Symbole und Internationale SI Einheiten sind nicht aufgeführt.

³ H-Ado	Tritium-markiertes Adenosin
³ H-Ino	Tritium-markiertes Inosin
³ H-iPR	Tritium-markiertes Isopentenyladenosin
35 S Prom	<i>Cauliflower mosaic virus</i> 35S Promoter
35 S Term	<i>Cauliflower mosaic virus</i> 35S Terminator
aa	Aminosäure(n)
ABA	Abscisinsäure
ACT	Actin
ADK	Adenosinkinase
AMP, ADP, ATP	Adenosinmono-, -di- und -triphosphat
APRT	Adeninphosphoribosyltransferase
BA	Benzyladenin
BAR	Benzyladenosin
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tools</i>
BLE	Zeocin Resistenz Gen
(M)bp	(Mega)Basenpaar(e)
BSA	Bovine Serum Albumin
CaMV	<i>Cauliflower mosaic virus</i>
cDNA	komplementäre DNA
CKX	Cytokininoxidase/dehydrogenase
CTAB	Cetyltrimethylammoniumbromid
cZ	<i>cis</i> -Zeatin
(k)Da	(Kilo)Dalton
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DHZ	Dihydrozeatin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
dpm	Zerfälle pro Minute
DTT	Dithiothreitol
eATP	Extrazelluläres ATP
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycoltetraessigsäure
EST	<i>Expressed sequence tag</i>
FG	Frischgewicht
FPLC	<i>Fast protein liquid chromatography</i>
G418	Geneticin
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GMP, GDP, GTP	Guanosinmono-, -di- und -triphosphat
GUS	β-Glucuronidase
HPH	Hygromycin-Phosphotransferase
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IMP	Inosinmonophosphat

iP	Isopentenyladenin
iPR	Isopentenyladenosin
iPRMP, iPRDP, iPRTP	Isopentenyladenosinmono-, -di- und -triphosphat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JGI	Joint Genome Institute
kb	Kilobasenpaar(e)
KO	<i>Knockout</i>
LC-MS	Flüssigchromatographie mit Massenspektrometrie-Kopplung
LSC	Flüssigszintillationszählung
Lm	Laufmittel
M	Marker
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MW	Molekulargewicht
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NPTII	Neomycinphosphotransferase II
NSH	Nukleosid-Hydrolase
OD	Optische Dichte
ORF	<i>Open reading frame</i>
Os	Osmolarität
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglycol
pl	Isoelektrischer Punkt
PRPP	5-Phosphoribosyl-1-pyrophosphat
PVPP	Polyvinylpolypyrrolidon
RH	Ribohydrolase
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen per Minute
RT	Reverse Transkriptase/Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
SUMO	<i>Small ubiquitin-like modifier</i>
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA
TE	Tris/EDTA
TEA	Triethylamin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TES	Spurenelement-Lösung
TG	Trockengewicht
TLC	Dünnschichtchromatografie
Tris	Trihydroxymethylaminoethan
tRNA	<i>transfer-RNA</i>
tZ	<i>trans-Zeatin</i>
UMP, UDP, UTP	Uridinmono-, -di- und -triphosphat
UTR	Untranslatierter Bereich
UV	Ultraviolett
v/v	Volumen pro Volumen
w/v	Gewicht pro Volumen
WT	Wildtyp
XMP	Xanthosinmonophosphat

6.2 Ergänzende Daten

6.2.1 Aminosäure-Sequenz von PpRH1

Aminosäure-Sequenz von PpRH1 basierend auf der durch PCR-Experimente erhaltenen cDNA-Sequenz (übereinstimmend mit der Aminosäure-Sequenz des Genmodell: Pp1s357_22V2.1)

MAVPENVVGTIKQSSPPKKVIIDTPGIDDAMAIFALKSPELDVIALTTIYGNVRTPTATVNALHLLFAGREDIPVSE
 GFRTSLRGELKERIADVFHGDGLGNTYPTLSDRKPIDTFAPDYLIQKVNEFPGEITIVALGPLTNLAAAVECDPTFAK
 KVGQIIILGGAFQVNGNVNPAAEANIYGDPEAADIIFTGADILVVGINITHQVYWTGKDLEDLGRSDSKFGKYLAA
 SHFYATYHREAYDIDAIYLHDPATMVAAVDPPLMTYATGAVRVQKDGICKGLTLFNNSNKVWHDPTDWCGIPPVK
 VAVTVDRERVASLLKERLTAP

6.2.2 Aminosäure-Sequenzen von PpRH2

Für die Gensynthese verwendete Aminosäure-Sequenz von PpRH2 (basierend auf dem Genmodell Pp1s140_172V2.1)

MAEYVEVSKNPARKRVIIDTPGIDDMMAIFMAFEAPGIEVIGLTTIFGNVDIDLATKNALHLCEMTGHPEIPVAEG
 PSEPLKRVKPRIAYFVHGS DGLGNTFQANPKGQKSSKSAADFLEKVAEFPGEVTVVALGPLTNIALAIQKDPNFVKN
 IGQLVVLGGAFNASGNVNPAAEANIFGDPEAADLVFTSGMDTLVIGISLTTQVIFNDQDLSEIRDSGGKYGYIYDCC
 RFYHDFHLESDHFDGIFLHDPTCMAALLDPSLFTYRKGAVRVETEGLCVGYTLTDMGLKNWVGKKNHWTVPLIDV
 GMTVDADGVRSLVKKLLCSP*

Aminosäure-Sequenz von PpRH2 basierend auf dem Genmodell Pp1s140_172V6.1

MVGEETMDRSADLMAEYVEVSKNPARKRVIIDTPGIDDMMAIFMAFEAPGIEVIGLTTIFGNVDIDLATKNALHL
 CEMTGHPEIPVAEGPSEPLKRVKPRIAYFVHGS DGLGNTFQANPKGQKSSKSAADFLEKVAEFPGEVTVVALGPLT
 NIALAIQKDPNFVKNIGQLVVLGGAFNASGNVNPAAEANIFGDPEAADLVFTSGMDTLVIGISLTTQVIFNDQDLSEI
 RDSGGKYGYIYDCCRFYHDFHLESDHFDGIFLHDPTCMAALLDPSLFTYRKGAVRVETEGLCVGYTLTDMGLKYY
 DMHNLCDSDSALLSLLPT*

6.2.3 Aminosäure- und Nukleotid- Sequenzen von PpRH3

Für die Gensynthese verwendete Aminosäure-Sequenz von PpRH3 (basierend auf dem Genmodell Pp1s5_276V2.1)

MDVKAAGSVAQDQFSKHADDMMAILMAFQAPEIEVIGLTTIFGNVNTDLATINALHLCCEMAGHPEIPVAEGPSEP
 LKRVKPRIAYFEHGS DGLGETYQAKPNFQKLSKDAADFLIENVTEFPGEVTVVGLGPLTNLALAIQKDSNFAKNVGQ
 LVVLGGSFNASGNVNPAEANVSLKRQKSHSRNLFGDPEAADIVFTSGMNTLAIGIDLTTQVIFNEDDLCEIRDSGG
 DYGYIYDCCRFYHDWHLSSDHLDMGLTYLPMVTGIFLHDPTCMAALLDPTLFTFKNGAVRVETEGLPCLGHTILG
 MGLKNWVKETS WTGVPPIDVAITVDADGVRNLVKKLLCSSRLK*

Aminosäure-Sequenz von PpRH3 basierend auf der durch PCR-Experimente erhaltenen cDNA-Sequenz

MDVKAAGSVAQDQFSKHAGRRKVIIDTPGIDDMMAILMAFQAPEIEVIGLTTIFGNVNTDLATINALHLCCEMAG
 HPEIPVAEGPSEPLKRVKPRIAYFEHGS DGLGETYQAKPNFQKLSKDAADFLIENVTEFPGEVTVVGLGPLTNLALAIQ
 KDSNFAKNVGQLVVLGGSFNASGNVNPAEANLFGDPEAADIVFTSGMNTLAIGIDLTTQVIFNEDDLCEIRDSGG

DYGKYYDCCRFYHDWHLSSDHLGDGIFLHDPTCMAALLDPTLFTFKNGAVRVETEGPCLGHTILGMGLKKYVNIHTL
CLAQLPSKLYLLSSSLRCIEEHLLLYQTFISVPSAYQSIYITCSETNQWLCSSKFEIEDAHYRVLNFIAT

cDNA-Sequenz von *PpRH3* basierend auf PCR-Experimenten (mit 3'UTR, vgl. 4.3)

ATGGACGTGAAAGCTGCTGGCTCAGTGGCGCAGGACCAGTTTTCCAAGCATGCAGGTCGAAGGAAAGTTATT
ATCGACACGGATCCCGGCATTGATGATATGATGGCAATTTAATGGCTTTTCAAGCCCCTGAAATTGAAGTTAT
AGGACTCACCACCATTTTTGGCAACGTAAACACCGATTTAGCGACAATCAACGCCCTCCATCTGTGCGAGATGG
CAGGTCATCCGGAGATACCGGTTGCGGAAGGCCATCAGAACCATTAAAGCGGGTGAAGCCTCGAATTGCGT
ATTTTGAACACGGATCAGATGGACTTGGAGAACTTACCAAGCCAAACCTAACTTCCAAAAGTTATCTAAAGAT
GCAGCAGACTTTCTTATTGAGAATGTAACCTGAATCCCAGGCGAAGTAACCGTGGTTGGTCTGGGCCCCCTCAC
CAATCTTGCACTGGCTATTCAAAGGACTCAAACCTTGCCAAAAATGTTGGGCAACTGGTAGTCCTTGGGGGTT
CATTCAATGCCAGTGGAAATGTGAATCCCGCCGCAGAAGCTAATCTATTTGGCGATCCCGAAGCTGCAGACAT
CGTATTCAGTAGTGAATGAACACTCTTGCAATAGGCATAGACTTGACCACTCAGGTGATTTTTAATGAAGATG
ACTTGTGTGAAATAAGGGATTCTGGTGGAGATTACGGCAAATATATCTATGACTGTTGTGCGCTTTTATCACGAT
TGGCATTATCGTCTGATCATTTGGATGGGATTTTTCTTACGATCCTACATGCATGGCAGCACTGCTTGACCCA
ACTTTTTTACCTTTAAAAACGGAGCTGTGCGAGTTGAAACTGAGGGCCTTGCTTGGCCACACTATCCTAGG
TATGGGACTGAAAAAGTACGTAAATATTCACACCCTATGTCTCGCTCAGTTACCCAGTAAACTGTAAGTCTATC
TAGCAGCTTGAGATGCATTGAGGAGCACCTCTTGCTCTACCAAACATTTATCTCAGTTCCAAGTGCATATCAAA
GCATCTACATTACTTGTTGAGAACTAATCAGTGGCTTTGTTCTTCAAATTTGAAATTGAGGACGCTCACTACC
GGGTACTAAATTTATTGCTACATAGTTGGGTGAAGGAACTTCTGGACAGGCGTGCCCCCTATTGACGTTGC
AATTACAGTTGATGCTGATGGCGTTCGAAACCTTGTCAGAACTCCTTGCAGCTCTCGACTGAAATGA

6.2.4 Ergänzende Daten zum Markierungsexperiment mit ^3H -iPR

Tab. 6.1 Intrazelluläre Verteilung der radioaktiv-markierten Metabolite nach *in vivo* Markierung mit ^3H -iPR (30 nM) beim Wildtyp, *PpRH1-KO #29*, *PpRH2-KO #56* und *PpRH3-KO #7* nach 20 (oben) bzw. 25 (unten) Stunden. Während Riboside, Basen, Nukleotid-Monophosphate und Abbauprodukte unmittelbar nach Extraktion der Metabolite aus dem Gewebe per HPLC-Analyse erfasst wurden, konnten die Nukleotid-Di- und -Triphosphate erst nach Dephosphorylierung zusammen mit den Nukleotid-Monophosphaten in Form von Ribosiden erfasst werden. Bei Nukleotid-X handelt es sich um ein nicht näher bestimmtes Nukleotid. Prozentangaben beziehen sich auf die aus dem Gewebe extrahierbare Gesamtradioaktivität.

T_{20}	iPR pmol/100 mg [%]	iP pmol/100 mg [%]	iP-Nukleotide pmol/100 mg [%]	iPRMP pmol/100 mg [%]	iPRDP, iPRTP pmol/100 mg [%]	Nukleotid-X pmol/100 mg [%]	Abbauprodukte pmol/100 mg [%]
WT	0,2 [4]	0,4 [7]	1,2 [21]	0,5 [9]	0,4 [8]	0,2 [4]	3,8 [68]
<i>PpRH1-KO #29</i>	0,1 [1]	0,2 [3]	1,1 [14]	0,2 [3]	0,9 [11]	0 [0]	6,5 [82]
<i>PpRH2-KO #56</i>	0,1 [3]	0,2 [4]	1,2 [27]	0,3 [7]	0,8 [18]	0,1 [2]	3,0 [66]
<i>PpRH3-KO #7</i>	0,1 [2]	0,1 [2]	1,4 [33]	0,4 [10]	0,9 [21]	0,1 [2]	2,6 [63]
T_{25}	iPR pmol/100 mg [%]	iP pmol/100 mg [%]	iP-Nukleotide pmol/100 mg [%]	iPRMP pmol/100 mg [%]	iPRDP, iPRTP pmol/100 mg [%]	Nukleotid-X pmol/100 mg [%]	Abbauprodukte pmol/100 mg [%]
WT	0,3 [6]	0,3 [6]	1,3 [22]	0,5 [8]	0,6 [11]	0,2 [3]	3,8 [66]
<i>PpRH1-KO #29</i>	0,1 [1]	0,1 [2]	1,0 [14]	0,2 [3]	0,8 [11]	0 [0]	6,2 [83]
<i>PpRH2-KO #56</i>	0,1 [2]	0,2 [3]	1,6 [30]	0,5 [9]	1,1 [21]	0 [0]	3,3 [65]
<i>PpRH3-KO #7</i>	0,2 [3]	0,1 [2]	1,6 [30]	0,6 [12]	0,8 [16]	0,1 [2]	3,4 [65]

Tab. 6.2 Vergleichende Darstellung der Bilanzen der Radioaktivität während der *in vivo* Markierung mit ^3H -iPR beim Wildtyp, *PpRH1-KO #29*, *PpRH2-KO #56* und *PpRH3-KO #7* nach 20 (links) bzw. 25 Stunden (rechts). Angegeben sind die im Medium verbliebene Radioaktivität, die sich hieraus ergebende errechnete, intrazelluläre Radioaktivität sowie die aus dem Gewebe extrahierbare Radioaktivität.

	T₂₀			T₂₅		
	Im Medium verbliebene Radioaktivität pmol/Ansatz [%]	Extrahierbare, intrazelluläre Radioaktivität pmol/Ansatz [%]	Errechnete, intrazelluläre Radioaktivität pmol/Ansatz [%]	Im Medium verbliebene Radioaktivität pmol/Ansatz [%]	Extrahierbare, intrazelluläre Radioaktivität pmol/Ansatz [%]	Errechnete, intrazelluläre Radioaktivität pmol/Ansatz [%]
WT	93 [62]	10 [7]	47 [38]	88 [60]	11 [10]	47 [40]
<i>PpRH1-KO #29</i>	70 [58]	14 [12]	36 [42]	60 [41]	13 [9]	34 [59]
<i>PpRH2-KO #56</i>	103 [68]	9 [6]	39 [32]	93 [65]	10 [7]	40 [35]
<i>PpRH3-KO #7</i>	99 [67]	8 [5]	41 [33]	105 [70]	9 [6]	36 [30]

6.2.5 Ergänzende Daten zu den LC-MS/MS Messungen endogener Gehalte an Purinen und Pyrimidinen

Tab. 6.3 Konzentrationen endogener Purine und Pyrimidine beim Wildtyp (A.) und den Transformanten *PpRH1-KO #29* (B.), *PpRH2-KO #56* (C.) und *PpRH3-KO #7* (D.) nach 0 und 21 Tagen Kultivierungsdauer. Daten wurden mittels LC-MS/MS Messungen erhoben, [¹⁵N₄]Inosin wurde als interner Standard zur Quantifizierung verwendet. Angegeben sind die Mittelwerte von Messungen aus drei unabhängigen Kulturen eines Experimentes in nmol/g TG sowie die jeweilige Standardabweichung. In Einzelfällen wurden stark abweichende Werten von der Berechnung ausgeschlossen. In Kooperation mit Dr. J. Klein (Stoffwechsellabor, Charité Campus Virchow Klinikum, Berlin, D).

A. Wildtyp			B. <i>PpRH1-KO #29</i>		
	T ₀ [nmol/g]	T ₂₁ [nmol/g]		T ₀ [nmol/g]	T ₂₁ [nmol/g]
Xanthosin	22,00 ±9,57	80,83 ±26,05	Xanthosin	445,24 ±58,12	1364,37 ±535,21
Xanthin	4,18 ±0,29	18,57 ±3,39	Xanthin	1,65 ±0,82	20,68 ±0,42
Inosin	6,93 ±2,09	10,17 ±2,17	Inosin	12,96 ±3,37	139,40 ±25,44
Hypoxanthin	1,44 ±0,10	6,29 ±2,37	Hypoxanthin	0,60 ±0,12	14,50 ±0,60
Desoxyinosin	0,32 ±0,13	2,83 ±0,19	Desoxyinosin	0,35 ±0,11	15,55 ±5,01
Adenosin	55,41 ±13,09	37,75 ±22,71	Adenosin	24,07 ±8,24	58,37 ±34,63
Adenin	7,06 ±1,20	21,94 ±13,85	Adenin	4,26 ±2,06	59,32 ±16,82
Desoxyadenosin	1,67 ±0,71	3,28 ±1,29	Desoxyadenosin	0,49 ±0,33	5,59 ±1,10
Guanosin	6,93 ±1,84	18,12 ±3,11	Guanosin	3,98 ±1,12	31,35 ±26,14
Desoxyguanosin	0,73 ±0,30	3,41 ±1,87	Desoxyguanosin	0,54 ±0,29	3,68 ±2,27
Uridin	13,97 ±1,64	30,24 ±12,52	Uridin	67,46 ±11,91	283,66 ±44,02
Uracil	34,49 ±18,72	43,21 ±35,99	Uracil	11,00 ±1,91	101,48 ±83,43
Desoxyuridin	0,05 ±0,02	0,73 ±0,27	Desoxyuridin	0,04 ±0,01	1,38 ±0,77
Thymidin	0,74 ±0,21	3,94 ±2,14	Thymidin	0,35 ±0,16	5,33 ±0,90
Thymin	2,30 ±1,78	1,70 ±1,15	Thymin	0,98 ±0,81	4,39 ±0,54

Fortsetzung Tab. 6.4 Konzentrationen endogener Purine und Pyrimidine beim Wildtyp (A.) und den Transformanten *PpRH1-KO #29* (B.), *PpRH2-KO #56* (C.) und *PpRH3-KO #7* (D.) nach 0 und 21 Tagen Kultivierungsdauer. Daten wurden mittels LC-MS/MS Messungen erhoben, [¹⁵N₄]Inosin wurde als interner Standard zur Quantifizierung verwendet. Angegeben sind die Mittelwerte von Messungen aus drei unabhängigen Kulturen eines Experimentes in nmol/g TG sowie die jeweilige Standardabweichung. In Einzelfällen wurden stark abweichende Werten von der Berechnung ausgeschlossen. In Kooperation mit Dr. J. Klein (Stoffwechsellabor, Charité Campus Virchow Klinikum, Berlin, D).

C. <i>PpRH2-KO #56</i>		
	T₀	T₂₁
	[nmol/g]	[nmol/g]
Xanthosin	89,19 ±40,78	72,28 ±23,72
Xanthin	12,62 ±4,06	14,85 ±3,43
Inosin	14,46 ±4,57	7,63 ±4,53
Hypoxanthin	4,07 ±2,14	4,70 ±2,07
Desoxyinosin	1,09 ±0,22	4,34 ±0,72
Adenosin	71,47 ±5,01	54,31 ±4,93
Adenin	15,05 ±6,21	47,20 ±18,70
Desoxyadenosin	4,01 ±0,96	5,04 ±1,85
Guanosin	18,87 ±5,15	7,34 ±6,01
Desoxyguanosin	4,14 ±1,56	2,31 ±1,79
Uridin	38,14 ±5,21	90,98 ±16,54
Uracil	161,57 ±86,40	45,39 ±16,62
Desoxyuridin	0,28 ±0,27	0,52 ±0,12
Thymidin	1,58 ±0,98	3,69 ±0,98
Thymin	9,86 ±2,37	2,44 ±0,38

D. <i>PpRH3-KO #7</i>		
	T₀	T₂₁
	[nmol/g]	[nmol/g]
Xanthosin	42,69 ±38,11	85,05 ±83,14
Xanthin	5,64 ±2,67	7,54 ±6,77
Inosin	5,16 ±2,69	5,84 ±4,40
Hypoxanthin	1,72 ±0,43	2,77 ±2,34
Desoxyinosin	1,86 ±1,32	7,79 ±2,01
Adenosin	92,65 ±44,09	44,55 ±1,39
Adenin	13,09 ±1,69	26,76 ±16,20
Desoxyadenosin	5,00 ±5,26	1,86 ±0,80
Guanosin	9,43 ±3,94	3,92 ±3,41
Desoxyguanosin	2,17 ±1,82	6,46 ±5,64
Uridin	12,44 ±1,83	27,89 ±7,89
Uracil	21,03 ±12,80	38,75 ±30,74
Desoxyuridin	0,20 ±0,24	0,55 ±0,28
Thymidin	0,98 ±0,55	3,17 ±1,57
Thymin	2,36 ±1,67	3,54 ±2,03

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei PD Dr. Klaus von Schwartzberg bedanken für seine hervorragende Betreuung meiner Arbeit, für zahlreiche spannende Diskussionen, für Ratschläge, Tipps und kreative Ideen und für viele Bastel-Stunden an der HPLC. Darüberhinaus danke ich ihm für das mir entgegengebrachte Vertrauen, seine Zuversicht und für seinen Optimismus, die es mir in manchen schwierigen Phasen leichter gemacht haben.

Bei Herrn Prof. Dr. Reinhard Lieberei möchte ich mich für die Übernahme des Zweitgutachtens und für die Schaffung einer angenehmen Arbeitsatmosphäre bedanken.

Aus dem Biozentrum Klein Flottbek danke ich besonders folgenden Mitarbeitern und Arbeitsgruppen: der Arbeitsgruppe Pflanzenschutz, insbesondere Dr. Conny Heinze und Dr. Peter Willigmann für ihre große Hilfsbereitschaft und zahlreichen Tipps und der Arbeitsgruppe von PD Dr. René Lorbiercke und Dr. Reinhold Brettschneider für die Möglichkeit, die Lokalisierungsstudien in ihrem Labor durchzuführen.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe der Nutzpflanzenbiologie möchte ich mich für die angenehme und produktive Arbeitsatmosphäre bedanken. Vor allem Susanne Bringe und Vera Schwekendiek danke ich für die Aufrechterhaltung des Laborbetriebes und für ihre enorme Hilfsbereitschaft. Bei Detlef Böhm, Dr. Helmut Kassner und Thomas Thumforde bedanke ich mich für die Beantwortung all meiner technischen Fragen. Danke, dass ihr immer ein offenes Ohr hattet.

Ann-Cathrin Lindner danke ich für viele gemeinsame Stunden im Labor, für ihr Interesse an meiner Arbeit und zahlreichen endlosen Diskussionen über Methoden, Ergebnisse und was uns sonst noch so beschäftigt hat. Außerdem danke ich ihr für ihr enormes Wissen rund ums Formatieren.

Dr. Hanna Richter danke ich für eine lange und schöne gemeinsame Zeit im Labor und für noch mehr viele gute Stunden außerhalb.

Auch allen anderen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe, insbesondere Peggy Vlietland-Nowotny und Florian Gehlhaar, danke ich für ihre Unterstützung und für viele schöne Stunden im Institut.

Die LC-MS/MS Messungen wurden in Kooperation mit Dr. Jeannette Klein (Charité Berlin) durchgeführt. Vielen Dank für die Bereitschaft und das Interesse, Purine und Pyrimidine in Pflanzen zu analysieren.

Dr. Martina Tylichová und Dr. David Kopečný haben mit ihrem Wissen und Können dazu beigetragen, die biochemische Charakterisierung und Phylogenie der Ribohydrolasen voranzubringen. Danke dafür und für die Beantwortung zahlreicher Fragen rund um Proteine.

Mit Prof. Dr. Barbara Moffatt und Katja Engel habe ich eine schöne Zeit innerhalb und außerhalb unserer Labore verbracht. Euch danke ich für die herzliche Aufnahme in Kanada, die spannende Kooperation und alles andere was dabei entstanden ist.

Der Appuhnstiftung, dem DAAD und der DFG danke ich für die finanzielle Förderung meiner Arbeit.

Meiner Familie und meinen Freunden bin ich für all ihre Unterstützung und Zuversicht, ihre Geduld und ihre Ablenkungsmanöver in guten und schlechten Zeiten von ganzem Herzen dankbar.