

**Charakterisierung der Guanosindeaminase von  
*Arabidopsis thaliana* und Evaluation ihrer  
Bedeutung für den Purinnukleotidabbau**

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

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

vorgelegt von:

**Kathleen Dahncke**

(geboren in Perleberg)

Berlin im Januar 2014

---

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Juni 2009 bis August 2013 an der Freien Universität Berlin, Abteilung Biochemie der Pflanzen unter Anleitung von PD Dr. Claus-Peter Witte durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. Claus-Peter Witte  
2. Gutachterin: Prof. Dr. Tina Romeis  
Disputation am: 14. Mai 2014

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>iv</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>viii</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>x</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>2</b>
<b>Summary</b>	<b>4</b>
<b>Einleitung</b>	<b>6</b>
1.1 Purinnukleotidstoffwechsel . . . . .	6
1.1.1 <i>De novo</i> Synthese der Purinnukleotide . . . . .	7
1.1.2 Purinnukleotidabbau und -recycling . . . . .	8
1.1.3 Guanindeaminasen . . . . .	10
1.1.4 Recycling der Purinnukleotide . . . . .	12
1.2 Spezielle Funktionen des Purinnukleotidabbaus . . . . .	13
1.2.1 Ureid-exportierende Pflanzen . . . . .	13
1.2.2 Purinalkaloid-produzierende Pflanzen . . . . .	14
1.3 Phänotypische Analysen von Nukleotidabbaumutanten . . . . .	15
1.3.1 Xanthindehydrogenase-Mutanten . . . . .	15
1.3.2 Nukleosidhydrolase-Mutanten . . . . .	16
1.3.3 Dihydropyrimidindehydrogenase-Mutanten . . . . .	17
1.4 Dunkelheit zur Seneszenzinduktion . . . . .	17
1.5 Ziel der Arbeit . . . . .	19
<b>Material und Methoden</b>	<b>21</b>
2.1 Material . . . . .	21
2.1.1 Antibiotika . . . . .	21
2.1.2 Bakterienstämme . . . . .	21

# INHALTSVERZEICHNIS

---

2.1.3	Vektoren . . . . .	22
2.1.4	Medien . . . . .	24
2.1.5	Primer . . . . .	25
2.1.6	Pflanzenlinien . . . . .	28
2.1.7	Puffer und Lösungen . . . . .	29
2.1.8	Software und Datenbanken . . . . .	33
2.2	Methoden . . . . .	35
2.2.1	Molekularbiologische Methoden . . . . .	35
2.2.2	Mikrobiologische Methoden . . . . .	38
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden . . . . .	40
2.2.4	Anzucht und Analyse von Pflanzen . . . . .	44
2.2.5	Metabolitanalysen . . . . .	47
<b>Ergebnisse</b>		<b>52</b>
3.1	Suche nach einer Guanindeaminase in <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	52
3.2	Biochemische Charakterisierung der vermeintlichen Guanindeaminase aus <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	53
3.2.1	Affinitätschromatographische Aufreinigung des Kandidatenproteins . . . . .	53
3.2.2	Untersuchung des Kandidatenproteins hinsichtlich Guanindeaminase-Aktivität . . . . .	55
3.2.3	Enzymkinetische Analyse der Guanosindeaminase . . . . .	56
3.2.4	Die GSDA ist hochkonserviert in Pflanzen . . . . .	59
3.2.5	Vergleich mit bakterieller Guanindeaminase . . . . .	60
3.3	Untersuchungen zur <i>in vivo</i> Funktion der Guanosindeaminase . . . . .	65
3.3.1	Charakterisierung der Verlustmutanten . . . . .	66
3.3.2	Herstellung und Charakterisierung von Komplementationslinien . . . . .	71
3.3.3	Subzelluläre Lokalisation und Analyse des Expressionsprofils der GSDA . . . . .	73
3.3.4	Metabolitanalysen in unterschiedlichen Geweben . . . . .	76
3.4	Phänotypische Analyse der GSDA-Verlustmutanten . . . . .	81
3.4.1	Auswirkungen des Guanosindeaminaseverlusts auf die Keimung . . . . .	81
3.4.2	Auswirkungen des Guanosindeaminaseverlusts auf das Sprosswachstum . . . . .	82
3.4.3	Auswirkungen des Guanosindeaminaseverlusts auf die Blattseneszenz . . . . .	83
3.4.4	Dunkelstress . . . . .	85
3.5	Die Rolle der Guanosindeaminase im Purinnukleotidabbau . . . . .	95
3.5.1	Analyse der <i>gsda-nsh1</i> -Doppelmutanten . . . . .	95
3.5.2	Analyse der <i>gsda-hgprrt</i> -Doppelmutante . . . . .	98
<b>Diskussion</b>		<b>100</b>
4.1	In Pflanzen ist eine Guanosindeaminase am Purinnukleotidabbau beteiligt. . . . .	100

## INHALTSVERZEICHNIS

---

4.1.1	Identifizierung der Guanosindeaminase in <i>Arabidopsis thaliana</i> . . . . .	100
4.1.2	Guanosindeaminasen in anderen Pflanzen . . . . .	102
4.1.3	Unterscheidung zwischen GDAs und GSDAs . . . . .	102
4.2	Phänotypen der <i>gsda</i> -Mutanten . . . . .	105
4.2.1	Auswirkungen anhaltender Dunkelheit auf den Purinnukleotidabbau . . . . .	105
4.2.2	Zusammenhang zwischen Purinnukleotidabbau und Kohlenhydratstoffwechsel	106
4.2.3	Zusammenhang zwischen dem möglichen Kohlenstoffmangel und der Verzö- gerung von Keimung, Sprosswachstum und Seneszenz . . . . .	110
4.3	Analyse des Purinnukleotidabbaus . . . . .	111
4.3.1	<i>In vivo</i> Funktion der GSDA . . . . .	111
4.3.2	Abbau und Recycling der Purinnukleotide . . . . .	112
4.3.3	Die Akkumulation von Guanin weist auf eine Guanosinhydrolase hin . . . . .	113
4.3.4	Rolle der HGPRT im Purinnukleotidmetabolismus . . . . .	114
4.3.5	Metabolismus der Purindeoxynukleoside . . . . .	114
4.3.6	Metabolismus von Xanthosin und Uridin . . . . .	115
4.3.7	Der Abbau von XMP folgt einem linearen Weg . . . . .	115
4.3.8	Mögliche Rolle der GSDA in anderen Pflanzen . . . . .	116
4.4	Schlussbemerkungen . . . . .	118
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>118</b>
	<b>Lebenslauf</b>	<b>vii</b>
	<b>Publikationen und Kongresse</b>	<b>viii</b>
	<b>Danksagung</b>	<b>ix</b>
	<b>Anhang</b>	<b>x</b>
	<b>A Abbildungen</b>	<b>x</b>
	<b>B Tabellen</b>	<b>xxi</b>

# Abbildungsverzeichnis

1.1	Aufbau der Purinnukleotide. . . . .	7
1.2	Schematische Darstellung des Purinnukleotidabbaus in Arabidopsis. . . . .	8
1.3	Ureidabbau im Endoplasmatischen Retikulum. . . . .	9
1.4	Deaminierung von Guanin . . . . .	11
1.5	Modell der Guaninbindung in der GDA von <i>Bacillus subtilis</i> . . . . .	12
1.6	Schematische Darstellung des Purinnukleotidrecyclings. . . . .	13
1.7	Biosynthese von Koffein ausgehend von Xanthosin. . . . .	15
1.8	Vergleich der Prozesse bei induzierter und entwicklungsbedingter Seneszenz. . . . .	18
3.1	Proteinsequenzvergleich zwischen der Guanindeaminase von <i>B. subtilis</i> und der putativen Guanindeaminase von <i>A. thaliana</i> . . . . .	53
3.2	Dokumentation der Aufreinigung des Strep-markierten Kandidatenproteins nach transientscher Expression in <i>N. benthamiana</i> . . . . .	54
3.3	Bestimmung der Enzymaktivität des aufgereinigten Kandidatenproteins. . . . .	55
3.4	Identifizierung des Substrats der Deaminase. . . . .	56
3.5	Bestimmung der enzymkinetischen Konstanten der GSDA mit Guanosin als Substrat. . . . .	57
3.6	Bestimmung der enzymkinetischen Konstanten der GSDA mit 2'-Deoxyguanosin als Substrat. . . . .	58
3.7	Weblogo-Darstellung des Sequenzvergleichs putativer pflanzlicher Guanosindeaminasen. . . . .	60
3.8	Dokumentation der Aufreinigung der Strep-markierten bakteriellen Guanindeaminase nach transientscher Expression in <i>N. benthamiana</i> . . . . .	61
3.9	Weblogo-Darstellung des Sequenzvergleichs bakterieller Guanin- mit pflanzlichen Guanosindeaminasen. . . . .	62
3.10	Bestimmung der enzymatischen Aktivität von GSDA und GDA Varianten mit Mutationen im aktiven Zentrum. . . . .	63
3.11	Bestimmung der enzymatischen Aktivität von GSDA und GDA Varianten mit Mutationen am C-Terminus. . . . .	64
3.12	Bestimmung der enzymatischen Aktivität von GSDA und GDA Varianten mit Mutationen im aktiven Zentrum und am C-Terminus. . . . .	65

3.13 Schematische Darstellung der Genstruktur und Genotypisierung von T-DNA Insertionslinien. . . . .	67
3.14 Verifizierung homozygoter Verlustmutanten in Bezug auf Transkription und Translation	68
3.15 Metabolitanalyse der Insertionslinien . . . . .	69
3.16 Identifizierung des Guanosinsignals. . . . .	70
3.17 Verifizierung des Guanosinsignals mithilfe von Massenspektrometrie . . . . .	71
3.18 Nachweis der Proteinexpression in den Komplementationslinien. . . . .	72
3.19 Metabolitanalyse in den Komplementationslinien . . . . .	72
3.20 Subzelluläre Lokalisation der Guanosindeaminase . . . . .	74
3.21 Histochemische Analyse der Promotoraktivität. . . . .	75
3.22 Analyse des GSDA-Proteingehalts in verschiedenen Geweben. . . . .	75
3.23 Identifizierung eines zweiten akkumulierenden Metaboliten in den <i>gsda</i> -Mutanten. . . . .	77
3.24 Quantifizierung des Aminosäuregehalts sowie des Aminosäurestickstoffgehalts in Samen. . . . .	78
3.25 Analyse der Guanosinakkumulation in vier Wochen alten Pflanzen . . . . .	79
3.26 Analyse der Guanosinakkumulation in sieben Wochen alten Pflanzen . . . . .	80
3.27 Beobachtung der Samenkeimung unter Langtag-Bedingungen. . . . .	81
3.28 Beobachtung eines verzögerten Sprosswachstums der <i>gsda</i> -Mutanten. . . . .	82
3.29 Quantifizierung der Sprosslänge an Tag 31 des Lebenszyklus. . . . .	83
3.30 Beobachtung einer verzögerten Blattseneszenz der <i>gsda</i> -Mutanten. . . . .	84
3.31 Quantifizierung des Anteils chlorotischen Blattoberfläche. . . . .	84
3.32 Phänotypische Analyse der Mutanten bei Dunkelstress . . . . .	85
3.33 Vergleich der <i>gsda</i> -Mutanten und Komplementationslinien bei Dunkelstress. . . . .	86
3.34 Schematische Darstellung des Dunkelstress-Zeitkurses. . . . .	87
3.35 Phänotypische Analyse im Verlauf der sechstägigen Dunkelstress-Behandlung. . . . .	88
3.36 Analyse von Chlorophyll und Carotinoiden während der sechstägigen Dunkelstress-Behandlung. . . . .	89
3.37 Analyse des Anthocyangehalts während der sechstägigen Dunkelstress-Behandlung.	89
3.38 Analyse des Proteingehalts während der sechstägigen Dunkelstress-Behandlung. . . . .	90
3.39 Analyse der GSDA-Proteinmenge im Wildtyp während der sechstägigen Dunkelstress-Behandlung. . . . .	91
3.40 Proteinmenge der großen Untereinheit der RuBisCO während sechstägigen Dunkelstress-Behandlung. . . . .	91
3.41 Analyse des Guanin- und Guanosingehalts während der sechstägigen Dunkelstress-Behandlung . . . . .	92
3.42 Analyse des Aminosäureprofils während der sechstägigen Dunkelstress-Behandlung.	93
3.43 Analyse des Asparagingehalts im Vergleich zu den übrigen Aminosäuren während der sechstägigen Dunkelstress-Behandlung. . . . .	94

3.44	Phänotypische Analyse der Mutanten während der Erholungsphase. . . . .	95
3.45	Metabolitanalyse in der Doppelmutante <i>gsda-2 nsh1-1</i> . . . . .	96
3.46	Metabolitanalyse in der Doppelmutante <i>gsda-2 nsh1-2</i> . . . . .	98
3.47	Metabolitanalyse in der Doppelmutante <i>hgprt-1 gsda-2</i> . . . . .	99
4.1	Deaminierung von Guanosin. . . . .	101
4.2	Phylogenetische Analyse der GDAs und GSDAs. . . . .	104
4.3	Regulation der <i>GSDA</i> -Expression in Abhängigkeit vom Kohlenstoffstatus der Pflanze. . . . .	108
4.4	Modell der Regulation bei anhaltender Dunkelheit. . . . .	109
4.5	Möglicher Zusammenhang zwischen Kohlenstoffmangel in den <i>gsda</i> -Mutanten und den Wachstums- und Entwicklungsphänotypen. . . . .	111
4.6	Radiochemische Analyse des Purinnukleotidstoffwechsels in Kartoffelknollen. . . . .	112
4.7	Modell des Purinnukleotidabbaus in <i>A. thaliana</i> basierend auf den Ergebnissen dieser Doktorarbeit und Zrenner <i>et al.</i> , 2006. . . . .	116
4.8	Radiochemische Analyse des Guanosinstoffwechsels in Blättern und Wurzeln von Teekeimlingen. . . . .	117
A.1	Aminosäuresequenzen der bakteriellen Guanindeaminasen. . . . .	x
A.2	Proteinsequenzvergleich zwischen der Guanindeaminase von <i>B. subtilis</i> und möglichen Orthologen aus <i>A. thaliana</i> . . . . .	xi
A.3	Strukturformeln der zur Aktivitätsbestimmung eingesetzten potentiellen Substrate. . . . .	xii
A.4	Bildunterschrift auf der folgenden Seite. . . . .	xiii
A.4	Proteinsequenzvergleich pflanzlicher Guanosindeaminasen. . . . .	xiv
A.5	Proteinsequenzvergleich zwischen GDAs und GSDAs. . . . .	xiv
A.5	Bildunterschrift auf der vorhergehenden Seite. . . . .	xv
A.6	Affinitätschromatographische Aufreinigung veränderter Varianten der <i>GSDA</i> aus <i>A. thaliana</i> sowie der <i>GDA</i> aus <i>B. subtilis</i> nach transienter Expression in <i>N. benthamiana</i> . . . . .	xvi
A.7	Bildunterschrift auf der folgenden Seite. . . . .	xvii
A.7	Verifizierung von UV-Signalen aus den chromatographischen Läufen mithilfe von Massenspektrometrie. . . . .	xviii
A.8	Metabolitanalyse nach Extraktion mit 80% Methanol. . . . .	xviii
A.9	Analyse der Detektionsgrenze von Guanosin. . . . .	xix
A.10	Aminosäureprofil in Samen. . . . .	xx



# Tabellenverzeichnis

2.1	Verwendete Antibiotika . . . . .	21
2.2	Verwendete Bakterienstämme . . . . .	21
2.3	Verwendete Ausgangsvektoren . . . . .	22
2.4	Vektoren zur Analyse der GSDA. . . . .	23
2.5	Vektoren zur Expression von Varianten der GDA. . . . .	24
2.6	Verwendete Medien . . . . .	24
2.7	Primer für Genotypisierung und semiquantitative RT-PCR. . . . .	25
2.8	Primer für quantitative PCR. . . . .	26
2.9	Verschiedene Klonierungsprimer. . . . .	26
2.10	Primer zur Klonierung der GDA von <i>B. subtilis</i> und zum Austausch der C-Termini von GSDA und GDA. . . . .	27
2.11	Primer für die zielgerichtete Mutagenese der GSDA von <i>A. thaliana</i> . . . . .	27
2.12	Primer für die zielgerichtete Mutagenese der GDA von <i>B. subtilis</i> . . . . .	27
2.13	Extern bezogene Pflanzenlinien. . . . .	28
2.14	In dieser Arbeit hergestellte transgene Linien. . . . .	28
2.15	Verwendete Kreuzungen. . . . .	28
2.16	Transformationspuffer I und II. . . . .	29
2.17	Puffer für die transiente Proteinexpression in <i>Nicotiana benthamiana</i> . . . . .	29
2.18	Puffer für die Herstellung von Proteinrohextrakten aus Pflanzenmaterial. . . . .	29
2.19	Puffer für die Extraktion und Aufreinigung Strep-markierter Proteine aus <i>Nicotiana benthamiana</i> . . . . .	29
2.20	Puffer für die Extraktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine aus <i>inclusion bodies</i> von <i>Escherichia coli</i> . . . . .	30
2.21	Zusammensetzung eines Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgels. . . . .	30
2.22	SDS-Probenpuffer. . . . .	30
2.23	Laufpuffer für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese. . . . .	30
2.24	Zusammensetzung eines porösen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgels. . . . .	30
2.25	Laufpuffer für poröse Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgele. . . . .	31
2.26	Puffer für die Proteinelution aus porösen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelen. . . . .	31

## TABELLENVERZEICHNIS

---

2.27	Puffer für Western Blot und Immunodetektion. . . . .	31
2.28	Lösungen für die Färbung von Proteingelen mit Coomassie. . . . .	31
2.29	Lösungen für die Färbung von Proteingelen mit Colloidal Coomassie. . . . .	32
2.30	Lösungen für die Färbung von Proteingelen mit Silbernitrat. . . . .	32
2.31	Lösungen für den kolorimetrischen Nachweis der Enzymaktivität. . . . .	32
2.32	Lösungen für die Isolierung von Mesophyllzellprotoplasten. . . . .	32
2.33	Lösung für die Färbung der Glucuronidase-Aktivität. . . . .	33
2.34	Lösungen für die Purinanalytik . . . . .	33
2.35	Lösungen für die Aminosäureanalytik . . . . .	33
2.36	PCR-Programm mit Power SYBR Green. . . . .	36
2.37	Allgemeines PCR-Programm . . . . .	37
2.38	Mutagenese PCR-Programm. . . . .	38
2.39	Beispiel für Zeitplan-basierte Fraktionssammlung. . . . .	49
2.40	Derivatisierungsprotokoll für die Aminosäureanalyse. . . . .	50
3.1	Enzymkinetische Parameter. . . . .	57
B.1	Aminosäuregehalt in Wildtypblättern während des Dunkelzeitkurses. . . . .	xxii
B.2	Aminosäuregehalt in <i>gsda</i> -Blättern während des Dunkelzeitkurses. . . . .	xxiii

# Abkürzungen

35S	Blumenkohl-Mosaik-Virus-Promotor 35S
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
AMP	Adenosinmonophosphat
APS	Ammoniumperoxidisulfat
<i>A. thaliana</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
BCIP	5-Brom-4-chlor-3-indolylphosphat Dinatriumsalz
bp	Basenpaar
<i>B. subtilis</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
CFP	<i>cyan fluoreszierendes Protein</i>
CMP	Cytidinmonophosphat
Col-0	<i>Arabidopsis thaliana</i> Ökotyp Columbia-0
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ESI	Elektrospray-Ionisation
<i>et al.</i>	<i>et alii / et aliae</i> - und andere
GDA	Guanindeaminase
GMP	Guanosinmonophosphat
GSDA	Guanosindeaminase
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)piperazin-1-Ethansulfonsäure
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i> Hochleistungsflüssigkeitschromatographie
IMP	Inosinmonophosphat
IPTG	Isopropyl-4- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
LB	<i>lysogeny broth</i>
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure

## ABKÜRZUNGEN

---

MS	Massenspektrometrie und Murashige Skoog (im Fall von: 1/2 MS)
MW	Molekulargewicht
NBT	Nitrotetrazoliumblauschlorid
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid - Gelelektrophorese
PCR	polymerase chain reaction - Polymerasekettenreaktion
Pi	Phosphat
PPi	Diphosphat oder Pyrophosphat
PRPP	Phosphoribosylpyrophosphat
qPCR	quantitative PCR nach reverser Transkription
RNA	<i>ribonucleic acid</i> - Ribonukleinsäure
RT-PCR	reverse Transkription mit anschließender PCR
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SAM	S-Adenosylmethionin
SAH	S-Adenosylhomocystein
SnRK	<i>SNF1-related kinase</i> - SNF1-verwandte Kinase
SDS	<i>sodiumdodecylsulfate</i> - Natriumdodecylsulfat
TBA-OH	Tetrabutylammoniumhydroxid
TBS	<i>Tris buffered saline</i> - Tris-gepufferte Salzlösung
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-20
TEMED	N,N,N',N'-Tetraethylaminomethan
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TOF	<i>time-of-flight detector</i> - Flugzeitdetektor
UMP	Uridinmonophosphat
v/v	Volumen pro Volumen
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen
YEB	<i>yeast extract broth</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> - gelb fluoreszierendes Protein
XMP	Xanthosinmonophosphat

# Zusammenfassung

Für die vollständige Freisetzung des gebundenen Stickstoffs aus den Purinnukleotiden sind verschiedene Reaktionen notwendig. Dazu gehören die Dephosphorylierung der Nukleotide, die Hydrolyse der dabei entstehenden Nukleoside sowie die Deaminierung und Oxidation der Nukleobasen (Zrenner *et al.*, 2006). Die erste gemeinsame Zwischenstufe im Abbau aller Purinnukleotide ist die Nukleobase Xanthin. Dieser Metabolit kann in Pflanzen durch schrittweise Oxidation und Hydrolyse des Purinrings vollständig zu Glyoxylat, Kohlendioxid und Ammoniak abgebaut werden (Werner *et al.*, 2010; Werner und Witte, 2011). Durch Reassimilation des Ammoniak in Aminosäuren wird der zuvor in den Nukleotiden gebundene Stickstoff wieder nutzbar. Während der Abbau des Purinringsystems in *Arabidopsis thaliana*, ausgehend von Xanthin, vollständig aufgeklärt ist, ist über den Katabolismus der Nukleotide zu Xanthin und die daran beteiligten Enzyme ist bislang nicht sehr viel bekannt.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Charakterisierung einer, am Abbau von Guanosinmonophosphat beteiligten, Deaminase. Zu Grunde lag dabei die Hypothese, die Deaminierung des Guanylrestes werde in *A. thaliana*, wie bei vielen anderen Organismen, durch eine Guanindeaminase katalysiert. Durch Sequenzvergleiche, basierend auf den Proteinsequenzen bekannter Guanindeaminasen, konnte ein entsprechendes Kandidatenprotein identifiziert werden.

Erste biochemische Analysen des Proteins zeigten jedoch nicht das vermutete Ergebnis. Es wurde keine Guanindeaminaseaktivität beobachtet. Bei einem Test verschiedener Verbindungen konnte das Nukleosid Guanosin als das Substrat der Deaminase identifiziert werden. Eine solche Enzymaktivität wurde zwar bereits vereinzelt beschrieben, jedoch wurde bislang kein Gen identifiziert, das die genetische Information eines entsprechenden Proteins kodiert. Dies gelang nun erstmals im Rahmen dieser Arbeit. Im weiteren Verlauf wurde die Guanosindeaminase (GSDA) unter anderem hinsichtlich ihrer enzymkinetischen Eigenschaften, der subzellulären Lokalisation sowie des Expressionsprofils in der Pflanze untersucht.

Metabolitanalysen von *gsda*-Mutanten zeigten, dass das Enzym auch *in vivo* für die Deaminierung von Guanosin verantwortlich ist. Dabei wurde ebenfalls deutlich, dass 2'-Deoxyguanosin, welches *in vitro* als Substrat akzeptiert wurde, in der Pflanze nicht durch die GSDA deaminiert wird.

Der Phänotyp der *gsda*-Mutanten bei anhaltender Dunkelheit lässt Rückschlüsse auf einen Zusammenhang zwischen dem Purinnukleotidabbau und dem Kohlenhydrathaushalt von *A. thaliana* zu. Ausgehend von öffentlich verfügbaren Genexpressionsdaten, werden ein möglicher Kohlenhydrat-

mangel in den *gsda*-Mutanten und dessen Auswirkungen auf das Wachstum und die Entwicklung der Pflanze diskutiert.

Die Rolle der GSDA im Purinnukleotidabbau wurde mithilfe von Metabolitanalysen genauer untersucht. Dabei wurden neben *gsda*-Mutanten auch Doppelmutanten analysiert, denen zusätzlich zur GSDA ein weiteres Enzym dieses Stoffwechselweges fehlte. Diese Experimente zeigten, dass der Abbau von XMP linear über GMP und Guanosin zu Xanthosin verläuft. Basierend auf diesen Ergebnissen wird die Bedeutung der GSDA für den Stickstoffexport aus den Knöllchen bestimmter Leguminosen sowie für die Purinalkaloidsynthese in Kaffee, Tee und Kakao diskutiert.

# Summary

Several reactions are required to release the nitrogen that is bound in purine nucleotides completely. This involves nucleotide dephosphorylation, hydrolysis of the corresponding nucleosides as well as deamination and oxidation of the purine bases (Zrenner *et al.*, 2006). The first common intermediate in the degradation pathway of all purine nucleotides is the base xanthine. Plants can fully degrade this metabolite to glyoxylate, carbon dioxide and ammonia by successively oxidizing and hydrolyzing the purine ring (Werner *et al.*, 2010; Werner und Witte, 2011). Reassimilation of ammonia into amino acids makes the nitrogen that was bound in nucleotides available for the metabolism. Whereas the degradation of xanthine has been described completely, little is known about the catabolism leading from the nucleotides to xanthine and the enzymes that are involved.

This thesis addresses the characterisation of a deaminase involved in the catabolism of guanosine monophosphate. It is based on the hypothesis that, as in many organisms, the deamination of the guanyl group is catalyzed by a guanine deaminase in *Arabidopsis thaliana*. Sequence alignments using known guanine deaminases as query were employed to identify a suitable candidate protein.

First biochemical analyses did not show the suspected results. Guanine deaminase activity could not be detected. By testing different compounds the nucleoside guanosine was identified as substrate for deamination. An enzymatic activity like this has been observed occasionally, but no gene coding for the respective protein was identified so far. In this thesis such a gene is described for the first time. Within the progress of this work the guanosine deaminase (GSDA) was characterized regarding its kinetic properties, subcellular localization and expression profile in different plant tissues.

Metabolite analyses of *gsda*-mutants could prove the enzyme's *in vivo*-function in guanosine deamination. They also showed that deamination of 2'-deoxyguanosine is not catalyzed by the GSDA in the plant although this reaction has been observed *in vitro*.

The phenotype that the *gsda*-mutants show when grown in prolonged darkness hints towards a connection between purine nucleotide catabolism and the plant's carbohydrate metabolism. Based on publicly available gene expression data a probable lack of carbon in the *gsda*-mutants and its consequences concerning growth and development are discussed.

The GSDAs role in purine nucleotide catabolism was investigated in detail using metabolite analyses. Besides single mutants different double mutants were examined that lacked the GSDA as well as a second enzyme of this pathway. Those experiments could show that there is a linear degradation

## SUMMARY

---

of XMP leading to xanthosine via GMP and guanosine. Based on those results the significance of the GSDA for nitrogen export from the nodules of certain legumes as well as for purine alkaloid synthesis in coffee, tea and cocoa is discussed.



# Einleitung

Seit dem Jahr 2000 steht die vollständige genetische Information der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* für die Forschung zur Verfügung (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Die Funktion vieler Gene ist aber immer noch unbekannt. Es besteht jedoch die Möglichkeit die Funktion der kodierten Proteine vorherzusagen. Dazu können Sequenzvergleiche mit Proteinen bekannter Funktion, phylogenetische Analysen und auch Genexpressionsstudien genutzt werden. Darüber hinaus können die Identifizierung bestimmter Proteindomänen sowie Phänotypenanalysen bei der Vorhersage einer Genfunktion helfen.

Die Verfügbarkeit von T-DNA-Insertionslinien für *Arabidopsis thaliana* ermöglicht es außerdem die Auswirkungen des Gensverlusts zu studieren. Die Methoden der Transkriptom-, Proteom- und Metabolomanalytik erlauben eine Analyse möglicher Phänotypen auch auf molekularer Ebene. In gleicher Weise lassen sich Mutanten analysieren, die das gewünschte Gen überexprimieren. Mithilfe solcher Experimente lassen sich Rückschlüsse auf die physiologische Funktion eines Gens in der Pflanze ziehen. In dieser Doktorarbeit stand die Identifizierung eines am Purinnukleotidabbau beteiligten Proteins im Vordergrund.

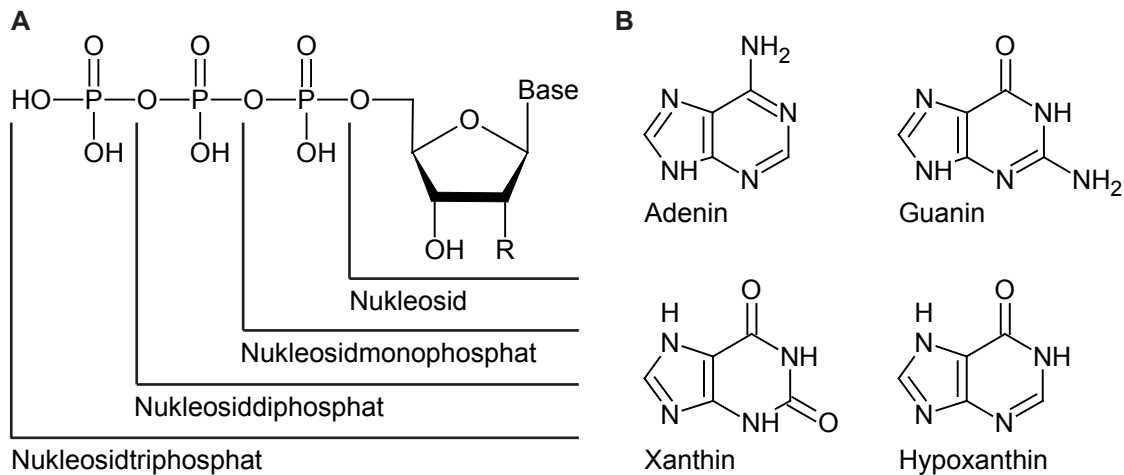
## 1.1 Purinnukleotidstoffwechsel

Die Voraussetzung für das Wachstum einer Pflanze ist die Verfügbarkeit von Licht, Kohlendioxid, Wasser und Mineralien. Dabei stellt vor allem der Stickstoffgehalt des Bodens einen limitierenden Faktor für die Ernährung und das Wachstum der Pflanzen dar (Date, 1973; Hardy und Havelka, 1975). Stickstoff ist Bestandteil von Aminosäuren, aus denen wiederum Proteine synthetisiert werden. Außerdem ist er großer Menge in Chlorophyll und den Nucleinsäuren enthalten.

Deoxyribonucleinsäure (DNA) und Ribonucleinsäure (RNA) sind aus verschiedenen Purin- und Pyrimidinnucleotiden aufgebaut. Dabei handelt es sich um Verbindungen, die eine Nucleobase, den Zucker (Deoxy-)Ribose sowie einen bis drei Phosphatreste enthalten. Abhängig von deren Anzahl spricht man von einem Nucleosidmonophosphat (NMP), -diphosphat (NDP) oder -triphosphat (NTP). Die Unterscheidung in Purin- und Pyrimidinnucleotide basiert auf der Art der jeweiligen Nucleobase. Beide Stoffgruppen gehören zu den Heterocyclen. Die Pyrimidinbasen Uracil, Thymin und Cytosin sind sechsgliedrige heterocyclische Verbindungen mit zwei Stickstoffatomen im Ringsystem. Gua-

nin, Adenin, Xanthin und Hypoxanthin bilden die Gruppe der Purinbasen. Der Grundkörper dieser Verbindungen ist das heterobicyclische Purinringsystem. Dieses besteht aus einem Pyrimidin- sowie einem Imidazolring und enthält vier Stickstoffatome. Die Struktur der Purinnukleotide ist in Abbildung 1.1 noch einmal genauer dargestellt.

Nicht alle oben genannten Purin- und Pyrimidinbasen kommen in den Nucleinsäuren vor. Adenin, Guanin, Thymin und Cytosin sind in den Nucleotiden der DNA enthalten, während in der RNA anstelle von Thymin Uracil auftritt. Nucleotide, die die Basen Xanthin und Hypoxanthin enthalten, sind Zwischenprodukte des Purinnucleotidstoffwechsels.



**Abbildung 1.1 – Aufbau der Purinnucleotide.** A: Der allgemeine Aufbau der Purinnucleotide ist hier schematisch dargestellt. Dabei sind mit Nucleotiden die Nucleosidmono-, -di-, und -triphosphate gemeint. Die Nucleoside bestehen aus einer Nucleobase und Deoxyribose (R = H) oder Ribose (R = OH). Die Deoxynucleotide sind die Bestandteile der DNA während Nucleotide in RNA vorkommen. B: Hier sind die Strukturen der Purinbasen dargestellt.

### 1.1.1 De novo Synthese der Purinnucleotide

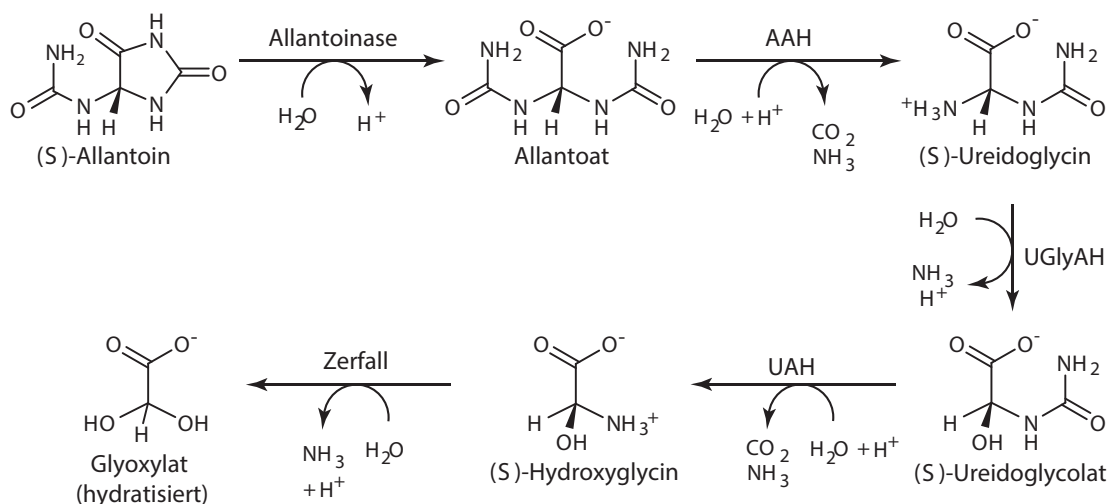
Die Purinnucleotide werden aus kleinen Vorläufermolekülen synthetisiert. Dazu gehören die Aminosäuren Glycin, Glutamin und Asparaginsäure, der aktivierte Zucker Phosphoribosylpyrophosphat sowie 10-Formyltetrahydrofolsäure und Kohlendioxid.

In Mikroorganismen und Tieren wurde dieser Stoffwechselweg eingehend untersucht. Dabei wurde beobachtet, dass die beteiligten Enzyme in einem Multienzymkomplex, dem Purinosom, vorliegen. Mithilfe biochemischer und molekularbiologischer Methoden, konnte gezeigt werden, dass Pflanzen Purinnucleotide in ähnlicher Weise synthetisieren. Die Gene der beteiligten Enzyme in *Arabidopsis thaliana* konnten identifiziert werden. Dabei wurden jedoch keine Multienzymkomplexe nachgewiesen (Reviews: Stasolla *et al.*, 2003; Zrenner *et al.* 2006).

Das Produkt der *de novo* Synthese ist Inosinmonophosphat (IMP). Dieses bildet den Ausgangsstoff für die Synthese von Adenosinmonophosphat (AMP) und Guanidinmonophosphat (GMP).



Kompartiment transportiert wird, ist bislang nicht bekannt. Harnsäure wird, über die Zwischenstufen 5-Hydroxyisourat (HIU) und 2-Oxo-4-Hydroxy-4-Carboxy-5-Ureidoimidazolin (OHCU), zu S-Allantoin abgebaut. Diese Reaktionen werden von der Uratoxidase und der Allantoin synthase katalysiert (Kahn *et al.*, 1998; Ramazzina *et al.*, 2006). Allantoin wird anschließend in das Endoplasmatische Retikulum transportiert, dort findet der weitere Abbau statt (Abb. 1.3). Auch dieser Transportmechanismus ist bislang nicht aufgeklärt (Werner und Witte, 2011). Im Endoplasmatischen Retikulum wird zunächst der Imidazolring des Allantoins geöffnet. Diese Reaktion wird durch die Allantoinamidohydrolase katalysiert, es entsteht Allantoinsäure (Werner *et al.*, 2008). Der im Purinringsystem gebundene Stickstoff wird in den folgenden Reaktionen schrittweise freigesetzt. Zunächst wird Allantoinsäure durch die Beteiligung der Allantoatamidohydrolase zu Ureidoglycin umgesetzt (Werner *et al.*, 2010; Serventi *et al.*, 2010). Dieses wird in zwei Schritten zu Hydroxyglycin abgebaut. Daran sind zwei weitere Enzyme beteiligt: Die Ureidoglycinaminohydrolase und die Ureidoglycolatamidohydrolase (Werner *et al.*, 2010; Serventi *et al.*, 2010). Hydroxyglycin kann spontan zu Glyoxylat und Ammoniak zerfallen. Im Laufe des Xanthinabbaus werden insgesamt vier Moleküle Ammoniak freigesetzt.



**Abbildung 1.3 – Ureidabbau im Endoplasmatischen Retikulum.** Das Ureid Allantoin wird durch die Allantoinamidohydrolase (Allantoinase) zu Allantoat hydrolysiert. Dieses wird durch die Allantoatamidohydrolase (AAH) zu Ureidoglycin, Kohlendioxid und Ammoniak abgebaut. Die Ureidoglycinaminohydrolase (UGlyAH) katalysiert die Reaktion von Ureidoglycin zu Ammoniak und Ureidoglycolat. Letzteres wird durch die Ureidoglycolatamidohydrolase (UAH) zu Hydroxyglycin, Ammoniak und Kohlendioxid abgebaut. In einem letzten Schritt werden, vermutlich durch nicht-enzymatischen Zerfall, Glyoxylat und Ammoniak frei. Modifiziert nach Werner und Witte, 2011

### 1.1.2.2 Abbau der Nukleosidmonophosphate zu Xanthin

Während alle am Abbau von Xanthin beteiligten Enzyme identifiziert wurden, sind die Reaktionen, die von den Nukleosidmonophosphaten zu Xanthin führen nicht vollständig aufgeklärt. Der Kata-

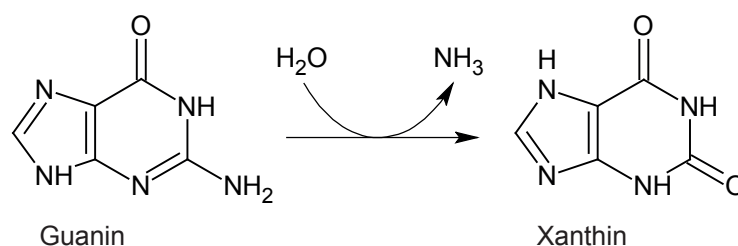
bolismus der Monophosphate erfordert verschiedene Reaktionen, wie Dephosphorylierung, Oxidation und Deaminierung. An der Dephosphorylierung der NMPs sind wahrscheinlich 5'Nukleotidasen beteiligt, eine entsprechende Enzymaktivität wurde in Mais (*Zea mays*) beobachtet (Zrenner *et al.*, 2006). Darüber hinaus besteht die Möglichkeit der Umwandlung von IMP zu XMP sowie von XMP zu GMP. Die Reaktionen könnten durch eine IMP-Dehydrogenase und eine GMP-Synthetase katalysiert werden. Darüber hinaus besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass Phosphotransferasen diese Reaktionen katalysieren (Stasolla *et al.*, 2003)

Nach der Dephosphorylierung der Nukleotide wird der Riboserest hydrolytisch abgespalten. In *Arabidopsis thaliana* konnten die Enzyme Nukleosidhydrolase 1 und 2 identifiziert und charakterisiert werden, die an der Hydrolyse von Xanthosin und möglicherweise auch Inosin beteiligt sind (Jung *et al.* 2009 und 2011; Riegler *et al.*, 2011). Die Aktivität einer Inosin-Guanosin-Hydrolase wurde in Gelber Lupine (*Lupinus luteus*), Topinambur (*Heliantus tuberosus*) und Kartoffel (*Solanum tuberosum*) beobachtet (Guranowski, 1982; LeFloc'h und Lafleuriel 1981; Katahira *et al.*, 2006).

Der Abbau der Purinnukleotide AMP und GMP erfordert jeweils eine Deaminierungsreaktion, bei der die exocyclische Aminogruppe der jeweiligen Verbindung hydrolytisch abgespalten wird. Diese Reaktion kann theoretisch am Nukleotid, am Nukleosid oder an der Nukleobase stattfinden. Die meisten Lebewesen besitzen eine Adenosindeaminase. Pflanzen bilden hier eine Ausnahme, die Deaminierung von Adenosin konnte nicht nachgewiesen werden (Stasolla *et al.*, 2003). Bei Analysen verschiedener Gewebe von Spinat (*Spinacia oleracea*), Tompinambur (*Helianthus tuberosus*) und Erbse (*Pisum sativum*) konnte gezeigt werden, dass in Pflanzen AMP deaminiert wird (Stasolla *et al.*, 2003). Darüber hinaus konnte in *Arabidopsis thaliana* das für die AMP-Deaminase kodierende Gen identifiziert werden (Xu *et al.*, 2005).

### 1.1.3 Guanindeaminasen

Die Deaminierung des Guanylrests wird bei vielen Organismen durch eine Guanindeaminase (GDA) katalysiert (Abb. 1.4). So konnte diese enzymatische Reaktion sowohl bei Prokaryoten als auch Eukaryoten nachgewiesen werden (Liaw *et al.*, 2004; Maynes *et al.*, 2000; Yuan *et al.*, 1999; Paletzki *et al.*, 2002). Entsprechende Gene wurden unter anderem in den Prokaryoten *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*, der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* sowie in Mäusen und Menschen identifiziert (Maynes *et al.*, 2000; Nygaard *et al.*, 2000; Saint-Marc *et al.*, 2004; Paletzki *et al.*, 2002; Yuan *et al.*, 1999). Guanindeaminasen können zwei verschiedenen Proteinsuperfamilien zugeordnet werden: (i) der Superfamilie der Amidohydrolasen oder (ii) der Superfamilie der Cytidin-/Deoxycytidylat-Deaminasen. Zu (i) zählen unter anderem die GDAs aus *E. coli*, *S. cerevisiae*, Mäusen und Menschen. Die GDA aus *B. subtilis* gehört zur zweiten Gruppe. Die Proteine beider Superfamilien nutzen Metallionen als Kofaktoren für die Deaminierung.



**Abbildung 1.4 – Deaminierung von Guanin.** Dargestellt ist die, durch die Guanindeaminase katalysierte, Deaminierung von Guanin zu Xanthin. Dabei wird die exocyclische Aminogruppe des Guanins hydrolytisch und irreversibel abgespalten.

### 1.1.3.1 Deaminasen der Amidohydrolase-Superfamilie

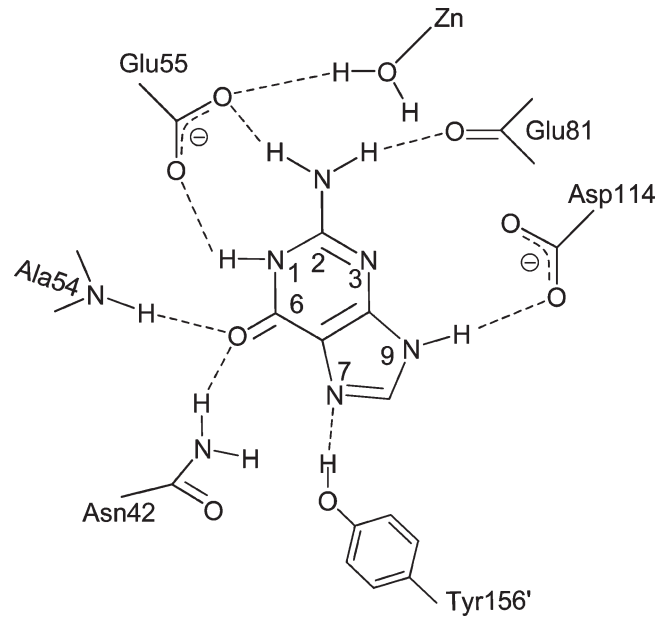
Die Deaminasen der Amidohydrolase-Superfamilie weisen eine TIM-Barrel Domäne in jedem Monomer auf (Seibert *et al.*, 2005). Dieses Tertiärstrukturelement besteht aus acht parallelen  $\beta$ -Faltblättern, die über acht  $\alpha$ -Helices miteinander verbunden und in Form eines Fasses (*barrel*) angeordnet sind. Den Namen erhielt diese Struktur von der Triosephosphat-Isomerase (TIM).

Einige Amidohydrolasen enthalten mehrere Metallbindestellen pro Untereinheit (Lai *et al.*, 2004). Die meisten Deaminasen, die zu dieser Proteinfamilie gehören, nutzen Zinkionen als Kofaktoren. Die Koordinierung des Metallions geschieht mit Hilfe zweier Histidinreste, die in dem, neun Aminosäuren umfassenden, Motiv PGX[V/I]DXH[T/V/I]H auftreten (Maynes *et al.*, 2000).

### 1.1.3.2 Deaminasen der Cytidin-/Deoxycytidylat-Deaminase Superfamilie

Die Mitglieder der Cytidin-/Deoxycytidylat-Deaminase Superfamilie haben eine  $\alpha$ - $\beta$ - $\alpha$ -Faltung mit fünf  $\beta$ -Strängen. Zu diesen Proteinen zählen neben den GDAs auch Cytidineaminasen, Cytosidineaminasen, dCMP-Deaminasen, Riboflavinbiosynthese-Enzyme sowie RNA-editierende Enzyme (Liaw *et al.*, 2004; Ko *et al.*, 2003; Ouyang *et al.*, 2010; Delannoy *et al.*, 2009).

All diese Deaminasen katalysieren die irreversible und zinkabhängige Hydrolyse einer Aminogruppe zu einer Ketogruppe. Die vergleichende Sequenzanalyse der GDA von *B. subtilis* mit der Cytosidineaminase aus *S. cerevisiae* sowie verschiedener Cytidineaminasen zeigte, dass Aminosäuren, die am katalytischen Mechanismus beteiligt sind, konserviert sind. Gleiches gilt für die strukturbildenden und zinkbindenden Aminosäuren. Die Koordinierung des Metallions wird durch die Motive HXE (oder CXE) und PCXXC vermittelt (Liaw *et al.*, 2004). Darüber hinaus konnte mit Hilfe der Kristallstrukturanalyse der GDA aus *B. subtilis* nachgewiesen werden, dass das Protein als Dimer vorliegt. Dabei wurde auch gezeigt, dass eine Überlagerung beider Untereinheiten stattfindet (*domain swapping*). Der C-Terminus eines Monomers ist an der Bildung des aktiven Zentrums im anderen Monomer beteiligt (Liaw *et al.*, 2004). Die C-terminale Aminosäure Tyrosin ist dabei mit verantwortlich für die Bindung von Guanin. Auch die anderen an der Substratbindung beteiligten Aminosäuren konnten, mithilfe der Kristallstruktur, identifiziert werden (Abb. 1.5; Liaw *et al.*, 2004; Yao *et al.*, 2007)



**Abbildung 1.5 – Modell der Guaninbindung in der Guanindeaminase (GDA) von *Bacillus subtilis*.** Mithilfe von Kristallstrukturanalysen der GDA von *B. subtilis*, konnten die Aminosäuren ermittelt werden, die für die Koordinierung des Substrats im aktiven Zentrum verantwortlich sind. Dabei wurde auch gezeigt, dass die C-terminale Aminosäure eines Monomers (Tyr156') an der Bindung von Guanin im anderen Monomer beteiligt ist. Yao *et al.*, 2007

### 1.1.3.3 Guanindeaminasen in Pflanzen

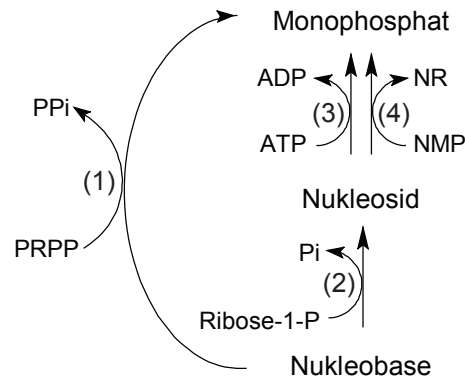
Bei Pflanzen wurde in Mesophyllzellprotoplasten von Tabak (*Nicotiana tabacum*) die Deaminierung radioaktiv-markierten Guanins beobachtet (Barankiewicz und Paszkowski, 1979). Außerdem konnte eine Proteinfraction aus Teeblättern aufgereinigt werden, die ebenfalls diese Reaktion katalysierte (Negishi *et al.*, 1994). Ein für eine Guanindeaminase kodierendes Gen wurde bislang jedoch für keine Pflanze beschrieben.

### 1.1.4 Recycling der Purinnukleotide

Neben dem Abbau der Purinnukleotide, können diese auch aus verschiedenen Zwischenprodukten des Stoffwechselweges recycelt werden (Abb. 1.6). Diese Reaktionen werden *salvage*-Reaktionen, also Bergungsreaktionen, genannt. Sie haben den Vorteil, dass bei dieser Art der Nukleotidsynthese weniger Energie verbraucht wird als bei der *de novo* Synthese.

Die Purinbasen können zum Beispiel durch die Beteiligung von Phosphoribosyltransferasen zu den entsprechenden Nucleosidmonophosphaten umgesetzt werden. In Arabidopsis wurde sowohl eine Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase als auch eine Adeninphosphoribosyltransferase beschrieben (Liu *et al.*, 2007; Lee und Moffatt, 1994).

Auch die Nucleoside können als Ausgangsstoff für das Recycling genutzt werden. So konnten zum Beispiel in Kartoffeln die Aktivitäten von Adenosin- und Inosin-Guanosinkinase nachgewiesen werden (Katahira *et al.*, 2006). In Arabidopsis wurde das Gen der Adenosinkinase identifiziert (Moffatt *et al.*, 2000).



**Abbildung 1.6 – Schematische Darstellung des Purinnucleotidrecyclings.** Die Nucleotide können aus verschiedenen Zwischenprodukten des Abbaues recycelt werden. Abgebildet sind die Reaktionen, die laut Stasolla *et al.*, 2003 am Recycling beteiligt sein könnten. Reaktion 2 spielt wahrscheinlich kaum eine Rolle im Recycling der Nucleotide. 1: Phosphoribosyl-Transferase, 2: Nucleosidphosphorylase, 3: Nucleosidkinase, 4: Nucleosidphosphotransferase

## 1.2 Spezielle Funktionen des Purinnucleotidabbaus

Der Abbau der Purinnucleotide dient in verschiedenen Pflanzenarten nicht nur der Rückgewinnung des gebundenen Stickstoffs. Vielmehr ist dieser Stoffwechselweg sowohl am Export von Stickstoff aus den Wurzeln bestimmter Leguminosen beteiligt (1.2.1) als auch an der Synthese von Purinalkaloiden in koffein- und theobrominhaltigen Pflanzen (1.2.2). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass Seneszenz und Dunkelstress eine Akkumulation der Ureide verursachen. Es wird vermutet, dass diese Metabolite eine schützende Funktion bei oxidativem Stress besitzen (Brychkova *et al.*, 2008). Auch im Zusammenhang mit Trockenstress wurde eine Funktion der Ureide zum Schutz vor reaktiven Sauerstoffspezies diskutiert (Watanabe *et al.*, 2010).

### 1.2.1 Ureid-exportierende Pflanzen

In bestimmten Leguminosen haben die Biosynthese und der Abbau der Purinnucleotide eine zusätzliche Funktion bei der Stickstoffversorgung. Die meisten dieser Pflanzen, wie zum Beispiel die Sojabohne gehen Symbiosen mit stickstofffixierenden Bakterien, zum Beispiel Rhizobien, ein. In den symbiotischen Knöllchen (Noduli) wird Luftstickstoff in Ammoniak umgewandelt und so für die Pflanze nutzbar gemacht (Schubert, 1986). Nach Assimilation des Ammoniaks in die Aminosäure



Glutamin, kann dieser Metabolit für die *de novo* Synthese von Purinnukleotiden genutzt werden. Das führt dazu, dass der größte Teil des gebundenen Stickstoffs in Wurzeln in Form der Nukleotide vorliegt. Durch den Abbau dieser Verbindungen werden die Ureide Allantoin und Allantoinensäure freigesetzt. Diese dienen dem Transport des gebundenen Stickstoffs von den Knöllchen zum Spross und tragen so zur Stickstoffversorgung der Pflanze bei (Schubert, 1986).

### 1.2.2 Purinalkaloid-produzierende Pflanzen

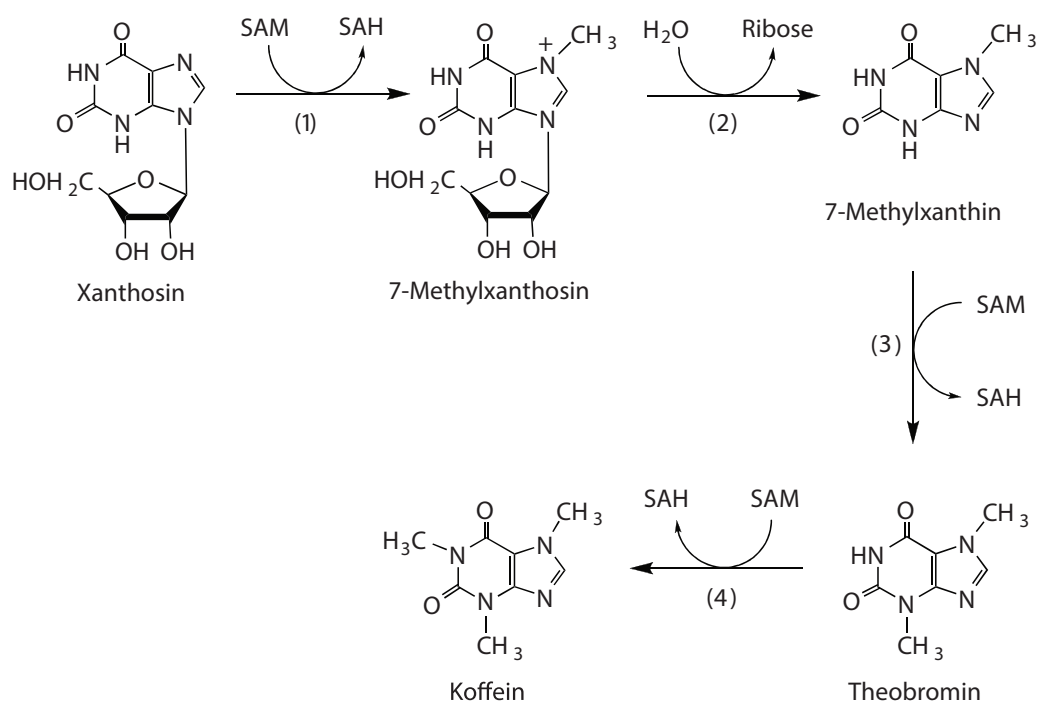
Neben der Bedeutung des Purinnukleotidkatabolismus für die Remobilisierung von Stickstoff, stellt er bei einigen Pflanzen auch den Ausgangspunkt für die Synthese von Purinalkaloiden dar. Zu diesen Sekundärmetaboliten gehören verschiedene Methylxanthin- und Methylharnsäurederivate (Ashihara und Crozier, 1999). Methylxanthine wurden in circa 100 Pflanzenarten nachgewiesen (Ashihara und Suzuki, 2004). In hoher Konzentration kommen diese Verbindungen jedoch nur in einer begrenzten Anzahl von Pflanzenspezies vor. Dazu zählen unter anderem Tee, Kaffee und Kakao. Die bekanntesten Methylxanthinderivate sind Koffein (1,3,7-Trimethylxanthin) und Theobromin (3,7-Dimethylxanthin). Koffein wurde zu Beginn der 1820er Jahre aus Tee und Kaffee isoliert, die Biosynthese und der Abbau waren aber lange nicht vollständig aufgeklärt. Erst 1999 wurde die Aufreinigung der Koffeinsynthese aus Teeblättern beschrieben, ein Jahr später folgte die Klonierung des kodierenden Gens (Kato *et al.*, 1999; Kato *et al.*, 2000).

Die Biosynthese von Koffein geht von Xanthosin und damit von einem Intermediat des Purinnukleotidkatabolismus aus (Abb. 1.7). Die Methylgruppen für die Koffeinsynthese werden von S-Adenosylmethionin zur Verfügung gestellt. Experimente mit radioaktiv-markierten Vorstufen zeigten, dass zunächst Xanthosin zu 7-Methylxanthosin methyliert wird. Anschließend wird der Riboserest abgespalten und das entstehende 7-Methylxanthin durch eine weitere Methylierung zu Theobromin umgewandelt. Nach einem dritten Methylierungsschritt ist die Synthese von Koffein beendet (Koshiishi *et al.*, 2001).

Der Koffeingehalt der Samen verschiedener *Coffea*-Spezies liegt zwischen 0.4 und 2.4 % des Trockengewichts (Mazzafera und Carvalho, 1992). In jungen Teeblättern (*Camellia sinensis*) beträgt der Koffeingehalt zwei bis drei Prozent des Trockengewichts (Ye *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu Teeblättern und Kaffeesamen enthalten die Samen von Kakao (*Theobroma cacao*) mehr Theobromin (2.2 bis 2.7 %) als Koffein (0.6 bis 0.8 %; Senanayake und Wijesekera, 1971). Metabolitanalysen sich entwickelnder Kakaosamen zeigten, dass der Gehalt an Theobromin und Koffein mit steigendem Alter der Samen zunimmt (Pereira-Caro *et al.*, 2013).

Die physiologische Funktion von Purinalkaloiden in der Pflanze ist bislang nicht ausreichend aufgeklärt. Es bestehen jedoch zwei Hypothesen zu ihrer Funktionalität. Zum Beispiel wird angenommen, dass die hohen Konzentrationen dieser Verbindungen in Blättern und Samen der Pflanzen junge Gewebe vor dem Befall von Pathogen und Herbivoren schützen. Außerdem wird eine allelopathische beziehungsweise autotoxische Funktion von Koffein diskutiert. Die Vermutung dabei ist, dass das

Purinalkaloid, sobald es aus abgefallenen Blättern und Samenschalen in den Boden freigesetzt wurde, die Keimung von Samen nahe der Mutterpflanze verhindert. Es ist jedoch noch nicht ausreichend geklärt, ob Koffein im Ökosystem diese Funktion besitzt (Review Ashihara *et al.*, 2011).



**Abbildung 1.7 – Biosynthese von Koffein ausgehend von Xanthosin.** Dargestellt sind die einzelnen Schritte der Koffeinbiosynthese und mit den beteiligten Enzymen. 1: 7-Methylxanthosinsynthase, 2: N-Methylnucleosidase, 3: Theobrominsynthase, 4: Koffeinsynthase, SAM: S-Adenosylmethionin, SAH: S-Adenosylhomocystein. Modifiziert nach Ashihara *et al.*, 2011

## 1.3 Phänotypische Analysen von Nukleotidabbaumutanten

### 1.3.1 Xanthindehydrogenase-Mutanten

Für Arabidopsismutanten bei denen mit Hilfe von RNA-Interferenz (RNAi) die Expression der Xanthindehydrogenase (XDH) stillgelegt wurde, konnte ein Einfluss des Enzymverlusts auf das Wachstum beobachtet werden. So waren Pflanzen mit reduzierter XDH-Aktivität während der vegetativen Phase deutlich kleiner als der Wildtyp, sowohl in Bezug auf die Größe selbst als auch auf die Anzahl und Größe der Rosettenblätter (Nakagawa *et al.*, 2007). Weiter beschreiben die Autoren, dass dieser Unterschied auch während der reproduktiven Phase bestehen blieb. Die Pflanzen blühten zwar zum gleichen Zeitpunkt, erreichten jedoch nicht die gleiche Sprosslänge wie der Wildtyp. Auch die Anzahl und das Gewicht der Samen waren bei den Mutanten geringer und sie zeigten eine beschleunigte Seneszenz. Dies wurde sowohl anhand einer früheren Gelbfärbung der Blätter und dem damit ver-

bundenen geringeren Chlorophyllgehalt als auch der Aktivierung von Seneszenzmarkergenen deutlich (Nakagawa *et al.*, 2007). Die Autoren gehen davon aus, dass zwischen dem Verlust der XDH und den beobachteten Phänotypen ein Zusammenhang besteht. Die beschleunigte Seneszenz stellt eine physiologische Reaktion auf eine Stickstofflimitierung beziehungsweise ein hohes Kohlenstoff-zu-Stickstoff-Verhältnis (C:N) dar (Diaz *et al.*, 2008; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008). Da die XDH am Purinnukleotidabbau beteiligt ist und damit an der Stickstoffremobilisierung, wird davon ausgegangen, dass die *XDH*-RNAi-Linien während der Alterung eine Stickstofflimitierung erfahren. (Nakagawa *et al.*, 2007).

Die Seneszenz von *xdh1*-Mutanten (RNAi und T-DNA) im Vergleich zum Wildtyp wurde genauer untersucht (Brychkova *et al.*, 2008). Dabei wurde mit zunehmendem Alter ein Ansteigen der Xanthinkonzentration in den Rosettenblättern der Mutanten nachgewiesen. Im Wildtyp war dies nicht zu beobachten, hier war hingegen eine Erhöhung der Allantoin- sowie Allantoinensäurekonzentration mit zunehmendem Blattalter zu beobachten. Beides zeigte, dass der Purinnukleotidstoffwechsel während der Seneszenz verstärkt ablief (Brychkova *et al.*, 2008).

Außer der natürlichen Seneszenz nutzten die Autoren die Möglichkeit diesen Prozess durch anhaltende Dunkelheit zu induzieren. Dazu wurden *xdh1*-Mutanten und Wildtyppflanzen für sechs Tage der Dunkelheit ausgesetzt. Die Mutanten wiesen anschließend deutlich mehr Blattschädigungen sowie einen geringeren Gehalt an Chlorophyll und Proteinen auf (Brychkova *et al.*, 2008). Auch konnte im Verlauf der sechs Tage ein Anstieg der Konzentration von Xanthin in den Mutanten sowie von Allantoin und Allantoinensäure im Wildtyp beobachtet werden. Der Purinnukleotidabbau und die XDH scheinen also auch während der induzierten Seneszenz eine wichtige Rolle zu spielen. Aus der Akkumulation von Allantoin und Allantoinensäure sowie weiteren Experimenten schließen die Autoren auf eine wichtige Rolle beider Ureide im Zusammenhang mit dem Dunkelstress. Sie stellen die Hypothese auf, dass diese Verbindungen zum einen als transportable Metabolite genutzt werden können und zum anderen die Zelle vor reaktiven Sauerstoffspezies schützen (Brychkova *et al.*, 2008).

### 1.3.2 Nukleosidhydrolase-Mutanten

In Anlehnung an den oben genannten Versuch wurde die Bedeutung der Nukleosidhydrolase 1 (NSH1) bei anhaltender Dunkelheit untersucht (Jung *et al.*, 2011). Pflanzen einer entsprechenden T-DNA-Insertionslinie (*nsh1-1*) wurden für fünf Tage im Dunkeln gehalten. Anschließend war eine deutlich stärkere Gelbfärbung der Blätter der *nsh1-1* Mutanten im Vergleich zum Wildtyp zu beobachten, verbunden mit einer Akkumulation von Inosin, Uridin und Xanthosin. Auch die Expression von Seneszenzmarkergenen war in den Mutanten höher als im Wildtyp. Aus dieser Ähnlichkeiten zum Phänotyp der *xdh*-Mutanten bei anhaltender Dunkelheit (Brychkova *et al.*, 2008), schließen auch Jung und Kollegen, dass eine Beeinträchtigung des Purinnukleotidkatabolismus zu beschleunigter Seneszenz bei anhaltender Dunkelheit führt (Jung *et al.*, 2011).

Außer des Effekts eines *NSH1*-Verlusts während der induzierten Seneszenz, beobachteten die Au-

toren bereits in früheren Studien einen Einfluss auf die Keimung der Samen (Jung *et al.*, 2009). So wurde festgestellt, dass sowohl *NSH1*-Überexpressoren als auch eine Stilllegungsmutante langsamer keimten als der Wildtyp. Die verringerte *NSH1*-Expression in der Stilllegungsmutante führte dabei zur stärksten Keimungsverzögerung.

### 1.3.3 Dihydropyrimidindehydrogenase-Mutanten

Mit der Nukleosidhydrolase 1 wurde ein Enzym untersucht, das sowohl eine Funktion im Purin- als auch im Pyrimidinnukleotidkatabolismus besitzt. Auch Verlustmutanten anderer, am Abbau der Pyrimidinnukleotide beteiligter, Enzyme wurden hinsichtlich ihrer Phänotypen untersucht. Die Analyse von T-DNA-Insertionsmutanten des *PYD1*-Gens zeigte, dass sich der Verlust der dadurch kodierten Dihydropyrimidindehydrogenase ebenfalls auf Entwicklungsprozesse der Pflanze auswirkt (Cornelius *et al.*, 2011).

Die entsprechenden *pyd1*-Mutanten keimten langsamer als der Wildtyp und Pflanzen von *PYD1*-Überexpressionslinien. Dieser Unterschied in der Entwicklung war während des gesamten Wachstums der Pflanzen sichtbar, so waren die *pyd1*-Mutanten auch nach sechs Wochen deutlich kleiner als der Wildtypen und die Überexpressoren. Auch die Blüte setzte zuerst bei Pflanzen der Überexpressionslinien ein, dann beim Wildtyp und zuletzt bei Pflanzen der T-DNA-Insertionslinie. Am Ende der Wachstumsphase konnten von den Überexpressoren signifikant mehr Samen geerntet werden, als vom Wildtyp und den Verlustmutanten. Letztere bildeten zudem weniger Samen als der Wildtyp (Cornelius *et al.*, 2011).

## 1.4 Dunkelheit zur Seneszenzinduktion

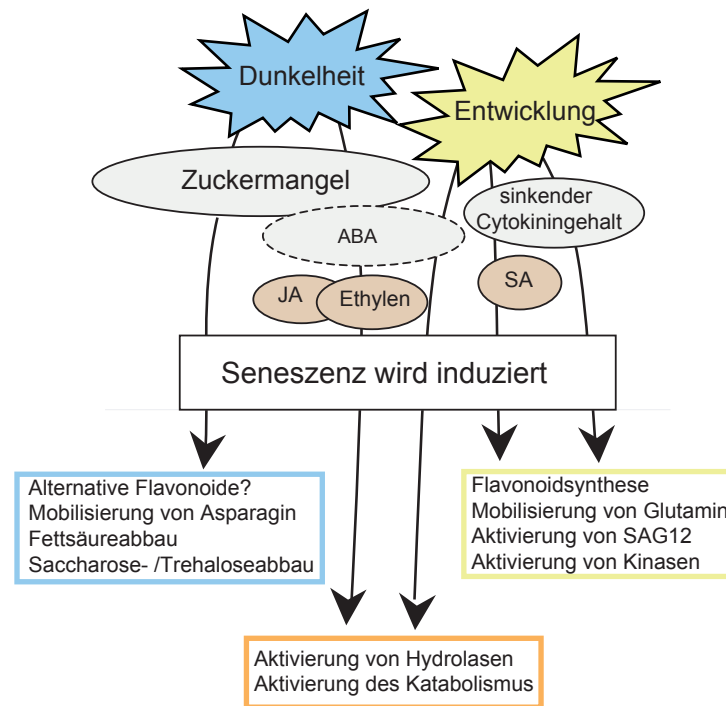
Im vorhergehenden Abschnitt wurde beschrieben, dass sowohl der Verlust der Xanthindehydrogenase als auch der Nukleosidhydrolase 1 einen Einfluss auf das Wachstum von *Arabidopsis thaliana* während einer längeren Dunkelphase hat.

Anhaltende Dunkelheit wird genutzt um Seneszenz in einzelnen Blättern oder der gesamten Pflanzen auszulösen und deren Effekte zu untersuchen (Lin und Wu 2004; Thimm *et al.*, 2004). Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass in den betroffenen Geweben die entsprechenden Prozesse synchron in allen Zellen auftreten. Während der natürlichen Entwicklung der Pflanze ist dies nicht der Fall. Das erschwert die Erforschung dieses Entwicklungsabschnitts.

Im Rahmen der natürlichen Blattalterung werden Prozesse in Gang gesetzt, die zur Remobilisierung von Nährstoffen aus den alternden Blättern hin zu wachsenden Geweben führen (Hörtensteiner und Feller, 2002). Die Genexpression während der Seneszenz wird durch das komplexe Zusammenspiel verschiedener Signaltransduktionswege gesteuert. Daran sind unter anderem auch die durch Ethylen, Jasmonsäure beziehungsweise Salicylsäure vermittelten Signalkaskaden beteiligt (Grbic und Blecker, 1995; He *et al.*, 2002; Morris *et al.*, 2000).

Bei entwicklungsbedingter Seneszenz wird die Photosynthese, wenn auch vermindert, fortgesetzt. Außerdem ist in natürlich seneszierenden Blättern in der Regel ein hohes Kohlenstoff-zu-Stickstoff Verhältnis messbar (Diaz *et al.*, 2008; Masclaux-Daubresse *et al.*, 2008).

Transkriptomanalysen zeigten, dass die Vorgänge bei induzierter Seneszenz nicht vollständig mit denen bei entwicklungsbedingter Seneszenz übereinstimmen (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Durch



**Abbildung 1.8 – Vergleich der Prozesse bei induzierter und entwicklungsbedingter Seneszenz.** Anhaltende Dunkelheit löst einen Mangel an Kohlenhydraten in der Pflanze aus. Dieser führt zu einer Umstellung des Stoffwechsels. Dabei werden teilweise andere Prozesse ausgelöst als bei der natürlichen Seneszenz. blau eingrahmt: charakteristische Prozesse bei dunkel-induzierter Seneszenz; gelb eingrahmt: charakteristische Prozesse bei natürlicher Seneszenz; orange eingrahmt: Prozesse, die bei beiden Formen der Seneszenz beobachtet wurden. Modifiziert nach Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005

die fehlende Photosynthese während der andauernden Dunkelheit entsteht in der Pflanze ein Mangel an Kohlenhydraten. Die Expression von Genen deren Produkte am Abbau von Saccharose beteiligt sind, nimmt während der dunkelinduzierten Seneszenz zu (Lin und Wu 2004; Thimm *et al.*, 2004; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Metabolomanalysen zeigten zudem, dass der Gehalt an Stärke, Saccharose und reduzierenden Zuckern in den Rosetten von Arabidopsis während einer sechstägigen Dunkelphase drastisch sinkt (Gibon *et al.*, 2006; Usadel *et al.*, 2008). Bereits am Ende der regulären Nacht (10 Stunden) waren lediglich noch 10 % der am Tag gebildeten Stärkemenge in den Blättern vorhanden. Die Saccharosekonzentration nahm in diesem Zeitraum ähnlich stark ab. Bei einer Verlängerung der Nacht sank der Gehalt beider Metabolite noch weiter ab (Usadel *et al.*, 2008). Auch bei Maispflanzen ist nach der Unterbrechung der Photosynthese durch Dunkelheit eine starke Abnahme

von löslichen Zuckern, Saccharose, Fructose und Glucose in vielen Geweben zu beobachten (Brouquisse *et al.*, 1998). In *Arabidopsis thaliana* reduziert sich die Konzentration von Glucose-6-phosphat und Fructose-6-Phosphat in den ersten vier Stunden der verlängerten Nacht. Anschließend steigen beide wieder leicht an (Usadel *et al.*, 2008). Beide Metabolite werden während der Photosynthese produziert und unter anderem bei der Synthese von Kohlenhydraten wieder verbraucht. Die starke Abnahme zu Beginn der zusätzlichen Dunkelphase zeigt, dass sich ein Kohlenhydratmangel eingestellt hat, der den Metabolismus einschränkt. Die Zunahme der Konzentration der Zuckerphosphate zu einem späteren Zeitpunkt der Dunkelphase ist ein Anzeichen dafür, dass der Stoffwechsel sich an die Mangelsituation anpasst (Usadel *et al.*, 2008).

Der entstehende Zuckermangel ist vermutlich das Hauptsignal bei anhaltender Dunkelheit (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Daraus folgt eine Umstellung des Metabolismus bei der Autophagie ausgelöst wird (Izumi *et al.*, 2013). Dieser Prozess beinhaltet die Degradation von Proteinen, Nukleinsäuren und Lipiden. Auffällig ist dabei, dass Stickstoff bevorzugt in Form von Asparagin transportiert wird und nicht, wie bei entwicklungsbedingter Seneszenz in Form von Glutamin (Tsai *et al.*, 1990; Usadel *et al.*, 2008; Miyashita und Good, 2008). Darüber hinaus wurde ein Anstieg verzweigt-kettiger und aromatischer Aminosäuren beobachtet. Diese können als alternative respiratorische Quellen in den Mitochondrien genutzt werden (Review Araújo *et al.*, 2011).

## 1.5 Ziel der Arbeit

Die vorliegende Dissertation befasst sich mit der biochemischen und physiologischen Charakterisierung einer am Abbau von Guanosinmonophosphat (GMP) beteiligten Deaminase von *Arabidopsis thaliana*.

Bei vielen Organismen findet die Abspaltung der exocyclischen Aminogruppe des Guanylrestes statt, nachdem durch Dephosphorylierung von GMP sowie Phosphorolyse oder Hydrolyse von Guanosin die Nukleobase Guanin entstanden ist. Der Ausgangspunkt dieser Arbeit war die Hypothese, dass im Katabolismus der Purinnukleotide von *A. thaliana* ebenfalls eine Guanindeaminase aktiv ist. Nach der Identifizierung eines Kandidatenproteins, sollte dieses zur Überprüfung der Substratspezifität sowie der Analyse enzymkinetischer Konstanten aufgereinigt und in Aktivitätstests eingesetzt werden. Zusätzlich zur biochemischen Untersuchung der Enzymreaktion, sollte die subzelluläre Lokalisation der Deaminase sowie ihr Expressionsprofil in der Pflanze charakterisiert werden. Dabei galt es unter anderem das Proteinniveau in verschiedenen Geweben zu untersuchen. Zu diesem Zweck musste zunächst ein spezifisch gegen die Deaminase gerichtetes Antiserum generiert werden.

Einen weiteren Aspekt der Arbeit stellte die Analyse der *in vivo* Funktion sowie der physiologischen Bedeutung der Deaminase im Purinnukleotidabbau von *A. thaliana* dar. Aus diesem Grund sollten die Auswirkung des Enzymverlusts mit Hilfe von T-DNA-Insertionslinien untersucht werden. Die Mutanten sollten hinsichtlich ihres Wachstums und ihrer Entwicklung im Vergleich zum Wildtyp sowie zu Komplementationlinien überprüft werden. Ausgehend von Studien zur Xanthindehydrogenase

(Brychkova *et al.*, 2008) und zur Nukleosidhydrolase 1 (Jung *et al.*, 2011), wurde der Einfluss anhaltender Dunkelheit auf das Wachstum der Deaminasemutanten untersucht.

Die Analyse der Purinmetabolite in *A. thaliana* war ebenfalls ein Ziel dieser Arbeit. Vorangehend war die Entwicklung einer Methode notwendig, welche die chromatographische Auftrennung sowie die UV-Detektion der Nukleobasen, Nukleoside und Nukleotide ermöglicht. Die Anwendung dieser Messmethodik versprach die Möglichkeit der Analyse des Purinnukleotidabbaus auf der molekularen Ebene. Dazu sollten Metabolitextrakte des Wildtyps mit denen der Deaminasemutanten verglichen werden. Auch die Analyse der Metabolite von Verlustmutanten anderer, an diesem Stoffwechselweg beteiligter, Enzyme sowie von Doppelmutanten sollte zum Erkenntnisgewinn über den Katabolismus von Purinnukleotiden in *A. thaliana* beitragen.

# Material und Methoden

## 2.1 Material

### 2.1.1 Antibiotika

Tabelle 2.1 – Verwendete Antibiotika.

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	100 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Carbenicillin (Car)	50 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Gentamycin (Gent)	15 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Kanamycin (Kan)	50 $\mu\text{g ml}^{-1}$
Rifampicin (Rif)	50 $\mu\text{g ml}^{-1}$

### 2.1.2 Bakterienstämme

Tabelle 2.2 – Verwendete Bakterienstämme.

Spezies	Stamm	Resistenzgene
<i>Escherichia coli</i>	K-12 DH10B (Invitrogen)	-
<i>Escherichia coli</i>	BL21 (DE3) (Novagen)	-
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	GV3101::pMP90RK (Koncz und Schell, 1986)	Rif <sup>R</sup> , Gent <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup>
<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	C58C1::pCH322 (Voinnet et al., 2003)	Rif <sup>R</sup> , Tet <sup>R</sup>



### 2.1.3 Vektoren

**Tabelle 2.3 – Verwendete Ausgangsektoren.**

Vektor	Charakteristika	Verwendung
pJET1.2/blunt (Fermentas)	ep(pMB1), Amp <sup>R</sup> , eco47IR, PlacUV5, T7 Promotor	Blunt-End-Vektor zum Klonieren von PCR-Produkten
pET30a (V4, Novagen)	Kan <sup>R</sup> , T7 Promotor, LacI, His	Vektor für His-Fusion und induzierbare Überexpression in <i>Escherichia coli</i>
pXNS1pat-Strep (V41, Cao <i>et al.</i> 2010)	ori ColE1, ori RK2, p35S, pA35S, BASTA <sup>R</sup> , StrepII	binärer Vektor für N-terminale Strep-Fusion und Überexpression <i>in planta</i> , 35S-Promotor
pXNS2pat-Strep (V42, Cao <i>et al.</i> 2010)	ori ColE1, ori RK2, p35S, pA35S, BASTA <sup>R</sup> , StrepII	binärer Vektor für N-terminale Strep-Fusion und Überexpression <i>in planta</i> , 35S-Promotor
pXNS2pat-YFP (V63, Dahncke und Witte 2013)	ori ColE1, ori RK2, p35S, pA35S, BASTA <sup>R</sup> , eYFP	binärer Vektor für N-terminale YFP-Fusion und Überexpression <i>in planta</i> , 35S-Promotor; im Rahmen dieser Arbeit hergestellt
pXCS-YFP (V36, Feys <i>et al.</i> , 2005)	ori ColE1, ori RK2, p35S, pA35S, BASTA <sup>R</sup> , eYFP	binärer Vektor für C-terminale YFP-Fusion und Überexpression <i>in planta</i> , 35S-Promotor
pI2 pCPK1-GUS (V21, Matschi <i>et al.</i> , 2013)	ori ColE1, ori RK2, pCPK1, S3 Terminator, BASTA <sup>R</sup>	Vektor für die Promotor-GUS Fusion und Expression <i>in planta</i> , CPK1-Promotor austauschbar
p35S::p19 (Voinnet <i>et al.</i> , 2003)	p35S, p19, Kan <sup>R</sup>	binärer Vektor für die Expression des <i>Silencing Inhibitors</i> p19

**Tabelle 2.4 – Vektoren zur Expression von Varianten der GSDA.** Die Vektoren X5, X9 und P30 wurden nicht in dieser Arbeit generiert. Sie standen bereits in der AG Witte zur Verfügung.

Name	Sequenz	Vektor	Klonierung	Verwendung
X5	CDS	pXNS2pat-Strep	NcoI und BamHI	N-terminal Strep-markierte Expression der GSDA in <i>A. thaliana</i> und <i>N. benthamiana</i> (GSDA-Strep)
X9	CDS	pET30a	NcoI und BamHI	N-terminal His-markierte Expression der GSDA in <i>E. coli</i>
X13	CDS	pXNS2pat-YFP	NcoI und BamHI	N-terminal YFP-markierte Expression der GSDA in <i>A. thaliana</i> und <i>N. benthamiana</i> (GSDA-YFP)
X32	Promotor	pI2 pCPK1-GUS	AscI und MfeI	Analyse der Promotoraktivität in <i>A. thaliana</i>
X74	CDS	pXNS2-patStrep	Mutagenese von X5 mit den Primern N0133 und N0134	N-terminal Strep-markierte Expression der Variante GSDA-YWA in <i>N. benthamiana</i>
X75	CDS	pXNS2-patStrep	Mutagenese von X5 mit den Primern X5 N0135 und N0136	N-terminal Strep-markierte Expression der Variante GSDA-HWS in <i>N. benthamiana</i>
X85	CDS	pXNS2-patStrep	NcoI und BamHI	N-terminal Strep-markierte Expression der Variante GSDA-YWA-C-term mod. in <i>N. benthamiana</i>
X86	CDS	pXNS2-patStrep	NcoI und BamHI	N-terminal Strep-markierte Expression der Variante GSDA-HWS-C-term mod. in <i>N. benthamiana</i>
X89	CDS	pXNS2-patStrep	NcoI und BamHI	N-terminal Strep-markierte Expression der Variante GSDA-C-term mod. in <i>N. benthamiana</i>
X92	CDS	pXCS-YFP	EcoRI und XmaI	C-terminal YFP-markierte Expression der GSDA in <i>N. benthamiana</i>
P30	CDS	pXCS-CFP	EcoRI und XmaI	C-terminal CFP-markierte Expression der $\beta$ -Ureidopropionase in <i>N. benthamiana</i>

**Tabelle 2.5 – Vektoren zur Expression von Varianten der GDA.**

<b>Name</b>	<b>Sequenz</b>	<b>Vektor</b>	<b>Klonierung</b>	<b>Verwendung</b>
X49	CDS	pXNS1-patStrep	NdeI und BamHI	N-terminal Strep-markierte Expression der GDA in <i>N. benthamiana</i>
X76	CDS	pXNS1-pat-Strep	Mutagenese von X49 mit den Primern N0138 und N0139	N-terminal Strep-markierte Expression der Variante GA-HLS in <i>N. benthamiana</i>
X77	CDS	pXNS1-pat-Strep	Mutagenese von X49 mit den Primern N0140 and N0141	N-terminal Strep-markierte Expression der Variante GDA-YLA in <i>N. benthamiana</i>
X87	CDS	pXNS1-pat-Strep	NdeI und BamHI	N-terminal Strep-markierte Expression der Variante GDA-HLS-C-term mod. in <i>N. benthamiana</i>
X88	CDS	pXNS1-pat-Strep	NdeI und BamHI	N-terminal Strep-markierte Expression der Variante GDA-YLA-C-term mod. in <i>N. benthamiana</i>
X90	CDS	pXNS1-pat-Strep	NdeI und BamHI	N-terminal Strep-markierte Expression der Variante GDA-C-term mod. in <i>N. benthamiana</i>

## 2.1.4 Medien

**Tabelle 2.6 – Verwendete Medien.**

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<i>lysogeny broth</i> (LB)	1,0 % (w/v) Trypton; 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt; 1,0 % (w/v) NaCl; pH 7,0 (mit NaOH einstellen); Festmedium: 1,5 % (w/v) Agar
<i>yeast extract broth</i> (YEB)	0,5 % (w/v) Fleischextrakt; 0,5 % (w/v) Pepton; 0,5 % (w/v) Saccharose; 0,1 % (w/v) Hefeextrakt; 2 mM MgSO <sub>4</sub> ; pH 7,2 (mit NaOH einstellen); Festmedium: 1,5 % (w/v) Agar
CR-Medium	2,0 % (w/v) Difco Bactotrypton, 0,5 % (w/v) Hefe-Extrakt; 0,5 % MgSO <sub>4</sub> (wasserfrei); pH 7,6 (mit NaOH einstellen)
1/2 Murashige Skoog (1/2 MS)	2,2 g l <sup>-1</sup> MS-Salz (Duchefa); pH 5,7 (mit KOH einstellen); Festmedium: 0,8 % (w/v) Phytoagar (Duchefa)

### 2.1.5 Primer

**Tabelle 2.7 – Primer für Genotypisierung und semiquantitative RT-PCR.** Die Annealingtemperatur betrug bei allen Primern 55 °C. F: *forward*, R: *reverse*

Nummer	Name	Sequenz	Beschreibung
448	GABI LB primer	ATATTGACCATCATACTCAT TGC	<i>left border</i> -Primer zur Überprüfung der T-DNA-Insertion in <i>gsda-2</i> (GK 432D08)
1197	LB1 Sail	TTTTTCAGAAATGGATAAATA GCCTTGCTTC	<i>left border</i> -Primer zur Überprüfung der T-DNA-Insertion in <i>gsda-1</i> (SAIL 305B08)
1900	At5g28050 E5 R	TTGGATCCTTAGTATAAACG GAACTTCTCCTTTG	<i>reverser</i> -Primer zur Überprüfung des T-DNA und des WT Allels in <i>gsda-1</i>
1975	At5g28050 E4 R	GGATGGCTCCGAAGCACATC	<i>reverser</i> -Primer zur Überprüfung des T-DNA und des WT Allels in <i>gsda-2</i> und semiquantitative RT-PCR von <i>GSDA</i>
1976	At5g28050 E2 F	GGTACCATCTCCGTAGCTTC TGC	<i>forward</i> -Primer zur Überprüfung des WT Allels in <i>gsda-1</i> und <i>gsda-2</i> und semiquantitative RT-PCR von <i>GSDA</i>
1033	Actin2 F	GTGAACGATTCCTGGACCTG CCTC	Amplifikation von <i>ACTIN2</i> als Referenzgen
1034	Actin2 R	GAGAGGTTACATGTTACCA CAAC	Amplifikation von <i>ACTIN2</i> als Referenzgen

**Tabelle 2.8 – Primer für quantitative PCR.** Die Annealingtemperatur betrug bei allen Primern 60 °C. F: forward, R: reverse

Nummer	Name	Sequenz	Beschreibung
2535	Ubiquitin-10 F	GGCCTTGTATAATCCCTGAT GAATAAG	Amplifikation von <i>UBIQUITIN-10</i> als Referenzgen
2536	Ubiquitin-10 R	AAAGAGATAACAGGAACGGA AACATAGT	Amplifikation von <i>UBIQUITIN-10</i> als Referenzgen
N0342	At5g28050 qPCR F1	TGCATTTTCCGGTCACCAAC	Analyse der Resttranskriptmenge in GK432D08 ( <i>gsda-2</i> )
N0343	At5g28050 qPCR R1	GCACAATCACCGCACCAAAT	Analyse der Resttranskriptmenge in GK432D08 ( <i>gsda-2</i> )
N0346	At5g28050 qPCR F3	GACCCAACTGCACATGCTGA	Analyse der Resttranskriptmenge in Sail305B08 ( <i>gsda-1</i> )
N0347	At5g28050 qPCR R3	ACATCGGACATGGCTCACAA	Analyse der Resttranskriptmenge in Sail305B08 ( <i>gsda-1</i> )

**Tabelle 2.9 – Verschiedene Klonierungsprimer.** F: forward, R: reverse

Nummer	Name	Sequenz	Beschreibung
2209	pXNS-YFP- F	TTGAGCTCTTCAAACAAATAAC ACCAAAAATGGTGAGCAAGG GCGAG	Herstellung eines Vektors, der die N-terminale YFP-Markierung ermöglicht
2210	pXNS-YFP- R	TTGGCGCCCTTGTACAGCTCGT CCA	Herstellung eines Vektors, der die N-terminale YFP-Markierung ermöglicht
2211	At5g28050p- F	TGGCGCGCCGTGTTATGAGTTA GAGTCATTTGAC	Klonierung des Promotors der GSDA
2212	At5g28050p- R1	TTCAATTGGAGTATGAACTTGA AGGAGGA	Klonierung des Promotors der GSDA
N0150	At5g28050 F EcoRI	ACGAATTCATGGAAGAAGCTAA AGTGG	Klonierung der GSDA in pXCS-YFP
N0165	At5g28050 R XmaI	TTCCCGGGGTATAAACGGA TCTCCTTT	Klonierung der GSDA in pXCS-YFP

**Tabelle 2.10 – Primer zur Klonierung der GDA von *B. subtilis* und zum Austausch der C-Termini von GSDA und GDA.** Die Annealingtemperatur betrug bei allen Primern 55 °C. F: *forward*, R: *reverse*

Nummer	Name	Sequenz	Beschreibung
1899	At5g28050E1-F	ACCCATGGAAGAAGCTAAAGTG GAAG	forward-Primer für die Klonierung der GSDA
N0137	At5g28050m3	AGGATCCTTAGTATTCTTTCTT CTCCTTTGTGTTCTGG	Austausch des C-terminus der GSDA von FRLY zu KEY
2175	guaD-F-NdeI	TCATATGAATCATGAAACGTTC	<i>forward</i> -Primer für die Klonierung der GDA
2176	guaD-R-BamHI	TGGATCCTTAATATTCTTTCTT ATTGGC	<i>reverse</i> -Primer für die Klonierung der GDA
N0142	Bsub-GAm3	AGGATCCTCAATATAATCTAAA CTTATTGGCGAAGTTCC	Austausch des C-terminus der GDA von KEY zu FRLY

**Tabelle 2.11 – Primer für die zielgerichtete Mutagenese der GSDA von *A. thaliana*.** SDM: *side directed mutagenesis* F: *forward*, R: *reverse*

Nummer	Name	Sequenz	Beschreibung
N0133	At5g28050sdm1 F	TCGGAGCCATCtATtGGGCG AGACTCAAGA	SDM Primer zum Austausch von HLS zu YWA
N0134	At5g28050sdm1 R	TCTTGAGTCTCGCCCAATAG ATGGCTCCGA	SDM Primer zum Austausch von HLS zu YWA
N0135	At5g28050sdm2 F	TCGGAGCCATCCATTGGTTCG AGACTCAAGA	SDM Primer zum Austausch von HLS zu HWS
N0136	At5g28050sdm2 F	TCTTGAGTCTCGACAAATGG ATGGCTCCGA	SDM Primer zum Austausch von HLS zu HWS

**Tabelle 2.12 – Primer für die zielgerichtete Mutagenese der GDA von *B. subtilis*.** SDM: *side directed mutagenesis* F: *forward*, R: *reverse*

Nummer	Name	Sequenz	Beschreibung
N0138	Bsub-GAsdm1-F	GGGCGCCATCCACTTGTCCC GGCCTAAAG	SDM Primer zum Austausch von YWA zu HLS
N0139	Bsub-GAsdm1-R	CTTTAGGCCGGGACAAGTGG ATGGCGCCC	SDM Primer zum Austausch von YWA zu HLS
N0140	Bsub-GAsdm2-F	GGGCGCCATCTACTTGGCCC GGCCTAAAG	SDM Primer zum Austausch von YWA zu YLA
N0141	Bsub-GAsdm2-R	CTTTAGGCCGGGCCAAGTAG ATGGCGCCC	SDM Primer zum Austausch von YWA zu YLA

## 2.1.6 Pflanzenlinien

**Tabelle 2.13 – Extern bezogene Pflanzenlinien.** Die hier aufgeführten Arabidopsislinien wurden bei folgenden Quellen bezogen: Wildtyp von J. Dangel (University of North Carolina, Chapel Hill, USA); Mutanten vom European Arabidopsis Stock Centre. KO: laborinterne *knock-out* Nummer; \*: in dieser Arbeit genotypisiert

KO	Name	Ökotyp	Linie	Mutagen	Referenz
	Wildtyp	Col0	-	-	-
27*	<i>gsda-1</i>	Col0	SAIL305B08	T-DNA	Sessions <i>et al.</i> , 2002
28*	<i>gsda-2</i>	Col0	GK432D08	T-DNA	Kleinboelting <i>et al.</i> , 2012
33	<i>nsh1-1</i>	Col0	SM3-39680	En/Spm Element	Tissier <i>et al.</i> , 1999
34	<i>nsh1-2</i>	Col0	SALK083120C	T-DNA	Alonso <i>et al.</i> , 2003
29	<i>hgprt-1</i>	Col0	GK015E03	T-DNA	Kleinboelting <i>et al.</i> , 2012

**Tabelle 2.14 – In dieser Arbeit hergestellte transgene Linien.** Nr.: laborinterne Nummer der transgenen Linie

Nr.	Name	Hintergrund	Promotor	Gen	Markierung	Resistenz
X5	<i>gsda-2</i> + <i>Strep-GSDA</i>	GK432D08	35S	<i>GSDA</i>	Strep II	BASTA
X13	<i>gsda-2</i> + <i>YFP-GSDA</i>	GK432D08	35S	<i>GSDA</i>	YFP	BASTA
X32	<i>pGSDA-GUS</i>	WT	<i>GSDA</i> Promotor	<i>GUS</i>		BASTA

**Tabelle 2.15 – Verwendete Kreuzungen.** Die hier aufgeführten Kreuzungen wurden in der AG Witte hergestellt. Nr.: laborinterne Nummer der Kreuzung; KO: laborinterne *knock-out* Nummer

Nr.	Name	Pollenempfänger	Pollendonor
C31	<i>gsda-2 nsh1-1</i>	GK432D08 [KO 28]	SALK083120C [KO 34]
C47	<i>nsh1-2 gsda-2</i>	SM3-39680 [KO 33]	GK432D08 [KO 28]
C68	<i>hgprt-1 gsda-2</i>	GK015E03 [KO 29]	GK432D08 [KO 28]

## 2.1.7 Puffer und Lösungen

### 2.1.7.1 Lösungen für die Herstellung chemokompetenter *Escherichia coli*-Zellen.

**Tabelle 2.16 – Transformationspuffer I und II.**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Transformationspuffer I	30 mM Kaliumacetat; 50 mM MnCl <sub>2</sub> ; 100 mM RbCl <sub>2</sub> ; 10 mM CaCl <sub>2</sub> ; 15 % (v/v) Glycerin, pH 5,8
Transformationspuffer II	10 mM 3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS); 10 mM RbCl <sub>2</sub> ; 75 mM CaCl <sub>2</sub> ; 15 % (v/v) Glycerin; pH 6,5

### 2.1.7.2 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Methoden

**Tabelle 2.17 – Puffer für die transiente Expression in *Nicotiana benthamiana*.**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Infiltrationspuffer	10 mM 2-(N-Morpholino)-ethansulfonsäure (MES, pH 5,6); 10 mM MgCl <sub>2</sub> ; 150 µM Acetosyringon

**Tabelle 2.18 – Puffer für die Herstellung von Proteinrohextrakten aus Pflanzenmaterial.** HEPES: 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure; DTT: Dithiothreitol; EDTA: Ethylendiamintetraacetat

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Extraktionspuffer	100 mM HEPES (pH 8,0); 100 mM NaCl; 15 mM DTT; 5 mM EDTA; 0,5 % Triton X-100

**Tabelle 2.19 – Puffer für die Extraktion und Aufreinigung Strep-markierter Proteine aus *Nicotiana benthamiana*.**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Extraktionspuffer	100 mM HEPES (pH 8,0); 100 mM NaCl; 15 mM DTT; 5 mM EDTA; 0,5 % Triton X-100 ; 100 µg ml <sup>-1</sup> Avidin
Waschpuffer	100 mM HEPES (pH 8,0); 100 mM NaCl; 2 mM DTT; 0,5 mM EDTA; 0,005 % Triton X-100
Elutionspuffer	100 mM HEPES (pH 8,0); 100 mM NaCl; 0,5 mM EDTA; 0,005 % Triton X-100; 10 mM Biotin



**Tabelle 2.20** – Puffer für die Extraktion und Aufreinigung rekombinanter Proteine aus inclusion bodies von *Escherichia coli*.

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Puffer A	50 mM HEPES (pH 8,0); 10 mM NaCl; 5 mM EDTA
Puffer B	20 mM HEPES (pH 7,4); 20 mM NaCl; 5 mM EDTA; 25 % (w/v) Saccharose

**Tabelle 2.21** – **Zusammensetzung eines Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgels.** Tris: Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan; SDS: Natriumdodecylsulfat; APS: Ammoniumperoxodisulfat; TEMED: N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin

<b>Art des Gels</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Trenngel (10 %)	375 mM Tris-HCl (pH 8,8); 10 % (w/v) Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1); 0,1 % (w/v) SDS; 0,075 % (w/v) APS; 0,05 % (w/v) TEMED
Sammelgel (4 %)	125 mM Tris-HCl (pH 6,8); 4 % (w/v) Acrylamid:Bisacrylamid (37,5:1); 0,1 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) APS; 0,1 % (w/v) TEMED

**Tabelle 2.22** – SDS-Probenpuffer.

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Probenpuffer (fünffach konzentriert)	500 mM DTT; 300 mM Tris-HCl (pH 6,8); 50 % (v/v) Glycerin; 10 % SDS; Bromphenolblau (gesättigt)

**Tabelle 2.23** – **Laufpuffer für die Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese.**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Laufpuffer	25 mM Tris-HCl; 192 mM Glycin; 0,1 % SDS

**Tabelle 2.24** – **Zusammensetzung eines porösen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgels (Doucet und Trifaró, 1988).**

<b>Art des Gels</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Trenngel (10 %)	200 mM Tris; 100 mM Glycin; 5 % (v/v) Glycerin; 10 % (w/v) Acrylamid:Bisacrylamid (100:1); 0,4 % (w/v) SDS; 0,1 % (w/v) APS; 0,05 % (w/v) TEMED
Sammelgel (4 %)	70 mM Tris-HCl (pH 6,7); 5 % (v/v) Glycerin; 4 % (w/v) Acrylamid:Bisacrylamid (100:1); 0,4 % (w/v) SDS; 4 mM EDTA, 0,1 % (w/v) APS; 0,1 % (w/v) TEMED

**Tabelle 2.25 – Laufpuffer für poröse Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgele (Doucet und Trifaró, 1988).**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Kathodenpuffer	100 mM Tris-HCl; 150 mM Glycin; 0,1 % SDS
Anodenpuffer	50 mM Tris-HCl; 75 mM Glycin; 0,05 % SDS

**Tabelle 2.26 – Puffer für die Proteinelution aus porösen Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelen.**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Elutionspuffer	1 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7); 0,0005 % SDS

**Tabelle 2.27 – Puffer für Western Blot und Immunodetektion.** TBS: Tris-buffered saline (Tris-gepufferte Salzlösung)

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Transferpuffer	48 mM Tris-HCl (pH 9,2); 0,5 mM SDS; 40 mM Glycin; 20 % (v/v) Methanol
Blockierlösung	5 % Milchpulver in TBS-T
TBS	20 mM Tris-HCl (pH 7,6); 150 mM NaCl
TBS-T	20 mM Tris-HCl (pH 7,6); 150 mM NaCl; 0,1 % Tween20;
Alkalische-Phosphatase-Puffer (AP-Puffer)	100 mM Tris-HCl (pH 9,5); 100 mM NaCl; 5 mM MgCl <sub>2</sub>
BCIP	50 mg ml <sup>-1</sup> 5-Brom-4-Chlor-3-Indoxylphosphat in Dimethylformamid
NBT	50 mg ml <sup>-1</sup> Nitroblau-Tetrazolium in Dimethylformamid

**Tabelle 2.28 – Lösungen für die Färbung von Proteingelen mit Coomassie.**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Färbelösung	3 mM Coomassie Brilliantblau R250; 45 % (v/v) Methanol; 9 % (v/v) Essigsäure
Entfärbelösung	33 % (v/v) Methanol; 7 % (v/v) Essigsäure

**Tabelle 2.29 – Lösungen für die Färbung von Proteingelen mit Colloidal Coomassie.**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Fixierlösung	40 % (v/v) Ethanol, 10 % (v/v) Essigsäure
Colloidal Coomassie-Stammlösung	0,1 % (w/v) Coomassie Brillantblau G250; 10 % (w/v) Ammoniumsulfat; 1 % (v/v) Phosphorsäure
Färbelösung	80 % (v/v) Colloidal Coomassie-Stammlösung; 20 % (v/v) Methanol
Entfärbelösung	25 % (v/v) Methanol

**Tabelle 2.30 – Lösungen für die Färbung von Proteingelen mit Silbernitrat.**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Fixierlösung	30 % (v/v) Ethanol, 15 % (v/v) Essigsäure
Inkubationslösung	4,1 % (w/v) Natriumacetat; 0,2 % (w/v) Natriumthiosulfat-Pentahydrat; 25 % (v/v) Ethanol; 0,5 % (v/v) Glutaraldehyd
Färbelösung	0,1 % (w/v) Silbernitrat; 0,03 % (v/v) Formaldehyd
Entwicklungslösung	20 % (w/v) Natriumcarbonat; 0,03 % (v/v) Formaldehyd
Stopp-Lösung	1,86 % (w/v) Na <sub>2</sub> EDTA

**Tabelle 2.31 – Lösungen für den kolorimetrischen Nachweis der Enzymaktivität.**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Phenolnitroprussidlösung	7 % (w/v) Phenol; 0,34 % (w/v) Natriumpentacyanonitrosylferrat(II)-Dihydrat
Natriumhypochloritlösung	370 mM NaOH; 415 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O; 1 % (v/v) NaOCl

### 2.1.7.3 Lösungen für die Isolierung von Mesophyllzellprotoplasten aus *A. thaliana* Blättern

**Tabelle 2.32 – Lösungen für die Isolierung von Mesophyllzellprotoplasten**

<b>Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Enzymlösung	7 % 20 mM MES (pH 5,7); 0,4 M Mannitol; 20 mM KCl; 1,5 % Cellulase; 0,4 % Macerozym bei 55 °C inkubieren, dann auf RT abkühlen und 10 mM CaCl <sub>2</sub> und 0,1 % BSA hinzufügen
W5-Lösung	2 mM MES (pH 5,7), 154 mM NaCl, 125 mM CaCl <sub>2</sub> , 5 mM KCl

#### 2.1.7.4 Lösung für die histochemische Färbung der Glucuronidase-Aktivität

**Tabelle 2.33 – Lösung für die Färbung der Glucuronidase-Aktivität.** X-Gluc: 5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronsäure

Lösung	Zusammensetzung
GUS-Lösung	50 mM Natriumphosphatpuffer (pH 7,2); 0,2 % (w/v) Triton X-100; 10 mM Ferricyanid, 10 mM Ferrocyanid; 1 mg ml <sup>-1</sup> X-Gluc

#### 2.1.7.5 Puffer und Lösungen für die Metabolitanalytik

**Tabelle 2.34 – Lösungen für die Purinanalytik** TBA-OH: Tetrabutylammoniumhydroxid = Ionenpaar-reagenz

Lösung	Zusammensetzung
alkalische Lösung	5 M KOH; 2 M K <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>
mobile Phase A	10 mM Ammoniumacetat; 10 mM TBA-OH; pH 6.5
mobile Phase B	10 mM TBA-OH in Methanol

**Tabelle 2.35 – Lösungen für die Aminosäureanalytik** OPA: o-Phthalaldehyd, FMOC: 9- Fluorenylmethoxycarbonylchlorid

Lösung	Zusammensetzung
Extraktionslösung 1	80 % Ethanol in 10 mM HEPES-KOH pH 7,0
Extraktionslösung 2	50 % Ethanol in 10 mM HEPES-KOH pH 7,0
Extraktionslösung 3	10 mM HEPES-KOH pH 7,0
Boratpuffer	400 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pH 10,2
OPA	10 mg ml <sup>-1</sup> OPA; 10 mg ml <sup>-1</sup> 3- Mercaptopropionsäure; 400 mM Boratpuffer, pH 10,2)
FMOC	2,5 mg ml <sup>-1</sup> FMOC in Acetonitril
<i>injection diluent</i>	100 ml mobile Phase A + 250 $\mu$ l konzentrierte Phosphorsäure
mobile Phase A	10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 10 mM Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> pH 8,2; 0,5 mM NaN <sub>3</sub>
mobile Phase B	Acetonitril : Methanol : Wasser, im Volumenverhältnis 45 : 45 : 10

#### 2.1.8 Software und Datenbanken

Datenanalyse:

Auswertung der quantitativen PCR: Bio-Rad CFX Manager 3.0

Analyse der chlorotischen Blattoberfläche: ImageJ

Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie: Leica LAS AF Lite 2.6.0

Metabolitanalysen: ChemStation

Statistische Analysen: GraphPad Prism 4

Vergleichende Proteinsequenzanalyse und phylogenetische Analyse:

BLASTP: [http : //blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi](http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)

Phytozome: [http : //www.phytozome.net/](http://www.phytozome.net/)

ClustalO: [http : //www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/)

Boxshade: [http : //www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)

Weblogo: [http : //weblogo.berkeley.edu/](http://weblogo.berkeley.edu/)

MEGA5: [www.megasoftware.net](http://www.megasoftware.net)

Lokalisationsvorhersage:

TMHMM Server v. 2.0: [http : //www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/)

TargetP 1.1 Server: [http : //www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/](http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/)

Expressionsanalyse - Microarraydaten:

eFP browser: [http : //bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi](http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi)

Genevestigator: [http : //www.genevestigator.com?](http://www.genevestigator.com?)

CSB.DB: [http : //csbdb.mpimp-golm.mpg.de/](http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/)

ATTED-II: [http : //atted.jp](http://atted.jp)

Expressionsanalyse - Proteomdaten:

pep2pro: [http : //fgcz-pep2pro.unizh.ch/](http://fgcz-pep2pro.unizh.ch/)

AtProteome: [http : //fgcz-atproteome.unizh.ch/](http://fgcz-atproteome.unizh.ch/)

PaxDB: [http : //pax-db.org/](http://pax-db.org/)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 DNA-Extraktion nach Edwards *et al.*, 1991

Blattmaterial wurde in 200 µl Extraktionspuffer (200 mM Tris-HCl (pH 7,5), 200 mM NaCl, 25 mM EDTA) in einer Retschmühle mit 4–8 Stahlkügelchen 2 min bei 25-30 Hz zerkleinert. Nach Zugabe von 10 µl 10 % (w/v) SDS-Lösung und gründlichem Mischen wurden für 3 min bei 10000 g zentrifugiert. 100 µl des Überstandes wurden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und zur Fällung der DNA mit 75 µl Isopropanol gemischt. Nach 3 min Inkubation bei Raumtemperatur (RT) wurde die gefällte DNA bei 10000 g 10 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und das Pellet mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation für 5 min bei 10000 g wurde das Pellet getrocknet und in 100 µl Wasser aufgenommen.

#### 2.2.1.2 RNA-Isolierung und cDNA-Synthese

Die RNA aus Blättern von *A. thaliana* erfolgte nach Chomczynski und Sacchi, 2006. Zu 50 mg homogenisiertem Pflanzenmaterial wurde 1 ml Trisure (Bioline) gegeben, gut vermischt und 10 min bei RT inkubiert. Nach 10 min Zentrifugation bei 4 °C und 12000 g wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 0,2 ml Chloroform versetzt und gut vermischt. Nach 2-3 min Inkubation bei RT folgte Zentrifugation bei 4 °C und 12000 g für 15 min zur Phasentrennung. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 0,5 ml Isopropanol zur RNA-Fällung wurden zugegeben und 10 min bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation bei 4 °C und 12000 g für 10 min wurde die RNA mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und 5 min bei 4 °C und 7500 g zentrifugiert. Nach Trocknung des RNA-Pellets bei RT wurde dieses in 50 µl RNase-freiem Wasser gelöst und anschließend 10 min bei 50-60 °C erhitzt. Zur Qualitätsüberprüfung wurde 1 µl RNA mittels Agarose-Gelelektrophorese auf einem 1 %-igem Gel aufgetrennt. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C, während der Bearbeitung wurde sie auf Eis gehalten.

Zu 20 µl RNA wurden 2 µl RNase-freie DNase (Fermentas) gegeben und bei 37 °C 60 min inkubiert. Durch Zugabe von 2 µl 50 mM EDTA und Inkubation für 10 min bei 65 °C wurde die DNase inaktiviert.

Vor der cDNA-Synthese für qPCR-Experimente wurde die RNA auf mögliche Kontamination mit genomischer DNA überprüft. Dazu wurde mit intronspezifischen Primern eine qPCR durchgeführt. Ein 10 µl-Ansatz enthielt 1 µl RNA, 5 µl 2x Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) und je 0,5 µmol der beiden Primer. Die PCR wurde mit dem Thermocycler Bio-Rad CFX 96 (Bio-Rad) entsprechend der Vorgaben des Power SYBR Green PCR Master Mix‘ durchgeführt. 1 µl genomische DNA diente als Positiv-Kontrolle.

**Tabelle 2.36 – PCR-Programm mit Power SYBR Green.** <sup>C</sup>: Cyclus mit insgesamt 40 Wiederholungen

Schritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95 °C	10 min
Denaturierung <sup>C</sup>	95 °C	15 s
Primerbindung und Amplifikation <sup>C</sup>	60 °C	60 s
Dissoziationskurve	in 0,5 °C Abständen	alle 2 s

Die cDNA-Synthese für semi-quantitative RT-PCR erfolgte für 2 h bei 42 °C mit 1 µg DNase-behandelter RNA. Der 25-µl-Reaktionsansatz enthielt 50 mM Tris-HCl (pH 8,3), 75 mM KCl, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 2 mM dNTP-Mix (0,5 mM je dNTP), 5 µg oligo(dT)-Oligonukleotide und 200 U MMLV, reverse Transkriptase M170 (Promega). Zur Inaktivierung wurde der Reaktionsansatz bei 72 °C 15 min inkubiert. Die cDNA-Synthese für quantitative PCR erfolgte mit dem SuperscriptIII SuperMix (Invitrogen, Karlsruhe) nach Herstellerangaben. Die cDNA 1:1 mit Wasser verdünnt und für qRT-PCRs eingesetzt.

### 2.2.1.3 Semiquantitative PCR

1 µl cDNA wurde in einem 20 µl-Taq-PCR-Ansatz zur Genexpressionsanalyse verwendet. Zur Abschätzung der cDNA-Konzentrationen wurde das Referenzgen *ACTIN2* genutzt und cDNA-Mengen unterschiedlicher Proben entsprechend ihrer Bandenstärke der *ACTIN2*-PCR angepasst. (Primer siehe Tab. 2.7).

### 2.2.1.4 Quantitative PCR

Vor der Genexpressionsanalyse mittels qPCR erfolgten Qualitätskontrollen der synthetisierten cDNA. Hierzu wurde die Expression von *UBIQUITIN10* in einem 10 µl-Ansatz mit 1 µl verdünnter cDNA, 5 µl 2x Power SYBR Green PCR Master Mix und je 0,5 µmol der beiden Primer mit 2 technischen Replikaten pro Probe überprüft. Die PCR wurde mit dem Thermocycler Bio-Rad CFX 96 (Bio-Rad, München) durchgeführt (Programm siehe Tab. 2.36). Nach Anpassung aller cDNAs auf einen *UBIQUITIN10*-Cq-Wert von ca. 19,5 erfolgte die Überprüfung der Transkriptionseffizienz mit Oligonukleotiden für das GAPDH 3'-Ende bzw. GAPDH 5'-Ende. Nur cDNA mit einer Differenz kleiner als 1,5 zwischen 3'- und 5'-Cq-Wert wurde weiter analysiert. Die Expression der GSDA wurde mit je 1 µl cDNA wie im oben beschriebenen Ansatz mit entsprechenden Primern (Tab. 2.8) durchgeführt. Pro Experiment wurden 3 biologische Replikate mit je 2 technischen Replikaten pro Genotyp analysiert. Die Spezifität der PCR-Reaktion wurde durch Analyse der PCR-Produkt-Dissoziationskurven überprüft. Auswertung der qPCR erfolgte mit dem Bio-Rad CFX Manager 3.0 (Bio-Rad) mit *UBIQUITIN10* als Referenzgen.

### 2.2.1.5 Polymerasekettenreaktion(PCR) nach Mullis *et al.*, 1986

Die PCR diente der Amplifikation von DNA-Fragmenten aus pflanzlicher cDNA, genomischer DNA oder Plasmid-DNA. Dabei wurden die DNA-Polymerasen Taq (laboreigene Herstellung) oder Phusion High-Fidelity (New England Biolabs) verwendet. Die Spezifität des Amplifikats wurde durch Oligonukleotide, am 3'- und 5'-Ende des gewünschten Amplifikats bindend, gewährleistet. Der 20 µl-Taq-PCR-Ansatz enthielt 1 µl Taq-DNA-Polymerase, 4 µl „5x Green GoTaq Flexi Reaktionspuffer“ (Promega), 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,200 mM je dNTP, 0,2 µM jedes Primers und eine variable Menge DNA. Der 20 µl Phusion-PCR-Ansatz enthielt 2,5 U DNA-Polymerase, 1x Reaktionspuffer, 0,20 mM je dNTP, 0,2 µM jedes Primers und eine variable Menge DNA. Tabelle 2.37 gibt den Ablauf eines PCR-Programms wieder.

**Tabelle 2.37 – Allgemeines PCR-Programm.** <sup>C</sup>: Cyclus mit insgesamt 30 - 40 Wiederholungen

Schritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95 °C	10 min
Denaturierung <sup>C</sup>	95 °C	15 s
Primerbindung <sup>C</sup>	abhängig vom Primerpaar	60 s
Amplifikation <sup>C</sup>	72 °C	Taq: 1 min / 1000 bp; Phusion: 30 s / 1000 bp
Amplifikation	72 °C	10 min

### 2.2.1.6 Restriktionsklonierung

Die Klonierungen wurden mit Standardmethoden wie PCR, Gelelektrophorese, Restriktionsverdau und Ligation durchgeführt. Die PCR wurde durchgeführt wie in 2.2.1.5 beschrieben. Die dabei genutzten Primer sind in 2.1.5 aufgelistet. Die DNA wurde in einem 1 %igen Agarosegel aufgetrennt und daraus mithilfe des High Pure PCR Cleanup Micro Kits (Roche) entsprechend dem Herstellerprotokoll aufgereinigt. Die Restriktionsverdaue wurden mit Enzymen von New England Biolabs durchgeführt. Für die Dephosphorylierung von Vektoren wurde die Antarktische Phosphatase und für Ligationen die T4 DNA Ligase verwendet (beides New England Biolabs). Dabei wurden die jeweiligen Herstellerangaben befolgt. Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *E. coli* erfolgte mit dem GenJet Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) nach Herstellerangaben. Sequenzierung von 300–600 ng Plasmid-DNA oder ca. 30 ng PCR-Produkt erfolgte bei GATC oder Seqlab.

### 2.2.1.7 Mutagenese-PCR

Mithilfe mutagener Primer (Tab. 2.11 und 2.12) wurden Varianten der GSDA und der GDA hergestellt. Ein 50 µl Pfu-PCR-Ansatz mit 2,5 U Pfu-DNA-Polymerase; Pfu-Reaktionspuffer (Roboklon); 0,48 mM dNTP-Mix (0,12 je dNTP); 0,25 µM je Oligonukleotid und 20-50 ng Plasmid-DNA wurde hergestellt. Das Programm für die Mutagenese-PCR ist in Tabelle 2.38 dargestellt.



**Tabelle 2.38 – Mutagenese PCR-Programm.** <sup>C</sup>: Cyclus mit insgesamt 18 Wiederholungen

Schritt	Temperatur	Zeit
Denaturierung	95 °C	3 min
Denaturierung <sup>C</sup>	95 °C	30 s
Primerbindung <sup>C</sup>	55 °C	30 s
Amplifikation <sup>C</sup>	68 °C	1 min / 1000 bp
Amplifikation	68 °C	10 min

Die DNA wurde nach der PCR mit 10 U des Restriktions-Enzyms DpnI für 1 h bei 37 °C inkubiert. 3 µl des DpnI behandelten PCR-Ansatzes wurde in DH10B-Zellen transformiert.

## 2.2.2 Mikrobiologische Methoden

### 2.2.2.1 Herstellung chemokompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Zellen einer Glycerinkultur wurden aus einer LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde eine Einzelkolonie für die Inokulation von 5 ml CR-Medium genutzt. Die Zellen wurden bei 37 °C und unter Schütteln bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 angezogen. Anschließend wurden 1,5 ml dieser Kultur für 3 min bei 2000 g zentrifugiert, das Pellet in frischem CR-Medium resuspendiert und für die Inokulation von 100 ml CR-Medium genutzt. Nach erneuter Inkubation bei 37 °C und unter Schütteln, wurden die Zellen bei Erreichen einer OD<sub>600</sub> von 0,5 - 0,6 zunächst für 5 min auf Eis abgekühlt und anschließend durch Zentrifugation für 10 min bei 2 000 g und 4 °C geerntet. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. Das Bakterienpellet wurde in 60 ml Transformationspuffer I (2.1.7, Tab. 2.16) aufgenommen, für 5 min auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert. Nach Resuspension des Bakterienpellets in 4 ml Transformations-puffer II (2.1.7, Tab. 2.16) wurden die Zellen für 15 min auf Eis inkubiert und anschließend jeweils 50 µl-Aliquots in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### 2.2.2.2 Hitzeschocktransformation kompetenter *Escherichia coli*-Zellen

Für die Transformation wurden 50 µl chemokompetenter *E. coli*-Zellen wurde mit circa 50 ng Plasmid-Lösung oder 2-5 µl eines Ligationsansatzes versetzt und für 10 min auf Eis inkubiert. Danach folgte 45 s Hitzeschock bei 42 °C und sofortiges Abkühlen auf Eis für zwei Minuten. Nach Zugabe von 1 ml LB-Medium und circa 60 min Inkubation unter Schütteln bei 37 °C wurden die Zellen bei 1500 g für 3 Minuten zentrifugiert. Das Medium wurde entfernt und das Bakterienpellet in 50 µl LB-Medium resuspendiert. Dieser Ansatz wurde auf LB-Agarplatten (mit entsprechendem Antibiotikum) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

### **2.2.2.3 Anzucht von *Escherichia coli*-Zellen**

Für das Wachstum auf festem Medium wurden *E. coli*-Zellen auf LB-Agarplatten (mit dem entsprechenden Antibiotikum) ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Zur Vervielfältigung von Plasmiden wurden *E. coli*-Zellen in Flüssigmedium angezogen. Dazu wurde das gewünschte Volumen LB-Medium mit einem Antibiotikum versetzt und mit einer Einzelkolonie angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C über Nacht und unter Schütteln.

### **2.2.2.4 Herstellung von *Escherichia coli*-Glycerinkulturen**

Glycerinkulturen von *E. coli* wurden in 2 ml Schraubdeckelgefäßen hergestellt. Hierzu wurden 500 µl einer frischen Übernachtskultur entnommen, mit 500 µl Glycerinlösung (50 %) vermischt und bei -80 °C gelagert.

### **2.2.2.5 Herstellung elektrokompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen**

Zwei Vorkulturen bestehend aus 12 ml YEB-Medium und den entsprechenden Antibiotika wurden jeweils mit einer Einzelkolonie (von einer Agarplatte) inokuliert und über Nacht bei 28 °C und unter Schütteln inkubiert. Am nächsten Tag wurden beide Vorkulturen vereinigt und 10 ml der Mischung für die Inokulation von zwei 200 ml YEB-Medium genutzt. Die Antibiotika wurden dabei in halber Konzentration, verglichen mit den Vorkulturen, eingesetzt. Die Bakterien wurden bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,6 angezogen, in acht vorgekühlte Zentrifugenröhrchen (50 ml) überführt und auf Eis abgekühlt. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 3000 g wurde jeweils der Überstand entfernt und das Pellet in 50 ml eiskaltem sterilem Wasser resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Überstände verworfen, die Pellets in jeweils 25 ml eiskaltem sterilem Wasser resuspendiert und je zwei Ansätze vereinigt. Die verbleibenden vier Röhrchen wurden nochmals zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Bakterien, nach Entfernen der Überstände, jeweils in 4 ml eiskalter steriler Glycerinlösung (10 %) resuspendiert, je 2 Ansätze in einem 15 ml Röhrchen zusammengeführt und erneut zentrifugiert. Im Anschluss wurden ein letztes Mal die Überstände abgenommen, die Pellets nochmals in eiskalter steriler Glycerinlösung (10 %) und beide Ansätze vereinigt. Von der Bakterienlösung wurden jeweils 40 µl-Aliquots in vorgekühlte Reaktionsgefäße überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### **2.2.2.6 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen**

Ein 40 µl-Aliquot elektrokompetenter *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen wurde auf Eis aufgetaut und parallel einer Elektroporationsküvette vorgekühlt. Anschließend wurden circa 50 ng Plasmid-DNA zu den Zellen gegeben und der Ansatz mit der Pipettenspitze gemischt. Der Elektroporator wurde auf 2.5kV, 400 Ω und 25 µF eingestellt, die Zellen in die Küvette pipettiert und elektroporiert. Nach sofortiger Zugabe von 900 µl YEB-Medium wurden die Zellen bei 28 °C vermehrt. Nach 30

min wurden 5-10 µl der Kultur auf einer YEB-Agarplatte ausgestrichen. Diese wurde für 2-4 Tage bei inkubiert.

#### **2.2.2.7 Anzucht von *Agrobacterium tumefaciens*-Zellen**

*Agrobacterium tumefaciens*-Kulturen wurden in YEB-Medium mit entsprechenden Antibiotika angezogen. Für Wachstum auf YEB-Agar-Platten wurde dem Medium 1,5 % (w/v) Agar zugesetzt. Die Bakterien wurden auf YEB-Agarplatten 2-3 Tage bei 28 °C inkubiert, die Anzucht in Flüssigkultur erfolgte durch Inokulation mit mehreren Impfösen Bakterienmaterial über Nacht bei 28 °C und unter Schütteln.

#### **2.2.2.8 Herstellung von *Agrobacterium tumefaciens*-Glycerinkulturen**

Glycerinkulturen von *A. tumefaciens* wurden in 2 ml Schraubdeckelgefäßen hergestellt. Hierzu wurde 1 ml einer frischen Übernachtskultur entnommen und 3 min bei 2000 g zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Bakterienpellet in weiteren 500 µl der Übernachtskultur resuspendiert. Dies diente der Erhöhung der Zellanzahl in der Dauerkultur. Nach Zugabe von 500 µl Glycerinlösung (50 %) wurde der Ansatz gemischt und bei -80 °C gelagert.

### **2.2.3 Proteinbiochemische Methoden**

#### **2.2.3.1 Herstellung eines spezifischen Antiserums**

Der *Escherichia coli*-Stamm BL21 wurde für die Proteinüberexpression genutzt. Dazu wurden Zellen eingesetzt, die zuvor mit dem entsprechenden Plasmid (X9) transformiert wurden. Zunächst wurde eine Übernachtskultur hergestellt, mit der am nächsten Tag viermal 50 ml LB-Medium (mit Kanamycin) inokuliert wurden, dabei wurde eine OD<sub>600</sub> von 0,03 eingestellt. Die Zellen wurden unter Schütteln bei 37 °C inkubiert. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bis 0,6 wurde durch Zugabe von Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) die Expression des rekombinanten Proteins induziert. Dabei betrug die Endkonzentration von IPTG im Medium 1 mM. Drei Stunden nach der Induktion wurden die Zellen durch Zentrifugation für 15 Minuten bei 10000 g und 4°C geerntet.

Zunächst wurde das Gewicht der Bakterienpellets ermittelt. Anschließend wurden sie mit Puffer A (2.1.7, Tab. 2.20) versetzt, dabei wurde ein Verhältnis von 3 ml Puffer pro Gramm Bakterienpellet eingehalten. Nach Zugabe von 4-(2-Aminoethyl)-benzonsulfonylfluorid (AEBSF) zu einer Endkonzentration von 200 µM wurde die Zellen resuspendiert, mit 15 µl Lysozym (50 mg ml<sup>-1</sup>) pro Gramm Zellen versetzt, 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend fünfmal für 10 s mit Ultraschall behandelt (Ultraschallsonde: Branson sonifier 150, Stufe: 2). Nach anschließender, 30-minütiger Zentrifugation bei 20000 g und 4 °C wurden die Überstände verworfen und die Pellets für die weitere Prozessierung genutzt.

Da der größte Anteil des rekombinanten Proteins in unlöslicher Form vorlag, wurde ein *inclusion body*-Aufreinigungsprotokoll angewendet. Die, nach dem Zellaufschluss, vorliegenden Pellets wurden gewogen und mit 3 ml mg<sup>-1</sup> Puffer B (2.1.7; Tab. 2.20) versetzt. Nach Zugabe von AEBSF (Endkonzentration: 200 µM) und Triton X-100 (10 µl pro ml Puffer B), wurden die Pellets resuspendiert und für 20 min bei 20000 g und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und das Pellet erneut in Puffer B, AEBSF und Triton X-100 resuspendiert und zentrifugiert. Dieser Schritt wurde nochmals wiederholt. Die gewaschenen *inclusion bodies* wurden in 500 µl SDS-Probenpuffer (hergestellt aus fünfmal konzentrierter Lösung: 2.1.7, Tab. 2.22) resuspendiert.

Für die weitere Aufreinigung des Proteins wurden die gewaschenen *inclusion bodies* in einem SDS-Polyacrylamidgel mit einer Lauflänge von 14 cm aufgetrennt. Dazu wurde das Vertical Double Gel System PerfectBlue<sup>TM</sup> von Biorad genutzt. Nach der Elektrophorese sollte die gewünschte Bande aus dem Gel ausgeschnitten und das Protein daraus eluiert werden. Um dies zu erleichtern wurde ein poröses Gel genutzt (Doucet und Trifaró, 1988). Das Trenn- und Sammelgel wurden in der entsprechenden Zusammensetzung hergestellt (2.1.7; Tab. 2.24). Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde dieses in das Gelsystem eingesetzt und mit den Proben beladen. Anschließend wurden die Pufferkammern mit Kathoden- und Anodenpuffer (2.1.7; Tab. 2.25) befüllt und die Elektrophorese gestartet.

Um die gewünschte Proteinbande aus dem porösen Gel schneiden zu können, wurde sie zunächst reversibel gefärbt. Dazu wurde das Gel für wenige Minuten in kalter Natriumacetatlösung (4 M) inkubiert (Higgins und Dahmus 1978). Sobald die weiße Färbung der Bande sichtbar war, wurde dies mit einem Skalpell aus dem Gel und anschließend in kleine Stücke geschnitten. Diese wurde in ein 15 ml Reaktionsgefäß überführt und mit Elutionspuffer versetzt (2.1.7; Tab. 2.26). Dabei wurden für 2 ml Gelstücke 10 ml Puffer verwendet. Nach 36-stündiger Inkubation bei Raumtemperatur und unter Schütteln, gefolgt von der Sedimentation der Gelstücke, wurde der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Die Proteinlösung wurde lyophilisiert und das entstehende Pulver in 500 µl sterilem Wasser aufgenommen. Die Reinheit und die Konzentration des eluierten Proteins wurden mithilfe eines SDS-Gels überprüft.

Reine und ausreichend konzentrierte Proteinlösung wurde an die Firma Biogenes (Berlin) geschickt und dort für zur Immunisierung von Hasen verwendet. Das daraus resultierende polyklonale Antiserum wurde, mit positivem Ergebnis, auf die Detektion des Kandidatenproteins getestet.

### 2.2.3.2 Proteinexpression in *Nicotiana benthamiana*

Zur transienten, Agrobakterien-vermittelten Proteinexpression in *N. benthamiana* wurden Glycerinkulturen der Agrobakterien mit dem gewünschten Expressionskonstrukt auf YEB-Agarplatten mit den entsprechenden Antibiotika ausgestrichen und für 3 Tage bei 28 °C inkubiert. Diese Bakterien wurden für die Inokulation von 12 ml YEB-Flüssigmedium (mit Antibiotika) verwendet. Die Zellen wurden für 16 h bei 28 °C und unter Schütteln inkubiert. Zusätzlich wurde ein Agrobakterienstamm angezo-

gen, die den *silencing*-Inhibitor p19 exprimieren (Voinnet *et al.*, 2003). Die Bakterien wurden durch 15-minütige Zentrifugation bei 3000 g geerntet und das Pellet vorsichtig in 1 ml Infiltrationspuffer (2.1.7, Tab. 2.17) resuspendiert. Vor der Infiltration wurden die Bakterien mit dem Expressionkonstrukt mit denen gemischt, die den *silencing*-Inhibitor exprimierten. Dabei wurde eine OD<sub>600</sub> von 0,5 für die Bakterien mit dem Expressionkonstrukt und von 0,25 für die mit dem *silencing*-Inhibitor eingestellt. Nach 2-3 Stunden Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Bakterienlösung mithilfe einer Spritze in den apoplastischen Raum von *N. benthamiana*-Blättern infiltriert. Nach 3-5 Tagen wurden die Blätter für die Proteinextraktion oder die konfokalmikroskopische Analyse verwendet.

### 2.2.3.3 Proteinextraktion und Aufreinigung nach transienter Expression

Für die Extraktion transient exprimierter Protein wurden 750 mg Blattmaterial geerntet, mit 1,5 ml Extraktionspuffer (2.1.7, Tab. 2.19) versetzt und mit einem Mörser aufgeschlossen. Nach 15-minütiger Zentrifugation bei 20000 g und 4 °C, wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt, 40 µl StrepTactin Macroprep (50 % Suspension, IBA) hinzugeben und für 10 min bei 4 °C auf einem Rotationsrad inkubiert. Während dieses Schritts wurden die StrepII-markierten Proteine an die Matrix gebunden. Als Nächstes wurde die Matrix durch Zentrifugation für 30 s bei 700 g vom Überstand abgetrennt und dieser verworfen. Durch Resuspendieren in 500 µl Waschpuffer (2.1.7, Tab. 2.19) und anschließende Zentrifugation für 30 s bei 700 g, wurden die, an die Matrix gebundenen, Proteine gewaschen. Dieser Schritt wurde noch viermal wiederholt. Die Elution erfolgt in zwei Schritten. Dazu wurden 75 µl Elutionspuffer (2.1.7, Tab. 2.19) zum Matrixpellet gegeben, 5 min bei 4 °C inkubiert und der Überstand nach 30-sekündiger Zentrifugation bei 700 g in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe eines zweiten 75 µl-Aliquots Elutionspuffer gefolgt von Inkubation und Zentrifugation wurden beide Überstände vereinigt, in 50 µl-Aliquots aufgeteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -20 °C gelagert

### 2.2.3.4 Enzymaktivitätsmessung

Für die Analyse der Enzymaktivität (GSDA und GDA) wurde eine aufgereinigte Proteinlösungen 2.2.3.3 zusammen mit dem entsprechenden Substrat eingesetzt. Die verschiedenen Substrate wurden in einer Konzentration von 2 mM in Waschpuffer gelöst (2.1.7, Tab. 2.19). Je Reaktion wurden 25 µl Substrat mit 10 µl Proteinlösung bei 40 °C inkubiert. Zum Nachweis der enzymatisch freigesetzten Ammoniumionen, wurden zu bestimmten Zeitpunkten Proben (10 µl) aus dem Reaktionsansatz entnommen, in ein neues Reaktionsgefäß mit 90 µl Wasser überführt und mit 25 µl Phenolnitroprussidlösung sowie 50 µl Natriumhypochloritlösung (2.1.7, Tab. 2.31) versetzt. Der Detektionsansatz wurde für 15 min bei 50 °C inkubiert und anschließend für die photometrische Analyse bei 639 nm genutzt. Mit Hilfe einer Ammoniumstandardreihe (verschieden konzentrierte NH<sub>4</sub>Cl-Lösungen) konnte die Aktivität berechnet werden.

Die enzymkinetischen Parameter wurden mithilfe mehrere Substratkonzentrationen bestimmt. Für

Guanosin wurden 0,1; 0,2; 1,0 und 4,0 mM eingesetzt. Bei 2'-Deoxyguanosin waren es 0,12; 0,24; 0,48; 1,2 und 7 mM. Mögliche Aktivatoren und Inhibitoren wurden in einer Konzentration von 1 mM in Waschpuffer gelöst. Die entsprechenden Reaktionsansätze enthielten 20 µl ein 0,75 mM Guanosinlösung sowie 15 µl des jeweiligen Effektors und 15 µl Proteinlösung.

### **2.2.3.5 Proteinkonzentrationsbestimmung**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde in den meisten Fällen mit dem Bio-Rad Protein Assay® (Bio-Rad) nach Herstellerangaben durchgeführt. Für Proteinlösungen die zur enzymkinetischen Analyse verwendet wurden, wurde die Konzentration mit dem NanoOrange Protein Quantitation Kit (Molecular Probes - Invitrogen) durchgeführt. Hier wurde ebenfalls entsprechend der Anweisung verfahren.

### **2.2.3.6 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese**

In dieser Arbeit wurden 10 %-ige Trenngele und 5 %-ige Sammelgele verwendet. Die Proteinextrakte wurden mit 20 % fünfmal konzentrierten SDS-Ladepuffer versetzt und anschließend bei 95 °C 5 min inkubiert. Nach dem Auftragen der Proben auf das Gel erfolgte die Auftrennung der Proteine bei einer Spannung von 80-100 V im Sammelgel und von 160 V im Trenngel im Laufpuffer. Alle Puffer und Lösungen siehe [2.21](#), [2.22](#), [2.23](#).

### **2.2.3.7 Coomassie-Färbung**

Die Färbung der Polyacrylamidgele erfolgte 60 min in Coomassie-Färbelösung auf einem Horizontalschüttler. Anschließend wurden die Gele mehrere Stunden mit Entfärbelösung entfärbt. Lösungen siehe [2.28](#).

### **2.2.3.8 Colloidal Coomassie-Färbung**

Die Gele wurden für 30 min in Fixierlösung inkubiert und anschließend für 3-4 h in Colloidal Coomassie-Färbelösung geschüttelt. Danach wurden die Gele mit Entfärbelösung entfärbt. Lösungen siehe [2.29](#).

### **2.2.3.9 Silbernitratfärbung**

Für die Silbernitratfärbung wurden ein Gel zunächst für 30 min fixiert und anschließend für 30 min in der Inkubationslösung geschüttelt. Nach dreimaligem Waschen des Gels für je 10 Minuten mit destilliertem Wasser, wurde es für 30 Minuten in der Färbelösung inkubiert. Danach wurde es 2 Mal kurz mit destilliertem Wasser gewaschen und bis zum gewünschten Grad der Färbung in der Entwicklungslösung belassen. Mithilfe der Stopplösung wurde der Färbeprozess beendet. Lösungen siehe [2.30](#).

### 2.2.3.10 Western Blot und Immunodetektion

Der Proteintransfer auf eine Nitrocellulose-Membran (Hybond<sup>TM</sup>-ECL) erfolgte für 1 h bei 100 V im Transferpuffer 2.27. Das Gel und die Membran wurden beidseitig von Whatman-Papier und einem Schwamm umschlossen.

Nach dem Western Blot wurde die Membran 1 h in 20 ml Blockierlösung inkubiert und anschließend 2x 5 min mit je 10 ml TBS-T-Puffer gewaschen.

Die Detektion StrepII-markierter Proteine erfolgte mit dem Strep-Tactin-AP(Alkalische Phosphatase)-Konjugat (IBA). Hierzu wurde, nach 10 min Vorinkubation mit 10 ml 2 µg/ml Avidin in TBS-T, das Strep-Tactin-AP-Konjugat 1:4000 direkt zu der Lösung gegeben und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde 2x 5 min mit TBS-T und 5 min mit TBS gewaschen. Detektion der AP-Reaktion erfolgte in 10 ml AP-Puffer mit 33 µl BCIP und 66 µl NBT als Substrate der Alkalischen Phosphatase.

Zum Nachweis des YFP-Fusionsproteins wurde die Membran nach dem Blockieren mit 10 ml TBS-T mit 1:10 000 anti-GFP IgG (Roche) als erstem Antikörper 1 h bei RT inkubiert. Nach 3x Waschen in TBS-T für je 10 min erfolgte Inkubation mit 10 ml TBS-T 1: 20 000 anti-Maus IgG AP-Konjugat (Sigma) 1 h bei RT. Die Detektion der AP-Aktivität wurde wie im Fall der StrepII-Proteindetektion beschrieben durchgeführt.

Zur spezifische Detektion der GSDA, wurde die Membran nach dem Blockieren mit mit 10 ml TBS-T mit 1:500 Antiserum 1 h bei RT inkubiert. Nach 3x Waschen in TBS-T für je 10 min erfolgte Inkubation mit 10 ml TBS-T 1: 10 000 anti-Hase IgG AP-Konjugat (Sigma) 1 h bei RT. Die Detektion der AP-Aktivität wurde wie im Fall der StrepII-Proteindetektion beschrieben durchgeführt. Lösungen siehe 2.27.

## 2.2.4 Anzucht und Analyse von Pflanzen

### 2.2.4.1 Anzucht von *Nicotiana benthamiana*

Samen von *Nicotiana benthamiana* wurden auf Floratonerde (92 % Hochmoortorf; 0,15 % Salzgehalt, pH 5 bis pH 6) ausgesät und für drei Tage bei 4°C stratifiziert. Anschließend wurden sie unter Langtag-Bedingungen im Gewächshaus kultiviert und nach circa fünf Wochen für die transiente Expression verwendet.

### 2.2.4.2 Sterilisation von *Arabidopsis thaliana*-Samen

Bei der Anzucht von *A. thaliana* wurden oberflächensterilisierte Samen verwendet. Die Sterilisation erfolgte durch dreimalige Inkubation in je 1 ml 70 % Ethanol + 0,05 % Tween 20 für 2 min. Zwischen den Inkubationsschritten wurde die jeweilige Lösung entfernt. Anschließend wurden die zweimal Samen wurden in 1 ml 100 % Ethanol gewaschen und danach auf sterilem Whatmann-Papier getrocknet.

#### **2.2.4.3 Anzucht von *Arabidopsis thaliana***

textslArabidopsis thaliana-Pflanzen wurden unter Langtag- (16 h Licht/8 h Dunkelheit) oder Kurztag-Bedingungen (8 h Licht/16 h Dunkelheit) bei 22°C und ca. 55 % Luftfeuchtigkeit angezogen. Die Aussaat erfolgte auf in der Regel auf Mischerde (42,42 % (w/w) Einheitserde P, 42,42 % (w/w) Einheitserde T und 15,16 % (w/w) Perligran). Pflanzen die zur Herstellung von Protoplasten gedacht waren, wurden im Kurztag auf Jiffy7-Erde angezogen. Um ein gleichmäßiges Keimungsverhalten der Samen zu gewährleisten, wurden diese unabhängig von Anzuchtbedingungen nach dem Aussäen 3 Tage bei 4 °C stratifiziert.

#### **2.2.4.4 Stabile Transformation von *Arabidopsis thaliana***

Die stabile Transformation von *A. thaliana* wurde mithilfe der *floral dip*-Methode (Clough und Bent, 1998) durchgeführt. Dazu wurden 200 ml YEB-Medium inklusive der entsprechenden Antibiotika mit einer frischen 20 ml *A. tumefaciens*-Übernachtskultur, das entsprechende Konstrukt enthaltend, angeimpft. Nach 20 h Inkubation bei 28 °C und 180 rpm wurde die Kultur für 15 min bei 3 000 x g zentrifugiert und das Pellet in 200 ml 5 % (w/v)-Saccharose-Lösung mit 0,05 % Silwet L-77 resuspendiert. Blühende Pflanzen wurden mehrmals für einige Sekunden kopfüber in die Bakteriensuspension getaucht und anschließend mit einer Plastiktüte abgedeckt. Nach Inkubation unter reduzierten Lichtbedingungen über Nacht, wurden die Pflanzen ab dem Folgetag unter Langtag-Bedingungen gehalten. Nach der Ernte der Samen wurden diese geerntet und für die Selektion ausgelegt. Als Selektionsmarker für die in dieser Arbeit hergestellten transgenen Linien wurde die Phosphinothricin-Acetyltransferase (PAT) verwendet. Daher wurden Pflanzen der Folgegeneration mit Glufosinat (BASTA) besprüht und überlebende Individuen isoliert. Diese wurden auf die entsprechende Proteinexpression getestet. Anschließend wurden homozygote Pflanzen mit Einzelinsertion isoliert.

#### **2.2.4.5 Keimungsanalysen**

Für die Analyse der Keimung verschiedener Linien, wurden sterilisierte Samen auf 1/2 MS-Agarplatten ausgelegt, 2 Tage bei 4 °C stratifiziert und anschließend im LD bei 22 °C inkubiert. Die Keimung wurde über einen Zeitraum von 23 Tagen mithilfe eines Binokulars beobachtet. Der Zeitpunkt, an dem das Zereißeln des Endosperms zu erkennen war, wurde für jeden Samen einzeln dokumentiert.

#### **2.2.4.6 Isolierung von Mesophyllzellprotoplasten**

Isolierung der Protoplasten erfolgte mit der „Tape-Arabidopsis Sandwich“-Methode (Wu *et al.*, 2009). Dazu wurden die Rosettenblätter 9-11 von 4-5 Wochen alten *A. thaliana*-Pflanzen mit der Blattoberseite auf *Time tape*<sup>R</sup>-Klebeband (Time Med) fixiert. Die Blattunterseite wurde mit *Magic tape*<sup>R</sup>-Klebeband (3 M) bedeckt. Das Blatt befand sich also zwischen beiden Klebenbändern. Durch Ent-



fernen des *Magic tape*<sup>R</sup> wurde die Epidermis der Blattunterseite abgezogen. Anschließend wurden 6 auf *Time tape*<sup>R</sup> fixierte Blätter (ohne untere Epidermis) unter leichtem Schütteln (40 rpm) in 6 ml Enzymlösung (2.1.7.3, Tab. 2.32) inkubiert. Nach 60 min wurde die Enzymreaktion durch Zugabe von 6 ml W5-Lösung (2.1.7.3, Tab. 2.32) gestoppt. Die Protoplasten wurden durch einen Nylonfilter (80 µm Porengröße) filtriert und durch kurze Zentrifugation (1 min) bei 100 g pelletiert. Das Pellet wurde durch leichtes Schütteln in W5-Lösung resuspendiert und die Protoplasten für konfokale Mikroskopie genutzt.

#### 2.2.4.7 Analyse der subzellulären Lokalisation

Für die Analyse der subzellulären Lokalisation wurde YFP-markiertes Protein transient in *N. benthamiana*-Blättern überexprimiert. Diese wurden drei Tage nach der Infiltration an einem Leica True Confocal Scanner SP5 Mikroskop analysiert. Als Kontrolle für die Lokalisation im Cytosol wurde dabei CFP-markierte β-Ureidopropionase koexprimiert. Außerdem wurden Mesophyllzellprotoplasten einer *A. thaliana*-Linie exprimiert, die das YFP-markierte Protein stabil exprimiert. Folgende Anregungs- und Emissionswellenlängen wurden verwendet: YFP = Anregung bei 514 nm; Emission bei 520 nm - 550 nm ; CFP = Anregung bei 488 nm; Emission bei 710 nm - 800 nm; Autofluoreszenz von Chlorophyll = Anregung bei 458 nm; Emission bei 465 nm - 495 nm

#### 2.2.4.8 Analyse der Promotoraktivität

Für die Promotor-Expressionsanalyse mittels GUS-Färbung wurde das Pflanzenmaterial in geeigneten Reaktionsgefäßen mit GUS-Lösung (siehe 2.1.7, Tab. 2.33) überschichtet. Die offenen Reaktionsgefäße wurden im Exsikkator dreimal für jeweils 5 min unter Vakuum gesetzt und anschließend verschlossen über Nacht bei 37 °C im Dunklen inkubiert. Entfärbung und Lagerung bis zur mikroskopischen Analyse erfolgte in 70 % Ethanol.

#### 2.2.4.9 Analyse des Chlorophyll- und Carotinoidgehalts

Für die Analyse des Chlorophyll- und Carotinoidgehalts wurden 30 mg homogenisiertes Blattmaterial in 1,5 ml 80 %-igem Aceton aufgenommen und über Nacht bei 4 °C, im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 20 min bei 14000 g zentrifugiert und der Überstand für die spektrophotometrische Analyse in einem Multiskan GO Spektrophotometer (Thermo Scientific) genutzt. Dabei wurde die Absorption des Extrakts bei 470 nm, 647 nm sowie 664 nm (Lichtenthaler und Buschmann, 2001). Der Gehalt von Chlorophyll a ( $c_a$ ), Chlorophyll b ( $c_b$ ) und Carotinoiden  $c_{(x+c)}$  wurde wie folgt berechnet:  $c_a$  ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) =  $12,25 A_{664} - 2,79 A_{647}$ ;  $c_b$  ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) =  $21,50 A_{647} - 5,10 A_{664}$ ;  $c_{(x+c)}$  ( $\mu\text{g ml}^{-1}$ ) =  $(1000 A_{470} - 1,82 c_a - 85,02 c_b) / 198$   
 Anschließend wurden die Mengen auf das Frischgewicht bezogen und die Summe von Chlorophyll a und b sowie das Verhältnis von Gesamtchlorophyllgehalt zu Carotinoidgehalt berechnet.

#### 2.2.4.10 Analyse des Anthocyangehalts

Der Anthocyangehalt von *A. thaliana*-Blättern wurde bestimmt wie bei Neff und Chory, 1998 beschrieben. Dazu wurden 100 mg homogenisiertes Blattmaterial mit 1 ml angesäuertem Methanol (80 % mit 5 % HCl) versetzt und über Nacht bei 4 °C und im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz für 20 min bei 14000 g zentrifugiert und der Überstand für die spektrophotometrische Analyse in einem Multiskan GO Spektrophotometer (Thermo Scientific) genutzt. Dabei wurde die Absorption des Extrakts bei 535 nm sowie bei 657 nm gemessen. Der Anthocyangehalt wurde mithilfe der Formel  $(A_{535} - 0,25 A_{657})/g_{FG}$  berechnet.

#### 2.2.5 Metabolitanalysen

##### 2.2.5.1 Analyse der Metabolite des Purinnukleotidkatabolismus

Die Zusammensetzungen der alkalischen Lösung sowie der mobilen Phasen A und B sind in Tabelle 2.34 (2.1.7.5) aufgeführt.

##### 2.2.5.1.1 Perchlorsäure-Extraktion

Pflanzenmaterial wurde geerntet und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Vor der Extraktion wurde es unter Stickstoffzugabe gemörsert, das Auftauen wurde möglichst verhindert. Anschließend wurden 100 mg des Materials in 1,5 ml Reaktionsgefäßen abgewogen, auch hier wurde alles mit Stickstoff vorgekühlt. Zur Extraktion wurden 300 µl 0,5 M Perchlorsäure (kalt) hinzugegeben. Mit Hilfe eines Pistills wurde das Pflanzenmaterial aufgeschlossen und anschließend für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde 15 Minuten bei 20000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 15 µl alkalischer Lösung versetzt und 5 Minuten auf Eis inkubiert. Das ausfallende Kaliumperchlorat wurde durch erneute Zentrifugation für 15 Minuten bei 20000 x g und 4 °C abgetrennt. Der Überstand wurde nochmals in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Vor der Analyse in der HPLC wurde die Lösung aufgetaut und ein weiteres Mal zentrifugiert um erneut auftretendes Präzipitat zu entfernen.

Zur Extraktion aus Samen wurden 5 mg in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß eingewogen und mit 100 µl 0,5 M Perchlorsäure versetzt. Der Aufschluss erfolgte mit Hilfe eines elektrisch betriebenen Pistills für eine Minute. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurde für 15 Minuten bei 20000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet mit einem zweiten Volumen von 100 µl 0,5 M Perchlorsäure nochmals aufgeschlossen. Nach erneuter Inkubation und Zentrifugation wurden beide Überstände vereinigt (200 µl) und mit 10 µl alkalischer Lösung. Das ausfallende Kaliumperchlorat wurde durch erneute Zentrifugation für 15 Minuten bei 20000 x g und 4 °C abgetrennt. Der Überstand wurde nochmals in ein neues Reaktionsgefäß überführt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Vor der Analyse in der HPLC wurde die Lösung aufgetaut und ein weiteres Mal zentrifugiert um erneut auftretendes Präzipitat zu entfernen.

### 2.2.5.1.2 Chromatographie

Die Auftrennung, Detektion und Quantifizierung der Metabolite des Purinnukleotidabbaus wurde mit Hilfe eines Agilent 1200 SL HPLC Systems durchgeführt. Im Anschluss an die Injektion von 20 µl Extrakt erfolgte mithilfe von Ionenpaar-Umkehrphasenchromatographie bei 25 °C die Auftrennung der Metabolite. Dazu wurden eine polar-modifizierte Umkehrphasensäule (Polaris 5 C18 A 150 x 4.6 mm ) und ein Ionenpaarreagenz in den mobilen Phasen A und B verwendet. Die Elution erfolgte mit einem binären Gradient aus mobiler Phase A und mobiler Phase B genutzt. Der Gradient begann mit einem Anteil von 4 % mobiler Phase B. Dieser wurde bis 2,5 min gehalten und änderte sich zwischen den Zeitpunkten 4 min; 20,1 min; 6 min; 7 min; 12 min; 15 min; 20 min und 20,1 min zu folgenden Anteilen 10 %, 10 %, 20 %, 40 %, 100 %, 100 % und 4 %. Nach 24 Minuten endete die Analyse. Die Flussrate betrug dabei 0,64 ml min<sup>-1</sup>.

Die eluierenden Metabolite wurden mit einem Diodenarraydetektor (DAD) detektiert bei zwei verschiedenen Wellenlängen detektiert:

- Signal A wurde bei einer Wellenlänge von 254 nm mit einer Bandbreite von 16 nm aufgenommen. Als Referenzwellenlänge diente 280 nm mit 16 nm Bandbreite.
- Signal B wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm mit einer Bandbreite von 16 nm aufgenommen. Als Referenzwellenlänge diente 360 nm mit 100 nm Bandbreite.

Zusätzlich wurde von allen detektierten Signalen (Peaks) das UV-Spektrum im Bereich von 220 nm bis 320 nm aufgenommen.

Für die quantitative Analyse der Metabolite des Purinnukleotidkatabolismus wurden Verdünnungsreihen entsprechender Substanzen hergestellt. Diese wurden jeweiligen Extraktionsprotokoll unterzogen, chromatographisch aufgetrennt und mit der ChemStation Software sowie Microsoft Office Excel ausgewertet.

### 2.2.5.1.3 Fraktionssammlung

Für die Verifizierung der Identität von akkumulierenden Metabolite mithilfe von Massenspektrometrie, mussten diese zunächst aus den entsprechenden Extrakten isoliert werden. Dazu wurde der Fraktionssammler des HPLC-Systems genutzt. Die chromatographische Auftrennung entsprach weitgehend der oben beschriebenen Methode.

Der Anteil von TBA-OH in den mobilen Phasen A und B wurde jedoch auf ein Zehntel verringert. Eine höhere Konzentration stört die Detektion im Massenspektrometer.

Außerdem wurde, für eine Zeitplan-basierte Fraktionssammlung, der Methodenparameter „Fraction Collector: Off“ im Programm ChemStation zu folgendermaßen geändert:

Fraction Collector:

Trigger Mode: Use timetable

Max Peak Duration: 0.5 min

Peak Detector: DAD1 Slope

At least on selected peak detector

Timetable: siehe unten

**Tabelle 2.39 – Beispiel für Zeitplan-basierte Fraktionssammlung.** Die folgenden Einstellungen wurden für die Sammlung des unbekanntes Signals bei 5.9 min verwendet.

	Time	Trigger Mode	Max Peak Duration	# of Fractions	Time slices
1	0.00	Off	-	-	-
2	5.90	Peak-based	0.5	-	-
3	6.20	Off	-	-	-

Die Zeitpunkte wurden an die Retentionszeiten der einzelnen abzusammelnden Metabolite angepasst. Anschließend wurden die Fraktionen für die Massenspektrometrie genutzt.

#### 2.2.5.1.4 Massenspektrometrie

Die massenspektrometrische Analyse wurde in der „Massenspektrometrie - Core Facility“ der Freien Universität Berlin von Dr. Andreas Springer und Mitarbeitern durchgeführt. Dabei wurde Elektrospray-Ionisationsquelle gekoppelt mit einem Flugzeitdetektor (Agilent 6210 ESI -TOF) verwendet. Die Flussrate betrug  $4 \mu\text{l min}^{-1}$  und die Sprayspannung 4 kV. Das Desolvatisierungsgas wurde auf 15 psi (1 bar) gesetzt. Alle anderen Parameter wurden für eine maximale Abundanz des jeweiligen  $[\text{M}+\text{H}]^+$  (positiver Modus) beziehungsweise  $[\text{M}-\text{H}]^-$  (negativer Modus) optimiert.

#### 2.2.5.2 Aminosäureanalyse

Die Zusammensetzungen aller für die Aminosäureanalytik verwendeten Lösungen sind in Tabelle 2.35 (2.1.7.5) aufgeführt.

##### 2.2.5.2.1 Ethanolische Extraktion

Zur Analyse der Aminosäurezusammensetzung wurden Extrakte mit Hilfe einer Ethanol-Wasser-Extraktion hergestellt (Geiger *et al.*, 1998). Gefrorenes Pflanzenmaterial wurde in einem Mörser unter Stickstoffzugabe pulverisiert. Anschließend wurden je 30 mg gefrorenes Pulver in 1,5 ml Reaktionsgefäße eingewogen. Für die absolute Quantifizierung der Aminosäuren wurden  $50 \mu\text{l}$  einer  $500 \mu\text{M}$  Lösung eines internen Standards hinzugeben. Die eigentliche Extraktion erfolgte in vier sequentiellen Schritten bei  $70 \text{ }^\circ\text{C}$ , mit vier Minuten Inkubationszeit für jeden Schritt unter Benutzung verschiedener Extraktionslösungen. Im ersten Schritt wurden  $112,5 \mu\text{l}$  Extraktionslösung 1 hinzugegeben und nach Inkubation durch fünfminütige Zentrifugation bei Raumtemperatur und  $14000 \times g$  vom Pellet

abgetrennt. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet mit einem zweiten Volumen von 112,5 µl Extraktionslösung 1 versetzt. Nach erneuter Inkubation und Zentrifugation wurden in den folgenden zwei Extraktionsschritten zunächst Extraktionslösung 2 und dann Extraktionslösung 3 eingesetzt. Die Überstände der vier Extraktionsschritte wurden vereinigt und zur Aminosäureanalyse mittels HPLC genutzt.

### 2.2.5.2.2 Chromatographie

Die Auftrennung, Detektion und Quantifizierung der Aminosäuren wurde mit Hilfe eines Agilent 1200 SL HPLC Systems durchgeführt. Als Grundlage diente die Agilent Gebrauchsanweisung 5990-4547 EN. Zur Erhöhung der Spezifität sowie Sensitivität der Messung wurden die Aminosäuren vor der Auftrennung derivatisiert. Für primäre Aminosäuren wurde dazu o-Phthalaldehyd (OPA) genutzt und für sekundäre Aminosäuren 9-Fluorenylmethoxycarbonylchlorid (FMOC) genutzt. Diese Reagenzien ermöglichen eine Detektion der Aminosäuren mittels Fluoreszenzmessung.

Die Derivatisierung wurde mit Hilfe des programmierbaren automatischen Probengebers durchgeführt. Das entsprechende Protokoll ist in Tabelle 2.40 beschrieben.

**Tabelle 2.40 – Derivatisierungsprotokoll für die Aminosäureanalyse.**

Schritt	Aktion
1	Sauge 2,5 µl aus der Boratpuffer-Flasche an.
2	Sauge 1,0 µl aus der Probenflasche an.
3	Mische 3,5 µl fünfmal.
4	Warte 0,2 min.
5	Sauge 0,5 µl aus der OPA-Flasche an
6	Mische 4,0 µl zehnmals mit maximaler Geschwindigkeit.
7	Sauge 0,4 µl aus der FMOC-Flasche an.
8	Mische 4,4 µl zehnmals mit maximaler Geschwindigkeit.
9	Sauge 32 µl aus der <i>injection diluent</i> -Flasche an.
10	Mische 20 µl achtmal.
11	Injiziere.
12	Warte 0,1 min.
13	Stelle das Ventil auf Nebenfluss.

Im Anschluss an die Injektion wurden die derivatisierten Proben auf einer Umkehrphasensäule (ZORBAX Eclipse Plus C18; 3,0 x 150, 3,5 µm) bei 40 °C aufgetrennt. Zu diesem Zweck wurde ein binärer Gradient aus mobiler Phase A und mobiler Phase B genutzt. Der Gradient begann mit einem Anteil von 2 % mobiler Phase B. Dieser wurde bis 0,5 min gehalten und ändert sich zwischen den Zeitpunkten 20 min; 20,1 min; 23,5 min und 23,6 min zu folgenden Anteilen 57 %, 100 %, 100 % und 2 %. Nach 25 Minuten endete die Analyse. Die Flussrate betrug dabei 0,64 ml min<sup>-1</sup>.

Die eluierenden Aminosäuren wurden mit einem Diodenarraydetektor (DAD) und einem Fluoreszenzdetektor (FLD) detektiert. Das DAD-Signal wurde bei einer Wellenlänge von 338 nm mit einer Bandbreite von 10 nm aufgenommen. Als Referenzwellenlänge diente 390 nm mit 20 nm Bandbreite. Das FLD-Signal wurde zunächst bei 450 nm Emissionswellenlänge aufgenommen (Exitation mit 340 nm). Nach 18 Minuten wurde die Emission bei 305 nm detektiert (Exitation mit 266 nm) um die sekundären Aminosäuren messen zu können.

Für die quantitative Analyse wurde ein Aminosäurestandard von Sigma Aldrich (AAS18) genutzt. Diesem wurden Asparagin, Glutamin, Tryptophan, Citrullin und Ornithin (Applichem) hinzugegeben. Die resultierende Standardlösung diente der Identifizierung und Quantifizierung der Aminosäuren in der Probenlösung. Zusätzlich wurde als interner Standard eine Lösung von Norvalin und Sacrosin genutzt und sowohl zu den Standardlösungen als auch zu den Probenlösungen gegeben (siehe Extraktion). Die Kalibriergeraden wurden mit Hilfe der Agilent Chemstation Software erstellt. Als Basis diente die Messung vier verschiedener Aminosäurestandardkonzentrationen (9  $\mu\text{M}$ ; 22,5  $\mu\text{M}$ ; 90  $\mu\text{M}$  und 225  $\mu\text{M}$ ) die jeweils 40  $\mu\text{M}$  internen Standard enthielten.

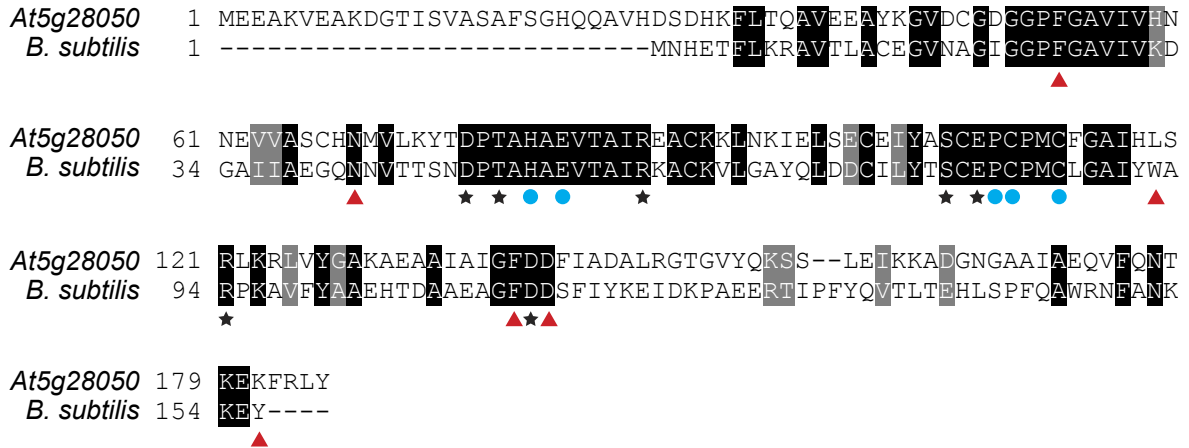
# Ergebnisse

## 3.1 Suche nach einer Guanindeaminase in *Arabidopsis thaliana*

Der Ausgangspunkt dieser Doktorarbeit war die Hypothese, dass am Purinnukleotidabbau von *Arabidopsis thaliana* eine Guanindeaminase beteiligt ist. Aus diesem Grund sollte zunächst ein entsprechendes Gen identifiziert und im Anschluss das Protein biochemisch und physiologisch charakterisiert werden.

Zur Identifizierung eines geeigneten Kandidaten wurden Vergleiche zwischen Aminosäuresequenzen bekannter Guanindeaminasen und den Proteinen von *A. thaliana* durchgeführt. Dazu wurde der BLASTP-Algorithmus genutzt. Als Basis für die Sequenzvergleiche dienten die Guanindeaminasen von *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*. Das *E. coli*-Enzym zählt zur Familie der Aminohydrolasen, wohingegen die Deaminase von *B. subtilis* zur Superfamilie der Cytidin-/ Deoxycytidylat-Deaminasen gehört. Die Sequenzen beider Proteine sind im Anhang in Abbildung A.1 dargestellt. Beim Sequenzvergleich von *A. thaliana*-Proteinen mit dem Enzym von *E. coli* wurden keine Kandidaten mit ausreichend hoher Ähnlichkeit (BLAST e-Wert unter 0.001) identifiziert. Es konnten jedoch fünf Orthologe zum Protein von *B. subtilis* identifiziert werden (Abb. A.2, Anhang). Diese werden durch die Gene At5g28050, At1g68720, At3g05300, At1g48175 und At4g20960 kodiert. In jedem dieser Proteine ist das charakteristische Zinkbindemotiv der Cytidin-/ Deoxycytidylat-Deaminase Superfamilie konserviert.

Die höchste Übereinstimmung zum bakteriellen Enzym zeigt das von At5g28050 kodierte Protein (43% Übereinstimmung, 60% Ähnlichkeit), bei dem die Aminosäuren konserviert sind, die an der Bindung von Guanin im bakteriellen Enzym beteiligt sind, einschließlich des Tyrosinrestes am C-Terminus (Abb. 3.1). Aufgrund dieser Übereinstimmungen wurde es für die weitere Untersuchung ausgewählt. Dabei stand zunächst die biochemische Charakterisierung im Vordergrund.



**Abbildung 3.1 – Proteinsequenzvergleich zwischen der Guanindeaminase von *B. subtilis* und einer putativen Guanindeaminase von *A. thaliana*.** Aminosäuren sind schwarz unterlegt, wenn sie in beiden Sequenzen identisch sind. Grau unterlegte Aminosäuren sind nicht identisch, besitzen aber ähnliche Eigenschaften. Zusätzlich wurden Aminosäuren, denen laut Kristallstrukturanalyse der Deaminase aus *B. subtilis* eine Funktion zugeordnet wurde, wie folgt markiert: Blaue Kreise = In der Cytidin-/Deoxycytidylat-Deaminase Superfamilie konserviert und an der Deaminierung beteiligt. Rote Dreiecke = An der Bindung von Guanin beteiligt sind. Schwarze Sterne = An der Ausbildung strukturell wichtiger Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt. Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalO hergestellt und mit Boxshade eingefärbt.

### 3.2 Biochemische Charakterisierung der vermeintlichen Guanindeaminase aus *Arabidopsis thaliana*

Das durch die *in silico* Analyse als vermeintliche Guanindeaminase identifizierte Protein aus *Arabidopsis thaliana* sollte im Rahmen der vorliegenden Arbeit untersucht werden. Dabei lagen folgende Aspekte im Fokus: Die biochemischen Eigenschaften, die subzelluläre Lokalisation, die Expression in der Pflanze sowie die *in vivo* Funktion des Enzyms und dessen Rolle im pflanzlichen Purinnukleotidabbau. Im folgenden Teil wird die biochemische Analyse des Proteins hinsichtlich seiner Substratspezifität, enzymkinetischer Parameter sowie möglicher Aktivatoren und Inhibitoren beschrieben.

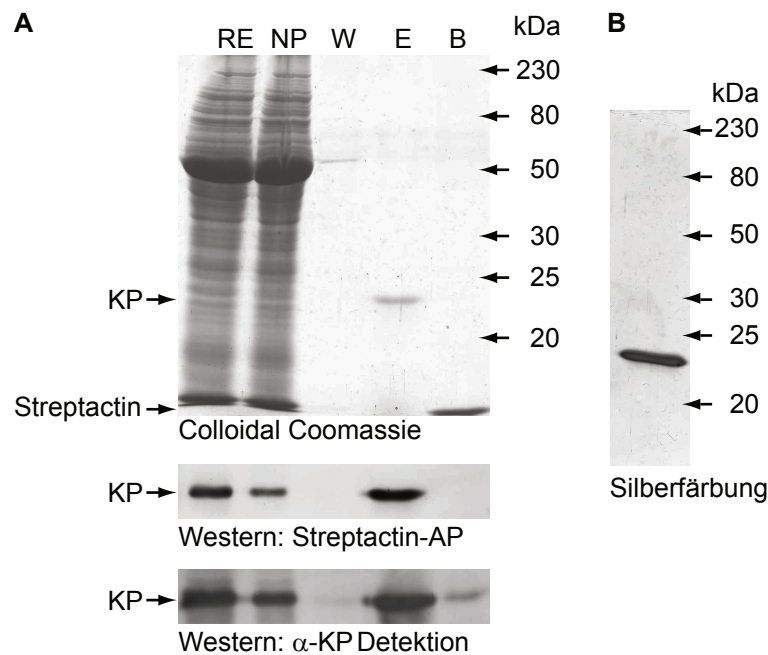
#### 3.2.1 Affinitätschromatographische Aufreinigung des Kandidatenproteins

Vor der Analyse der biochemischen Eigenschaften musste das Protein aufgereinigt werden. Dies diente der Erhöhung der Proteinkonzentration sowie der Entfernung störender Faktoren aus dem Rohextrakt. Affinitätschromatographie unter Nutzung einer StrepII-Markierung wurde als Mittel zur Proteinaufreinigung verwendet. Zu diesem Zweck wurde die kodierende Sequenz des Kandidaten von cDNA des *A. thaliana* Wildtyps Col-0 amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde in einen pflanzlichen Expressionsvektor kloniert, der eine StrepII-Markierung am N-Terminus ermöglicht (2.2.1). Eine Markierung am C-Terminus wurde ausgeschlossen, da die C-terminale Aminosäure Tyrosin wahr-



scheinlich am Reaktionsprozess beteiligt ist. Kristallstrukturanalysen der Deaminase von *B. subtilis* zeigten, dass der Tyrosinrest eines Monomers an der Koordinierung von Guanin im zweiten Monomer beteiligt ist (1.1.3, Abb. 1.5; Yao *et al.*, 2007).

Das beschriebene Konstrukt wurde für die transiente Expression in *N. benthamiana*-Blättern und anschließende Proteinaufreinigung verwendet (2.2.3). Zur Dokumentation des Aufreinigungsprozesses wurden folgende Proben genommen: Rohextrakt, Überstand nach Inkubation mit der Strep-Tactin-Matrix, letzte Waschfraktion, Elutionsfraktion und nicht-eluierte Proteine. Diese wurde mithilfe denaturierender Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt. Die Proteine jeder Fraktion wurden durch unspezifische Färbung mit Colloidal Coomassie sichtbar gemacht. Eine spezifische Detektion des Kandidatenproteins erfolgte nach einem Western Blot unter Nutzung eines Strep-Tactin-Alkalische Phosphatase Konjugates. Zusätzlich wurde das Protein mit einem spezifischen Antiserum detektiert (Abb. 3.2, A).



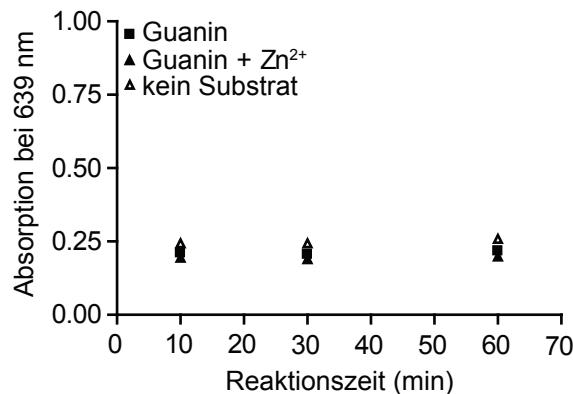
**Abbildung 3.2 – Dokumentation der Aufreinigung des Strep-markierten Kandidatenproteins nach transienter Expression in *N. benthamiana*.** A: Während des Aufreinigungsprozesses genommene Proben (je 8  $\mu$ l) wurden auf einem SDS Polyacrylamidgel aufgetrennt und anschließend mit Colloidal Coomassie gefärbt, sowie mittels Western Blot und StrepTactin-Alkalische Phosphatase Konjugat bzw. spezifischem Antiserum detektiert. RE: Rohextrakt; NP: nicht-gebundene Proteine; W: Proteine in letzter Waschfraktion; E: Proteine in Elutionsfraktion; B: Proteine, die nach der Elution an der Matrix verblieben, gelöst durch Kochen in SDS-Puffer (*boil off*). B: Die Reinheit des aufgereinigten Proteins (Fraktion E) wurde mittels SDS-PAGE und Silberfärbung überprüft. KP: Kandidatenprotein

Beide Detektionsmethoden zeigten deutlich, dass das überexprimierte Protein bereits im Rohextrakt nachweisbar war und nicht vollständig an die Strep-Tactin-Matrix gebunden wurde. Gleichzeitig war eine leichte Erhöhung der Proteinkonzentration in der Elutionsfraktion im Vergleich zum Rohextrakt

sichtbar. Die unspezifische Färbung mit Colloidal Coomassie deutet bereits eine hohe Reinheit des Proteins in der Elutionsfraktion an. Zur Bestätigung dieser Beobachtung wurden die Elutionsfraktion auf einem weiteren Gel mittels der sensitiveren Silberfärbung detektiert (Abb. 3.2, B). Auch hier war ausschließlich die vermeintliche Guanindeaminase nachweisbar. Entsprechend des beschriebenen Verfahrens aufgereinigte Proteinlösungen wurden für die nachfolgend beschriebenen biochemischen Analysen genutzt.

### 3.2.2 Untersuchung des Kandidatenproteins hinsichtlich Guanindeaminase-Aktivität

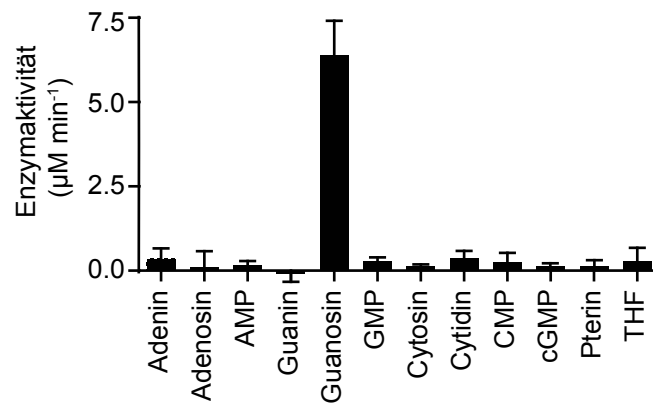
Das hier charakterisierte Protein aus *A. thaliana* wurde aufgrund seiner Homologie zur Guanindeaminase aus *B. subtilis* und der Vermutung dieselbe katalytische Aktivität zu besitzen, zur weiteren Untersuchung ausgewählt. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde aufgereinigtes Protein zusammen mit Guanin als Substrat in einem Aktivitätstest eingesetzt (2.2.3). Zusätzlich wurde in einem weiteren Reaktionsansatz Zinkchlorid hinzugegeben. Aus den Untersuchungen des bakteriellen Proteins ist bekannt, dass Zinkionen der Cofaktor des Enzyms sind (1.1.3). Die bei der Deaminierung freigesetzten Ammoniumionen wurden kolorimetrisch nachgewiesen. In Abbildung 3.3 ist exemplarisch das Ergebnis einer Aktivitätsmessung mit Guanin als Substrat sowie mit Guanin und Zink dargestellt. Im Vergleich zur Reaktion ohne Substrat ließ sich keine Änderung der Absorption bei 639 nm feststellen.



**Abbildung 3.3 – Bestimmung der Enzymaktivität des aufgereinigten Kandidatenproteins.** Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde 1 mM Guanin als Substrat eingesetzt. In einem weiteren Ansatz wurden der Reaktion zusätzlich 100  $\mu$ M  $ZnCl_2$  hinzugefügt. Die Enzymaktivität sollte mithilfe kolorimetrischer Ammoniumionendetektion bestimmt werden. Es war jedoch keine Absorptionsänderung nachweisbar.

Auch Wiederholungen dieses Reaktionstest führten ausschließlich zu negativen Ergebnissen. Aus diesem Grund wurden in nachfolgenden Versuchen die Reaktionsbedingungen variiert und HEPES- oder Phosphat-Puffer mit und ohne Triton X-100 sowie folgenden Metallsalzen kombiniert: Zink-, Mangan-, Eisen (II)- oder Kupferchlorid, eine Mischung aus Zink- und Manganchlorid sowie einen Ansatz ohne Metallsalz. Bei keinem der Reaktionsansätze konnte eine Veränderung der Absorption gegenüber den entsprechenden Kontrollen ohne Substrat detektiert werden.

Zusammenfassend ließ sich aus diesen Experimenten schließen, dass entweder die optimalen Reaktionsbedingungen nicht gefunden wurden, das Kandidatenprotein kein am Nukleotidabbau beteiligtes Enzym ist oder dass es nicht Guanin, sondern ein anderes Substrat deaminiert. Um diese Möglichkeit genauer zu untersuchen, wurden alternative Substrate getestet. Dabei kamen sowohl die Purin- und Pyrimidinbasen Adenin und Cytosin zum Einsatz als auch die Nucleoside Guanosin, Adenosin und Cytidin. Zusätzlich wurden die Nucleotide Guanosinmonophosphat, Adenosinmonophosphat und Cytidinmonophosphat genutzt. Cyclisches Guanosinmonophosphat sowie Pterin und Tetrahydrofolsäure wurden ebenfalls als Substrate getestet. Alle Verbindungen enthalten heterocyclische Ring-systeme, die an einem der Kohlenstoffatome mit einer Aminogruppe substituiert sind (Abb. A.3 Anhang). Diese könnte potentiell durch das vorliegende Protein hydrolytisch abgespalten werden. In Abbildung 3.4 sind die Resultate der Aktivitätstests mit jeweils 1 mM des entsprechenden Substrats dargestellt. Das Protein deaminierte keine der getesteten Verbindungen, außer Guanosin.

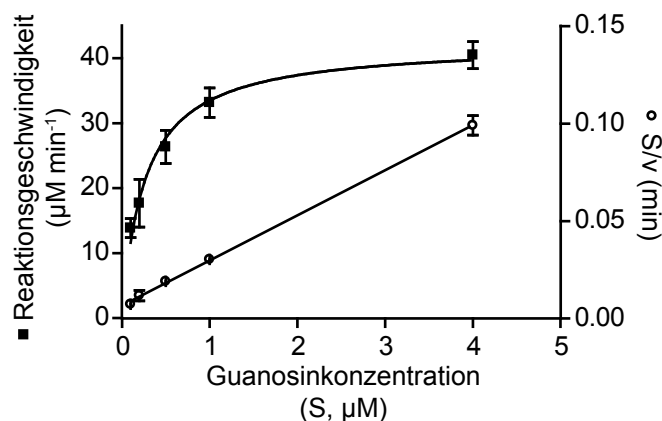


**Abbildung 3.4 – Identifizierung des Substrats der Deaminase.** Verschiedene Nucleotide, Nucleoside, Nucleobasen und Pterine wurden als Substrate der putativen Guanindeaminase getestet. Es wurde jeweils 1 mM des entsprechenden Substrats in der Reaktion eingesetzt, die Enzymaktivität wurde in Form von freigesetzten Ammoniumionen pro Minute bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte technischer Replikate und deren Standardabweichung ( $n = 3$ ). AMP: Adenosinmonophosphat; GMP: Guanosinmonophosphat; CMP: Cytidinmonophosphat; cGMP: cyclisches Guanosinmonophosphat; THF: Tetrahydrofolsäure.

Wiederholte Tests mit Guanosin als Substrat bestätigten die beobachtete Substratspezifität. Damit konnte in dieser Arbeit erstmalig eine Guanindeaminase genetisch identifiziert werden.

### 3.2.3 Enzymkinetische Analyse der Guanindeaminase

Im Sinne einer umfassenden biochemischen Analyse wurden die kinetischen Reaktionskonstanten des Enzyms bestimmt. Hierzu wurden Aktivitätstests mit fünf verschiedenen Guanosinkonzentrationen durchgeführt (2.2.3). Die Auftragungen der Daten nach Cornish-Bowden und Hanes sind in Abbildung 3.5 dargestellt.



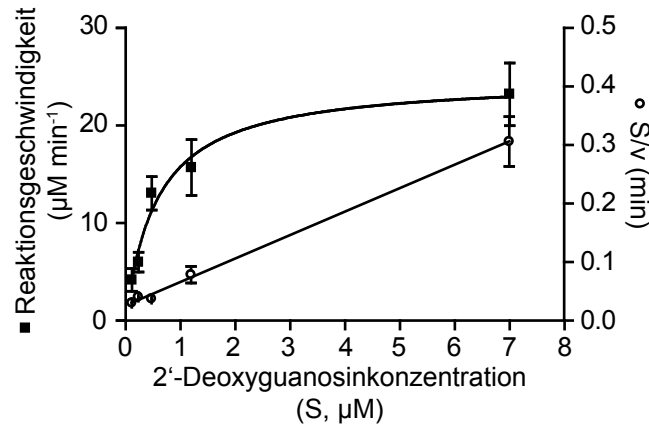
**Abbildung 3.5 – Bestimmung der enzymkinetischen Konstanten der GSDA mit Guanosin als Substrat.** Die Reaktionsgeschwindigkeit, als Ammoniumionen-Freisetzung pro Minute, wurde bei unterschiedlichen Guanosinkonzentrationen (0.1, 0.2, 0.5, 1.0 und 4.0 mM) ermittelt. Die linke Achse zeigt die direkt-lineare Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit über der Substratkonzentration (Cornish-Bowden-Diagramm). Die Kurvenanpassung der Sättigungshyperbel erfolgte mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung ( $R^2 = 0.9343$ ). Die rechte Achse zeigt die lineare Auftragung des Quotienten aus Substratkonzentration und Geschwindigkeit über der Substratkonzentration nach Hanes ( $r^2 = 0.9936$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte technischer Replikate und deren Standardabweichung ( $n = 5$ ).

Aus der Kurvengleichung der Sättigungshyperbel lässt sich die Michaeliskonstante ( $K_m$ ) ableiten. Darüber hinaus wurden die Wechselzahl  $k_{cat}$ , die katalytische Effizienz ( $k_{cat} / K_m$ ) sowie die spezifische Aktivität berechnet. Diese enzymkinetischen Parameter sind in Tabelle 3.1 zusammengefasst.

**Tabelle 3.1 – Enzymkinetische Parameter.** Die Michaeliskonstante ist mit Konfidenzintervall (ci) angegeben ( $P = 95\%$ )

	Michaeliskonstante ( $K_m \pm ci$ )	Wechselzahl ( $k_{cat}$ )	spezifische Aktivität	katalytische Effizienz ( $k_{cat} / K_m$ )
Guanosin	$264.0 \pm 58.2 \mu\text{M}$	$1.753 \text{ s}^{-1}$	$4.73 \text{ U mg}^{-1}$	$6642.09 (\text{s M})^{-1}$
2'-Deoxyguanosin	$576.1 \pm 217 \mu\text{M}$	$0.611 \text{ s}^{-1}$	$1.65 \text{ U mg}^{-1}$	$1061.26 (\text{s M})^{-1}$

Auf Grund der hohen strukturellen Ähnlichkeit des Ribonukleosids Guanosin zum Deoxyribonukleosid 2'-Deoxyguanosin wurde dieses ebenfalls als mögliches Substrat getestet. Da auch für diese Verbindung eine Deaminaseaktivität nachgewiesen werden konnte, wurden ebenfalls die enzymkinetischen Parameter mit 2'-Deoxyguanosin als Substrat bestimmt (Tab. 3.1). Die Darstellungen der Resultate als Hyperbel nach Cornish-Bowden sowie in linearisierter Form nach Hanes sind in Abbildung 3.6 gezeigt.



**Abbildung 3.6 – Bestimmung der enzymkinetischen Konstanten der GSDA mit 2'-Deoxyguanosin als Substrat.** Zur Bestimmung der kinetischen Konstanten der Enzymreaktion mit 2'-Deoxyguanosin als Substrat, wurde die Reaktionsgeschwindigkeit als Ammoniumionen-Freisetzung pro Minute bei unterschiedlichen 2'-Deoxyguanosinkonzentrationen (0.12, 0.24, 0.48, 1.2 und 7.0 mM) ermittelt. Die Ammoniumionen wurden kolorimetrisch detektiert und mit Hilfe eines Ammoniumstandards quantifiziert. Die linke Achse zeigt die direkt-lineare Auftragung der Reaktionsgeschwindigkeit über der Substratkonzentration (Cornish-Bowden-Diagramm). Die Kurvenanpassung der Sättigungshyperbel erfolgte mit Hilfe der Michaelis-Menten-Gleichung ( $R^2 = 0.9043$ ). Die rechte Achse zeigt die lineare Auftragung des Quotienten aus Substratkonzentration und Geschwindigkeit über der Substratkonzentration nach Hanes ( $r^2 = 0.9698$ ). Dargestellt sind die Mittelwerte technischer Replikate und deren Standardabweichung ( $n = 4$ ).

Der Vergleich der  $K_m$ -Werte für beide Substrate zeigt, dass die Affinität der Deaminase für Guanosin doppelt so hoch wie die für 2'-Deoxyguanosin ist. Allerdings ist das Konfidenzintervall der Messung für 2'-Deoxyguanosin so groß, dass diese Aussage nur mit Vorsicht getroffen werden kann. Die Werte für die Wechselzahl zeigen, dass bei Guanosin als Substrat in einer Minute fast dreimal mehr katalytische Zyklen durchlaufen werden. Die spezifische Aktivität sowie auch die katalytische Effizienz des Enzyms sind ebenfalls bei Verwendung von Guanosin höher als bei 2'-Deoxyguanosin. Zusammen zeigen die kinetischen Parameter, dass Guanosin das bevorzugte Substrat des Enzyms ist.

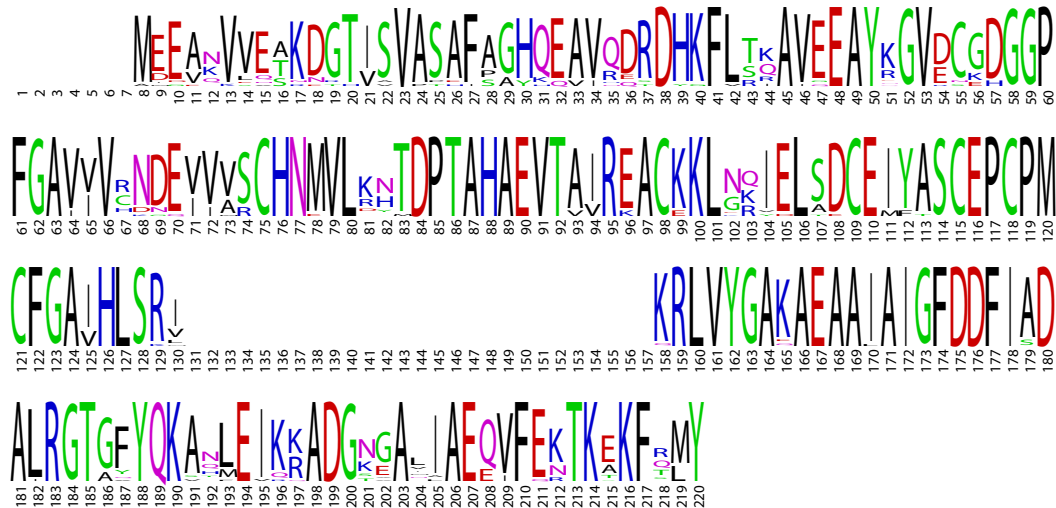
Im Weiteren sollte der Einfluss möglicher Aktivatoren und Inhibitoren auf die enzymatische Reaktion untersucht werden. Aktivatoren erhöhen die Reaktionsgeschwindigkeit, während Inhibitoren die Michaelis-Menten-Konstante erhöhen (kompetitive Hemmung) oder die Maximalgeschwindigkeit der Reaktion verringern (nicht-kompetitive Hemmung). Insgesamt wurden 23 Substanzen als potentielle positive oder negative Effektoren getestet (2.2.3). Als mögliche Aktivatoren wurden zum Beispiel die Nukleotide Guanosintriphosphat, Guanosinmonophosphat, Adenosintriphosphat, Adenosinmonophosphat und Inosinmonophosphat eingesetzt. Für diese Verbindungen ist eine Rolle als *feedforward*-Aktivator vorstellbar. Sowohl die Aminosäuren Glutamin, Glutaminsäure, Asparagin, Asparaginsäure und Alanin als auch die Carbonsäuren Pyruvat,  $\alpha$ -Ketoglutarat und Oxalacetat wurden ebenfalls als mögliche Aktivatoren getestet. Für keine dieser Verbindungen konnte ein Einfluss auf die enzymatische Reaktion der Guanosindeaminase nachgewiesen werden. Xanthosin, das Produkt der Deaminierung, wurde als möglicher *feedback*-Inhibitor eingesetzt. Ebenso wurden weitere

Metabolite des Purin- und Pyrimidinabbaus als potentielle hemmende Effektoren getestet. Dabei handelte es sich im Einzelnen um die Nukleoside Adenosin, Inosin, Uridin und Cytidin; die Nukleobasen Xanthin, Uracil und Cytosin sowie Harnsäure. Darüber hinaus wurde auch N2-Methylguanosin in einem Inhibitortest genutzt, da dieses an der Aminogruppe methyliert ist, die durch das Enzym abgespalten wird. Die Vermutung war, dass eine Bindung als Substratanalogon möglich wäre, es dann aber nicht zu einer Hydrolyse käme. Die Verbindung könnte somit einen kompetitiven Inhibitor darstellen. Es konnte jedoch in keinem der Tests eine hemmende Wirkung der jeweiligen Substanz auf die Enzymreaktion nachgewiesen werden.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, das Guanosin das bevorzugte Substrat der Deaminase ist, 2'-Deoxyguanosin aber *in vitro* auch vom Enzym hydrolysiert werden kann. Darüber hinaus konnte im Rahmen der durchgeführten Experimente kein Aktivator oder Inhibitor der Reaktion gefunden werden.

### 3.2.4 Die GSDA ist hochkonserviert in Pflanzen

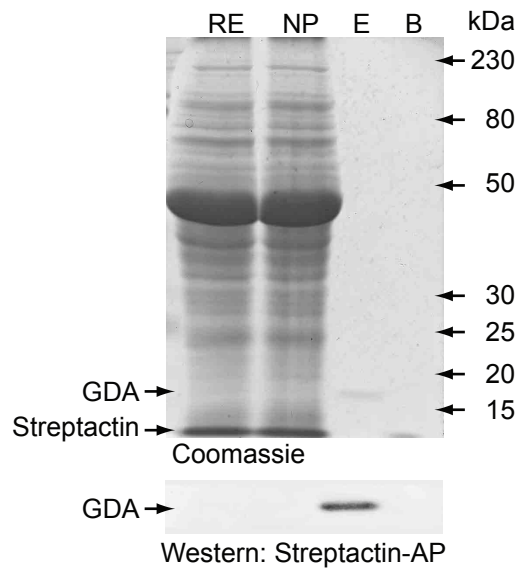
Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Kandidatenprotein die Deaminierung von Guanosin katalysiert, wurde ein Proteinsequenzvergleich mit den Proteinen anderer pflanzlicher Organismen durchgeführt, um mögliche Orthologe der GSDA zu identifizieren. In diese Analyse wurden folgende Pflanzen einbezogen: *Medicago truncatula*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Panicum virgatum*, *Theobroma cacao*, *Solanum lycopersicum*, *Fragaria vesca*, *Populus trichocarpa*, *Gossypium raimondii*, *Solanum tuberosum*, *Aquilegia coerulea*, *Brachypodium distachyon*, *Physcomitrella patens*. Die entsprechenden Proteinsequenzen wurden in der Phytozome-Datenbank mit Hilfe des BLASTP-Algorithmus identifiziert. Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalO erstellt und mit Boxshade eingefärbt (Abb A.4, Anhang). Gleichzeitig wurde das Ergebnis des Vergleichs in Form eines Weblogos dargestellt (Abb 3.7). Aus beiden Abbildungen ist deutlich zu erkennen, dass die Guanosindeaminase in den analysierten Pflanzen hochkonserviert ist. Sowohl die an der Zinkbindung beteiligten Aminosäuren als auch der Tyrosinrest am C-Terminus treten in allen Sequenzen auf. Die Abbildung im Anhang zeigt zudem, dass auch Aminosäuren konserviert sind, die im bakteriellen Protein für die Bindung von Guanin verantwortlich sind. Daher stellt sich die Frage, warum das Protein aus *A. thaliana*, trotz dieser Übereinstimmungen, eine abweichende Substratspezifität zeigt.



**Abbildung 3.7 – Weblogo-Darstellung des Sequenzvergleichs putativer pflanzlicher Guanosindeaminasen.** Die Proteinsequenz der GSDA von *A. thaliana* wurde genutzt um in der Phytozome-Datenbank mögliche Orthologe in *Medicago truncatula*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Panicum virgatum*, *Theobroma cacao*, *Solanum lycopersicum*, *Fragaria vesca*, *Populus trichocarpa*, *Gossypium raimondii*, *Solanum tuberosum*, *Aquilegia coerulea*, *Brachypodium distachyon*, *Physcomitrella patens* zu identifizieren. Mit Hilfe von ClustalO wurde ein Sequenzvergleich erstellt. Dieser diente als Basis für das Weblogo. Je größer eine Aminosäure dargestellt ist, umso stärker ist sie konserviert.

### 3.2.5 Vergleich mit bakterieller Guanindeaminase

Der Vergleich der *in silico* Analysen mit den biochemischen Experimenten wirft die Frage auf, warum das bakterielle und das pflanzliche Protein abweichende Substratspezifitäten aufweisen. Aufgrund der hohen Sequenzübereinstimmung sowie konservierter am katalytischen Prozess beteiligter Aminosäuren war dies nicht zu vermuten. Die Deaminaseaktivität des bakteriellen Enzyms wurde mithilfe von Zellextrakten, jedoch nicht anhand aufgereinigten Proteins nachgewiesen (Nygaard 2000). Aus diesem Grund sollte die Substratspezifität mit aufgereinigtem Protein überprüft werden, um auszuschließen, dass die abweichende Spezifität dem Zellextrakt geschuldet ist. Dazu wurde das bakterielle Gen amplifiziert, in einen pflanzlichen Expressionsvektor kloniert, in *N. benthamiana* Blättern exprimiert und anschließend aufgereinigt (2.2.1; 2.2.3). Während der Aufreinigung wurden Proben des Rohextrakts, des Überstands nach Inkubation mit der Strep-Tactin-Matrix sowie der Elutionsfraktion und der nicht-eluierten Proteine genommen. Diese wurden für eine anschließende Dokumentation mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Durch unspezifische Färbung mit Coomassie wurde der Gesamtproteingehalt sichtbar gemacht (Abb. 3.8).



**Abbildung 3.8 – Dokumentation der Aufreinigung der Strep-markierten bakteriellen Guanindeaminase nach transientser Expression in *N. benthamiana*.** Während des Aufreinigungsprozesses genommene Proben (je 8  $\mu$ l) wurden auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt, mit Coomassie gefärbt sowie mittels Western Blot und StrepTactin-Alkalische Phosphatase Konjugat detektiert. RE: Rohextrakt; NP: nicht-gebundene Proteine; E: Proteine in Elutionsfraktion; B: Proteine, die nach der Elution an der Matrix verblieben, gelöst durch Kochen in SDS-Puffer (*boil off*).

Die spezifische Detektion der bakteriellen Guanindeaminase erfolgte nach einem Western Blot unter Nutzung des Strep-Tactin-Alkalische Phosphatase Konjugates (Abb. 3.8). Diese zeigte, dass die Guanindeaminase aus *B. subtilis* transient in *N. benthamiana* exprimiert und anschließend aufgereinigt sowie angereichert werden konnte. Die so gewonnene Proteinlösung wurde in einem Aktivitätstest mit 1 mM Guanin oder derselben Konzentration Guanosin eingesetzt. Bei diesem Experiment wurde bestätigt, dass das Enzym von *B. subtilis* exklusiv Guanin deaminiert (nicht gezeigt).

Es besteht demnach noch immer die Frage, warum das bakterielle und das pflanzliche Enzym verschiedene Substrate deaminieren. Der Sequenzvergleich in Abbildung 3.1 zeigt, dass die Aminosäuren, die an der Substratbindung in *B. subtilis* beteiligt sind auch im Pflanzenprotein auftreten. Mit einer Ausnahme: Der Tryptophanrest an Stelle 92 der GDA aus *B. subtilis* findet sich in nicht in der Sequenz des Proteins aus Arabidopsis wieder. An vergleichbarer Position (Position 119) findet man hier einen Leucinrest. Diese Aminosäure ist in den Orthologen der GSDA in anderen Pflanzen hochkonserviert. Nicht allein der Leucinrest tritt in allen Pflanzenproteinen auf, sondern das ihn umgebende Motiv „HLS“. Dies könnte das Unterscheidungsmerkmal zwischen Guanindeaminasen und Guanosindeaminasen sein. Es wurde ein weiterer Sequenzvergleich angefertigt, in den die Sequenzen weiterer bakterieller Guanindeaminasen der Cytidin-/Deoxycytidylat- Deaminase Superfamilie eingebunden wurden. Hier diente die Veröffentlichung von Fernandez und Mitarbeitern als Grundlage (Fernandez *et al.*, 2009). Von den dort aufgeführten Proteinen wurden die von *Sulfurimonas denitrificans*, *Clostridium botulinum*, *Nitrococcus mobilis*, *Microscilla marina*, *Polaribacter ingensii*, *Bacil-*



*lus licheniformis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus pumilus*, *Arthrobacter aurescens*, *Deltaproteobacterium MLMS-1* und *Saccharopolyspora erythraea* für eine vergleichende Sequenzanalyse mit den Pflanzenproteinen genutzt. Auch die Sequenz der Guanindeaminase aus *B. subtilis* wurde mit einbezogen (Abb. A.5, Anhang). Außerdem wurde ein Weblogo erstellt. Ein Ausschnitt, der die Stelle der Sequenzen beinhaltet, an der im Protein aus *B. subtilis* der Tryptophanrest und im Arabidopsis-Enzym ein Leucinrest auftritt, ist in Abbildung 3.9 dargestellt. Es wird deutlich, dass beide Aminosäuren ähnlich häufig auftreten und das in den entsprechenden Motiven. Die Darstellung in Abbildung A.5 (Anhang) zeigt dies noch einmal im Detail. In allen bakteriellen Proteinen ist der Tryptophanrest konserviert und das fast immer im Motiv „YWA“, wohingegen in allen pflanzlichen Proteinen Leucin im Motiv „HLS“ auftritt. Aus der Kristallstrukturanalyse der Deaminase aus *B. subtilis* ist bekannt, dass der Tryptophanrest an Position 92 an der Bildung des aktiven Zentrums beteiligt ist und in einem hydrophoben Bereich des Protein lokalisiert ist. Dort interagiert diese Aminosäure mit dem Kohlenstoffatom C8 an der hydrophoben Seite des Purinrings (Liaw et al 2004).

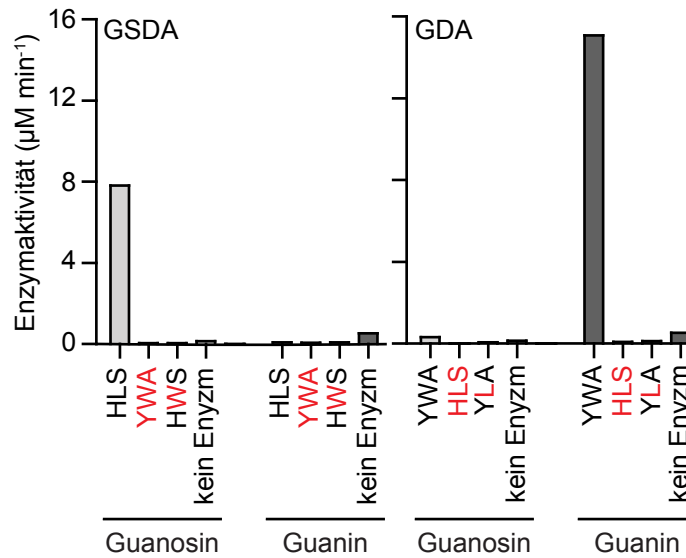


**Abbildung 3.9 – Weblogo-Darstellung des Sequenzvergleichs bakterieller Guanin- mit pflanzlichen Guanosindeaminasen.** Der Ausschnitt der Weblogo-Darstellung des Sequenzvergleichs der Deaminasen zeigt die Stelle an der in den bakteriellen Enzyme die Aminosäure Tryptophan konserviert ist, meist eingebunden in das Motiv „YWA“. Bei den Pflanzenproteinen tritt an vergleichbarer Stelle die Aminosäure Leucin im Motiv „HLS“ auf. Dieses ist hochkonserviert. Das Weblogo wurde auf der Basis eines Sequenzvergleichs bakterieller GDAs und pflanzlicher GSDAs erstellt. Je größer eine Aminosäure dargestellt ist, umso stärker ist sie konserviert. GSDAs: *A. thaliana*, *Medicago truncatula*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Panicum virgatum*, *Theobroma cacao*, *Solanum lycopersicum*, *Fragaria vesca*, *Populus trichocarpa*, *Gossypium raimondii*, *Solanum tuberosum*, *Aquilegia coerulea*, *Brachypodium distachyon*, *Physcomitrella patens*. GDAs: *Sulfurimonas denitrificans*, *Clostridium botulinum*, *Nitrococcus mobilis*, *Microscilla marina*, *Polaribacter irgensii*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus pumilus*, *Arthrobacter aurescens*, *Deltaproteobacterium*, *Saccharopolyspora erythraea*

Aufgrund der Sequenzvergleiche lassen sich die folgenden Annahmen treffen: Die Aminosäure Leucin an Position 119 der GSDA ist wahrscheinlich für die spezifische Bindung von Guanosin verantwortlich. Zusätzlich kann angenommen werden, dass der Tryptophanrest an Position 92 der bakteriellen GDA auf Grund seiner Interaktion mit dem Kohlenstoffatom C8 eine Bindung des Nukleosids verhindert. Der Riboserest von Guanosin und der Indolring des Tryptophans würden sich wahrscheinlich sterisch behindern. Darauf basierend, wurden von beiden Proteinen Varianten generiert, die die jeweils andere Aminosäure enthalten. Diesem Experiment lag die Hypothese zugrunde, dass ein solcher Austausch die Substratspezifität des jeweiligen Enzyms zu der des anderen verändern könnte.

Zusätzlich zu den Veränderungen der einzelnen Aminosäuren wurden weitere Varianten hergestellt. Das Aminosäuremotiv „HLS“ an Position 118 bis 120 des pflanzlichen Proteins wurde zum bakteriellen Motiv „YWA“ geändert. Außerdem wurde im bakteriellen Protein das Motiv an Position 91 bis 93 gegen das pflanzliche ausgetauscht. Die verschiedenen Varianten wurden durch zielgerichtete Mutagenese der entsprechenden Wildtypsequenzen hergestellt (2.2.1). Die Enzymvarianten wurden affinitätschromatographisch aufgereinigt (Abb. A.6, Anhang) und für Aktivitätstests mit Guanin und Guanosin verwendet (refprotbiochem).

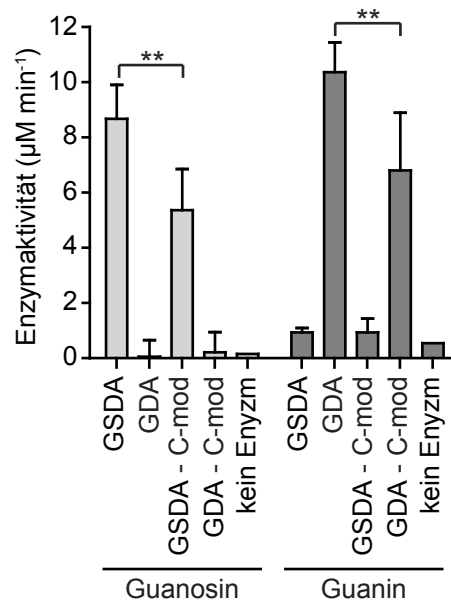
In Abbildung 3.10 sind die Resultate der Aktivitätsmessungen im Vergleich zu beiden Wildtypproteinen dargestellt. Es wird deutlich, dass sowohl im Fall der GSDA als auch der GDA eine Veränderung des Motivs „HLS“ beziehungsweise „YWA“ zum Verlust der Enzymaktivität führte. Die Hypothese man könne durch einen Austausch der Aminosäuren auch die Substratspezifität entsprechend verändern, ließ sich demnach nicht bestätigen. Gleichzeitig ist jedoch durch den Funktionsverlust der Enzyme erkennbar, dass die jeweiligen Aminosäuren wichtig für die Aktivität beider Enzyme sind.



**Abbildung 3.10 – Bestimmung der enzymatischen Aktivität von GSDA und GDA Varianten mit Mutationen im aktiven Zentrum.** Die biochemische Aktivität verschiedener Enzymvarianten mit Guanosin oder Guanin als Substrat wurde bestimmt. Getestet wurde einerseits die GSDA aus *A. thaliana* in ihrer Wildtypform sowie in zwei Varianten, die Veränderungen des Aminosäuremotivs an Position 118 bis 120 (HLS) zu YWA bzw. HWS tragen. Des Weiteren wurde die bakterielle GDA in der Wildtypform und in zwei Varianten analysiert. Hier wurde das Motiv an Position 91 bis 93 (YWA) zu HLS bzw. YLA verändert. Von der Wildtypsequenz abweichende Aminosäuren sind rot markiert.

Aus der Kristallstrukturanalyse der GDA ist auch bekannt, dass die C-terminale Aminosäure Tyrosin mit dem Substrat der enzymatischen Reaktion interagiert. Gleichzeitig sind die beiden C-Termini des Monomers an der Dimerisierung beteiligt. Ist das Substrat gebunden, „verschließt“ der C-Terminus zudem das aktive Zentrum. Es wird außerdem davon ausgegangen, dass die Struktur des C-Terminus einen Einfluss auf die Größe der Substratbindestelle und somit die funktionelle Variabilität der einzel-

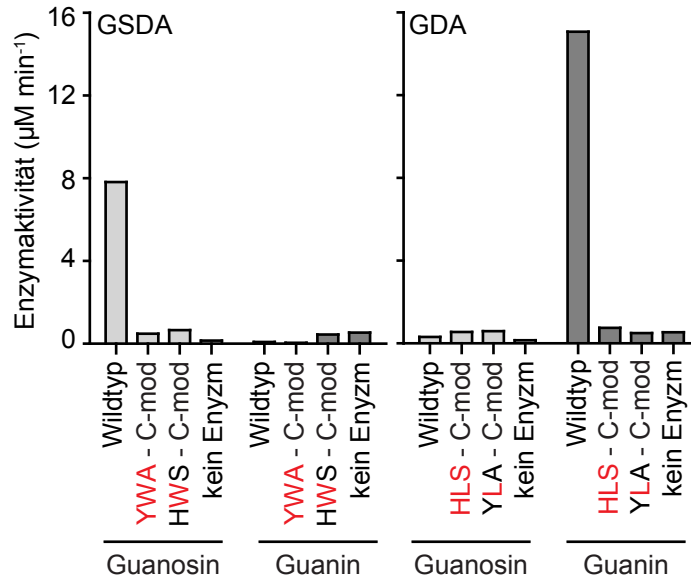
nen Mitglieder der Cytidin /Deoxycytidylat Deaminase Superfamilie hat (Liaw *et al.*, 2004). Möglicherweise ist der C-Terminus der GSDA der Grund für die abweichende Substratspezifität. Zur Überprüfung dieser Hypothese wurde das C-terminale Aminosäuremotiv „KEY“ des bakteriellen Proteins gegen das Motiv „FRLY“ des pflanzlichen Proteins ausgetauscht. Im Pflanzenprotein wurde entsprechend gegen den C-Terminus des Bakterienproteins ausgetauscht. Die veränderten kodierenden Sequenzen wurden zum Zweck der späteren affinitätschromatographischen Aufreinigung jeweils in einen pflanzlichen Expressionsvektor kloniert, der eine N-terminale StrepII-Markierung des Proteins erlaubt (2.2.1). Die Proteinvarianten wurden, wie zuvor beschrieben, aufgereinigt (Abb. A.6, Anhang) und in einem Aktivitätstest mit je 1 mM Guanin oder Guanidin als Substrat eingesetzt (2.2.3).



**Abbildung 3.11 – Bestimmung der enzymatischen Aktivität von GSDA und GDA Varianten mit Mutationen am C-Terminus.** Die biochemische Aktivität der Wildtypformen der GSDA (*A. thaliana*) und der GDA (*B. subtilis*) sowie einer am C-Terminus veränderten Variante der jeweiligen Proteins wurde sowohl mit Guanidin (links) als auch mit Guanin (rechts) als Substrat ermittelt. Die C-Termini beider Enzyme wurden gegeneinander getauscht, so dass das pflanzliche Protein den bakteriellen C-Terminus KEY trägt und das bakterielle Protein den pflanzlichen C-Terminus FRLY. Dargestellt sind die Mittelwerte technischer Replikate und deren Standardabweichung (n = 3). Die statistische Signifikanzanalyse wurde mittels zweiseitiger ANOVA, gekoppelt mit einem Bonferroni-Posttest, durchgeführt. \*\*= p < 0.01; C-mod, C-terminal-modifiziert.

Abbildung 3.11 zeigt, dass die Enzymaktivität in den Proteinvarianten jeweils im Vergleich zum Wildtypprotein abnimmt, dass gleichzeitig aber keine Änderung der Substratspezifität zu beobachten ist. Ein Austausch der C-Termini untereinander führt also nicht zu dem vorher vermuteten Effekt. Zeitgleich zur Erzeugung der C-terminalen Varianten der Wildtypproteine, wurden auch die durch zielgerichtete Mutagenese hergestellten Varianten für einen Austausch der C-Termini genutzt (2.2.1). Diese Kombinationsvarianten wurden ebenfalls affinitätschromatographisch aufgereinigt (Abb. A.6,

Anhang) und in Aktivitätstests mit je 1 mM Guanin oder Guanosin als Substrat gefolgt von kolorimetrischer Ammoniumionendetektion eingesetzt (2.2.3). Die Proteinvarianten verlieren vollständig die biochemische Aktivität, die für die Wildtypproteine zu beobachten war (Abb. 3.12).



**Abbildung 3.12 – Bestimmung der enzymatischen Aktivität von GSDA und GDA Varianten mit Mutationen im aktiven Zentrum und am C-Terminus.** Die biochemische Aktivität verschiedener Varianten der GSDA aus *A. thaliana* (links) sowie der GDA aus *B. subtilis* (rechts) einschließlich beider Wildtypformen wurde mit Guanosin und Guanin als Substrat in Form der Freisetzung von Ammoniumionen bestimmt. Von beiden Wildtypformen wurden Varianten getestet, bei denen Mutationen im aktiven Zentrum und am C-Terminus kombiniert wurden. Im aktiven Zentrum der GSDA wurde das Motiv an Position 118 bis 120 (HLS) zu YWA bzw. HWS verändert (rot markiert). Die Varianten der GDA tragen Veränderungen der Aminosäuren an Position 91 bis 93 (YWA) zu HLS bzw. YLA (rot markiert). Die C-Termini wurden jeweils gegen den C-Terminus der anderen Wildtypform ausgetauscht. C-mod, C-terminal-modifiziert.

### 3.3 Untersuchungen zur *in vivo* Funktion der Guanosindeaminase

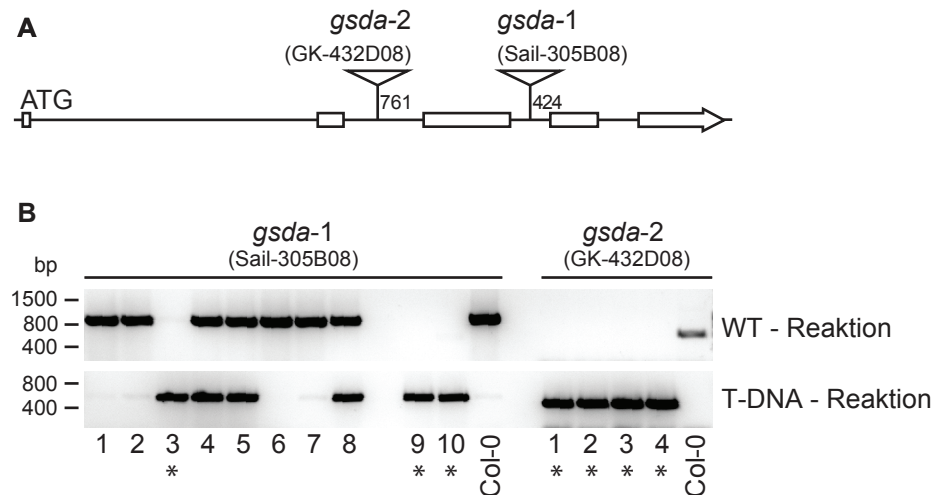
Nachdem durch vergleichende Aminosäuresequenzanalyse eine, wahrscheinlich am Purinnukleotidabbau beteiligte, Deaminase von *A. thaliana* gefunden wurde, konnte dieses Kandidatenprotein in biochemischen Analysen als Guanosindeaminase identifiziert werden. Im Folgenden sollte geprüft werden, ob das Protein diese Funktion auch *in vivo* erfüllt. Zu diesem Zweck wurde sowohl mit Verlustmutanten (T-DNA-Insertionslinien) als auch mit Komplementationslinien gearbeitet, um mögliche auftretende Phänotypen dem Fehlen oder Vorhandensein der Guanosindeaminase zuordnen zu können. Zusätzlich wurden auch die subzelluläre Lokalisation des Enzyms sowie die gewebespezifische Promotoraktivität untersucht. Im letzten Abschnitt der Funktionsanalyse wird die Relevanz der Guanosindeaminase im Purinnukleotidabbau noch einmal genauer betrachtet.

### 3.3.1 Charakterisierung der Verlustmutanten

Zur Beurteilung der Funktion der Guanosindeaminase *in vivo* wurden zwei T-DNA-Insertionslinien der Samensammlungen SAIL (Sessions *et al.*, 2002) und GABI-Kat (Kleinboelting *et al.*, 2012) bestellt. Im Rahmen eines studentischen Praktikums wurden bereits vor Beginn dieser Arbeit eine, für die T-DNA-Insertion, homozygote Pflanze der Linie SAIL 305B08 (*gsda-1* [KO 27], Pflanze A7) sowie zwei homozygote Pflanzen der Linie GK 432D08 (*gsda-2* [KO 28], Pflanzen D2 und D4) isoliert.

#### 3.3.1.1 Genotypisierung der T-DNA-Insertionslinien und Lokalisation der Insertionen

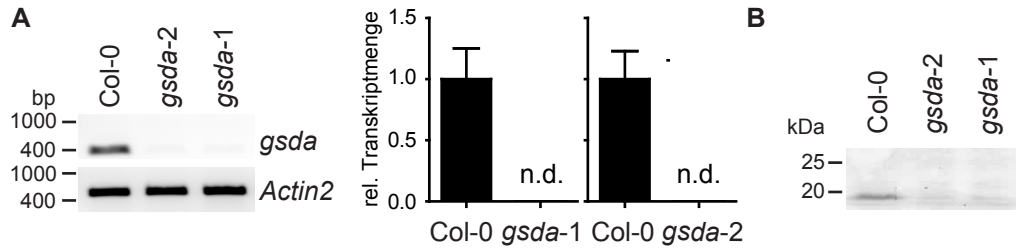
Vor ersten Versuchen zur *in vivo* Funktion der Deaminase wurden Nachkommen dieser Pflanzen sowie einer heterozygoten Pflanze der Linie SAIL 305B08 (*gsda-1*, Pflanze A5) mittels PCR überprüft. Die kodierende Sequenz der GSDA besteht aus 2061 Basenpaaren, verteilt auf fünf Exons und vier Introns (Abb. 3.13 A). Die Informationen für das 185 Aminosäuren umfassende Protein sind in 555 bp der Gensequenz kodiert. Die Insertionen der T-DNA-Insertionslinien liegen laut jeweiliger Annotation entweder im Intron 2 (GK 432D08, *gsda-2*) oder im Intron 3 (SAIL 305B08, *gsda-1*). Zum Zwecke der Genotypisierung wurde von den zu testenden Pflanzen DNA aus Blättern extrahiert, diese wurde anschließend in PCR Experimenten eingesetzt. Zur Identifizierung oder Bestätigung homozygoter T-DNA-Insertionen wurden jeweils genspezifische Primer sowie T-DNA-spezifische Primer genutzt (2.2.1). Auf diese Weise konnte die Homozygotie der T-DNA-Insertionen in den Nachfahren der Pflanzen A7 (SAIL 305B08, *gsda-1*) sowie D2 und D4 (GK 432D08, *gsda-2*) bestätigt werden. Darüber hinaus konnte eine Pflanze mit homozygoter T-DNA-Insertion unter den Nachfahren der Pflanze A5 (SAIL 305B08, *gsda-1*) identifiziert werden. Die Ergebnisse der Genotypisierung aller getesteter Pflanzen sind in Abbildung 3.13 B zusammengefasst. Die Insertionsorte in beiden Linien wurden mittels Sequenzierung von PCR-Produkten überprüft, die mithilfe eines genspezifischen sowie eines T-DNA-spezifischen Primers amplifiziert wurden. Die Analyse der Sequenzen bestätigte die T-DNA-Insertion sowohl im Intron 2 der Linie GK 432D08 [KO 28] als auch im Intron 3 der Linie SAIL 305B08 [KO 27] (Abb. 3.13 A).



**Abbildung 3.13 – Schematische Darstellung der Genstruktur und Genotypisierung von T-DNA-Insertionslinien.** **A:** Schema des *GSDA* Gens, die fünf Exons der kodierenden Sequenz sind in Form von Rechtecken dargestellt. Die Positionen der T-DNA Insertionen der Gabi-Kat-Linie (GK-432D08, [KO 28]) sowie der Sail-Linie (Sail-305B08, [KO 27]) sind durch Dreiecke markiert. Die Zahlen geben den Abstand der ersten, durch die Insertion hervorgerufenen, abweichenden Base, ausgehend vom Stopp-Codon, an. **B:** Analyse von *gsda*-Verlustmutanten hinsichtlich homozygoter T-DNA-Insertionen. Die PCR-Reaktionen wurden sowohl mit genspezifischen Primern als auch T-DNA-spezifischen Primern durchgeführt. \*: Pflanze mit homozygoter T-DNA-Insertion

### 3.3.1.2 Analyse der Transkription und Translation

Je nach Lage der T-DNA-Insertion im Gen, wirkt sich diese unterschiedlich auf dessen Transkription aus. Daher ist es ratsam zu überprüfen, ob eine Genabschaltung (*knock-out*), eine verringerte Genexpression (*knock-down*) oder die Bildung eines unvollständigen Transkripts vorliegt. Für T-DNA-Insertionen in Introns ist zudem bekannt, dass diese in einigen Fällen zusammen mit dem Intron aus der prä-mRNA gespleißt werden können. So besteht die Möglichkeit, dass in diesen Linien eine verringerte Menge Wildtyp-Transkript gebildet wird. Trotz homozygoter T-DNA-Insertion könnte es zu einer, wenn auch verminderten, Proteinbiosynthese kommen. Die beiden homozygoten T-DNA-Insertionslinien *gsda-1* und *gsda-2* wurden hinsichtlich der *GSDA*-Transkriptmenge untersucht. Dazu wurde zunächst RNA aus Blättern extrahiert und anschließende für semiquantitative Reverse Transkriptase (RT)-PCR genutzt (2.2.1). Die Primer wurden so gewählt, dass ein Sequenzbereich amplifiziert wurde, der den jeweiligen Insertionsort mit einschloss. Im Falle eines erfolgreichen Spleißens wäre das korrekte Produkt amplifizierbar, andernfalls nicht. Zur Kontrolle der Transkriptionseffizienz wurde *ACTIN-2* als Referenzgen genutzt.

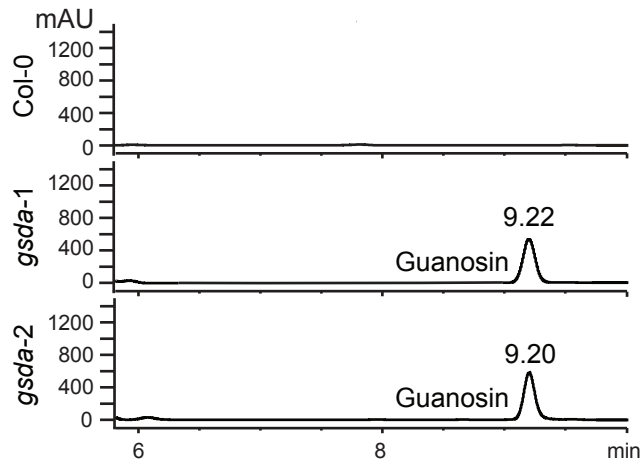


**Abbildung 3.14 – Verifizierung homozygoter Verlustmutanten in Bezug auf Transkription und Translation.** **A:** Vergleichende Analyse der *GSDA* Transkriptmenge zwischen den homozygoten Insertionslinien und dem Wildtyp mittels semiquantitativer RT-PCR (links) sowie quantitativer PCR (rechts). Für die semiquantitative RT-PCR wurde *ACTIN-2* als Referenzgen genutzt. Die relative Quantifizierung durch qPCR erfolgte unter Nutzung von *UBIQUITIN-10* als Referenzgen. Die relativen Transkriptmengen in den drei Linien wurden auf den Mittelwert des Wildtyps normiert. Es wurde je Linie aus einem Gemisch entsprechender Keimlinge dreimal RNA isoliert und unabhängig bis zur qPCR prozessiert. Dargestellt sind die Mittelwerte der Analysen und deren Standardabweichung ( $n = 3$ ). n.d., nicht detektierbar. **B:** Überprüfung des *GSDA* Proteingehalts in 8 Tage alten Keimlingen des Wildtyps und beider Insertionslinien mittels Western Blot und Nutzung eines *GSDA*-spezifischen Antikörpers.

In Abbildung 3.14 A wird eine starke Reduktion der *GSDA*-Transkriptmenge in beiden Linien deutlich. Es ist jedoch eine schwache Bande erkennbar, bei der es sich um Resttranskript oder eine Verunreinigung handeln könnte. Für die genauere Untersuchung der Resttranskriptmenge wurde nochmals RNA aus Keimlingen extrahiert und mit Reverser Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Diese wurde anschließend für die Transkriptionsanalyse mittels quantitativer PCR genutzt (2.2.1). Dabei wurden Primerpaare genutzt, die in den Exons banden, welche die T-DNA-Insertionen flankieren. Auch hier würde ausschließlich erfolgreiches Spleißen zu einem Produkt mit korrekter Größe führen. Als Referenzgen für die relative Quantifizierung wurde *UBIQUITIN-10* verwendet. In beiden Insertionslinien ist kein spezifisches Amplikon detektierbar, die relative Transkriptmenge ist daher null (Abb. 3.14 A). Bei den schwachen Banden nach der semiquantitativen RT-PCR handelte es sich wahrscheinlich um eine Kontamination.

Zusätzlich wurden die Insertionslinien bezüglich des *GSDA*-Proteingehaltes überprüft. Dazu wurden Rohextrakte von Keimlingen des Wildtyps sowie beider Insertionslinien (*gsda-1* [KO 27] und *gsda-2* [KO 28]) hergestellt und mittels Gelelektrophorese aufgetrennt. Die spezifische Detektion der Guanosindeaminase erfolgte nach einem Western Blot unter Nutzung eines *GSDA*-spezifischen Antiserums (2.2.3). In den Spuren beider Insertionsmutanten ließ sich keine Guanosindeaminase detektieren (Abb. 3.14 B).

3.3.1.3 Analyse des Metabolitprofils der Verlustmutanten

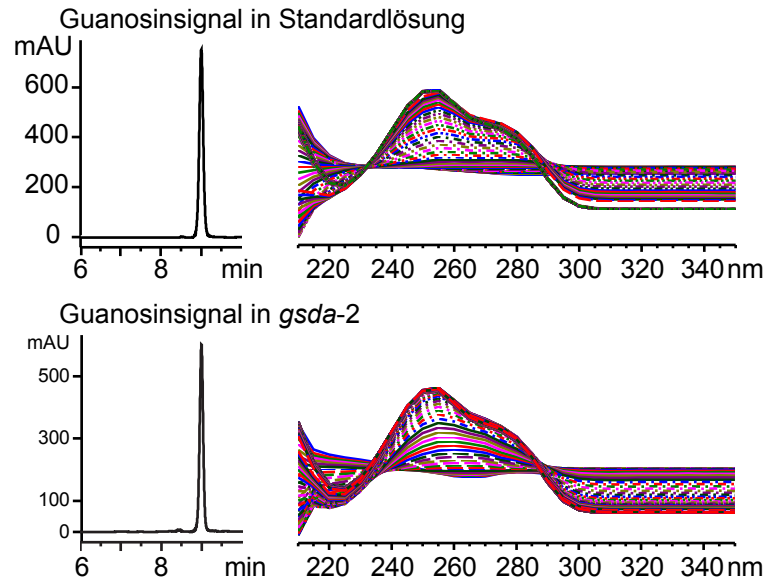


**Abbildung 3.15 – Metabolitanalyse der Insertionslinien.** Metabolitextrakte von trockenen Samen des Wildtyps und beider T-DNA Insertionslinien (*gsda-1*; *gsda-2*) wurden mittels Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie aufgetrennt und mit einem Diodenarray-UV-Detektor analysiert. mAU: milli absorption units (Milli-Absorptionseinheiten)

Ausgehend von der Vermutung, dass eine fehlende Guanosindeaminase zu Veränderungen im Metabolom des Purinnukleotidabbaus führt, wurden die Verlustmutanten *gsda-1* [KO 27] und *gsda-2* [KO 28] hinsichtlich der entsprechenden Metabolite analysiert. Dies diente gleichzeitig der Überprüfung der *in vivo* Funktion des Proteins. Zu diesem Zweck wurden mithilfe von Perchlorsäure Extrakte aus Samen beider Verlustmutanten sowie des Wildtyps hergestellt. Diese wurden anschließend durch Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie aufgetrennt und bei 260 nm im Diodenarray-UV-Detektor analysiert (2.2.5). Die Chromatogramme zeigten, keine spezifischen Signale für den Wildtyp. Im Gegensatz dazu tritt in den Extrakten beider T-DNA-Insertionslinien bei einer Retentionszeit von 9.2 Minuten ein deutliches Signal auf (Abb. 3.15). Dies wurde auch bei wiederholten Analysen detektiert, wobei es teilweise zu einer Verschiebung der Retentionszeit um bis zu 0.4 Minuten kam. Die Vermutung liegt nahe, dass es sich bei diesem Signal um Guanosin handelt, das auf Grund der fehlenden Deaminase nicht abgebaut werden kann. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde eine reine Guanosinlösung dem Extraktionsprotokoll entsprechend behandelt und ebenfalls chromatographisch aufgetrennt und analysiert. Zeitgleich zur Detektion der UV Absorption bei 260 nm wurde für jedes Signal ein UV-Spektrum aufgenommen. Abbildung 3.16 zeigt die Retentionszeit des Guanosinsignals aus der Standardlösung vergleichend zur Retentionszeit des Signals aus einem *gsda-2*-Samenextrakt. Darüber hinaus sind die UV-Spektren beider Signale abgebildet. Aus der Gegenüberstellung dieser Daten lässt sich ableiten, dass das Signal in der biologischen Probe ein Guanosinsignal ist. Gleichzeitig ist auffällig, dass in beiden UV-Spektren die Signale zu einzelnen Zeitpunkten des Peaks nicht übereinanderliegen, sondern über einen breiteren Bereich aufgefächert sind. Ein solcher Effekt kann auf eine Verunreinigung des Signals oder ein nicht optimal gewähltes Referenzspektrum während der

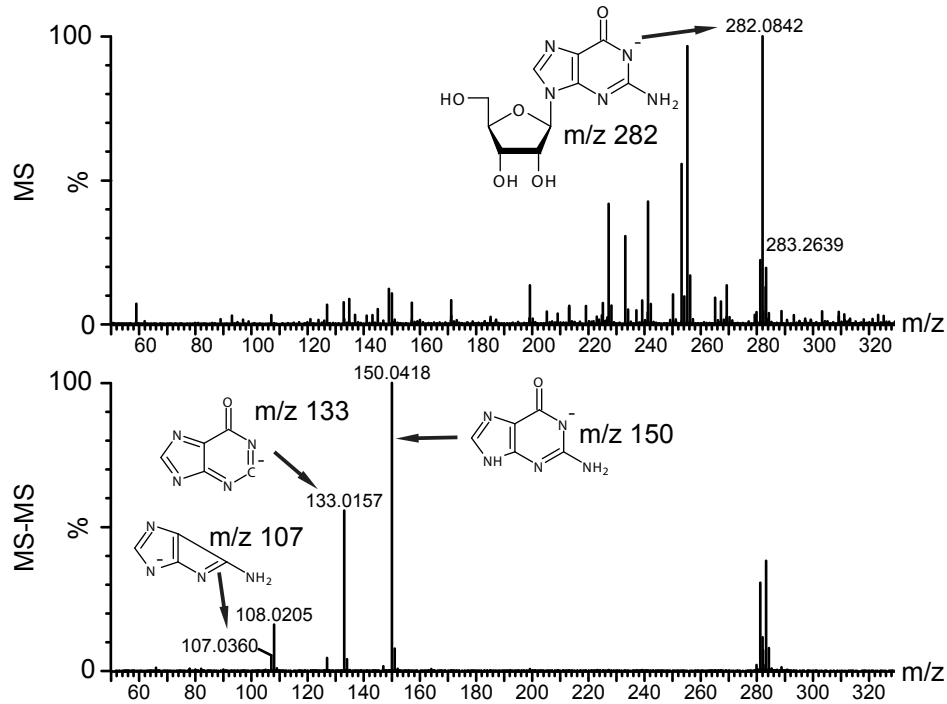


Auswertung hindeuten. Letzteres ist hier der Fall, wie die spätere Überprüfung der entsprechenden Daten ergab (nicht gezeigt).



**Abbildung 3.16 – Identifizierung des Guanosinsignals.** Eine Guanosinlösung und ein Extrakt von trockenen Samen der Linie *gsda-2* [KO 28] wurden mittels Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie aufgetrennt und mit einem Diodenarray-UV-Detektor analysiert. Es wurden jeweils die Retentionszeiten (links) und die UV-Spektren bei 210-350 nm (rechts) verglichen. mAU, milli absorption units (Milli-Absorptionseinheiten)

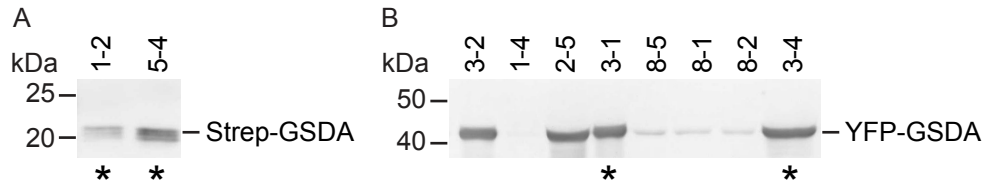
Zusätzlich zur Analyse der Signale mittels Retentionszeit und UV-Spektrum wurde Massenspektrometrie genutzt, um die Guanosinakkumulation in den Extrakten der T-DNA-Insertionslinien zu bestätigen. Zu diesem Zweck wurden entsprechende Fraktionen während der chromatographischen Auftrennung gesammelt und mittels Elektrosprayionisation-Tandemmassenspektrometrie (ESI-MS-MS) analysiert (2.2.5). Dabei wurden sowohl die Quasimoleküle als auch die Fragmentationen in einem Flugzeitmassenspektrometer detektiert (Abb. 3.17 und Abb. A.7, Anhang). Im Übersichtsspektrum des negativen Ionenmodus ist ein Signal mit einem Masse-zu-Ladung-Verhältnis ( $m/z$ ) von 282 erkennbar, dies entspricht dem deprotonierten Quasimolekülion  $[M-H]^-$  von Guanosin. Im MS-MS-Spektrum sind Signale mit den Masse-zu-Ladung-Verhältnissen 150, 133 und 107 zu erkennen. Diese entsprechen den zu erwartenden Fragmentationen des Guanosin-Quasimolekülions (Liu *et al.*, 2008 und Liu *et al.*, 2009). Somit konnte durch die Massenspektrometrie bestätigt werden, dass sich in den *gsda*-Mutanten Guanosin anreichert. Die Resultate der chromatographischen Analysen zeigten, dass das in dieser Arbeit untersuchte Protein *in vivo* die Enzymfunktion besitzt, die sich aus den *in vitro* Versuchen ableiten ließ.



**Abbildung 3.17 – Verifizierung des Guanosinsignals mithilfe von Massenspektrometrie.** Die Guanosinfraktionen aus einem Metabolitextrakt trockener Samen wurden während einer chromatographischen Analyse gesammelt und in einem externen Elektrospray-Tandemmassenspektrometer überprüft. Dargestellt ist jeweils ein Ausschnitt aus dem Übersichtsspektrum (MS) und dem Fragmentspektrum (MS-MS) im negativen Modus. Während die Übersichtsspektren die Signale der deprotonierten Molekülonen zeigen, sind in den Fragmentspektren die Signale der zugehörigen Fragmentionen dargestellt. Die Zuordnung der Signale zu den entsprechenden Ionen erfolgte nach Liu *et al.*, 2008 und Liu *et al.*, 2009. %: relative Intensität in Prozent; m/z: Masse-zu-Ladung-Verhältnis

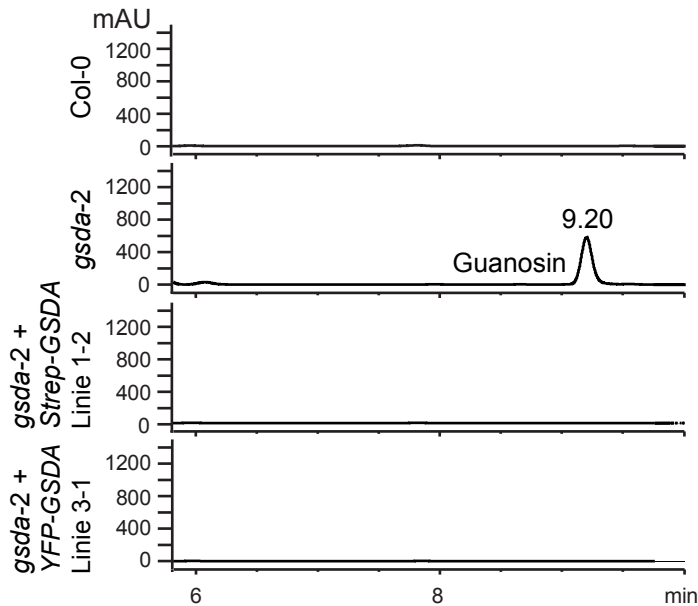
### 3.3.2 Herstellung und Charakterisierung von Komplementationslinien

Nachdem anhand der Metabolitanalyse der Verlustmutanten gezeigt werden konnte, dass die Guanosindeaminase *in vivo* die vermutete Enzymaktivität besitzt, sollte die Rolle des Proteins im Purinnukleotidabbau weiterführend untersucht werden. Zu diesem Zweck wurden Komplementationslinien hergestellt. Dazu wurden Pflanzen der Linien *gsda-2* [KO 28] stabil mit dem Plasmid GSDA-pXNS2pat-Strep oder GSDA-pXNS2pat-YFP transformiert (2.2.1). Für beide Linien wurden homozygote Pflanzen isoliert, die nur eine Insertion trugen und das jeweilige Protein exprimierten (Abb. 3.18).



**Abbildung 3.18 – Nachweis der Proteinexpression in den Komplementationslinien.** Blattohextrakte homozygoter Pflanzen der Linien *gsda-2* + Strep-GSDA [X5] und *gsda-2* + YFP-GSDA [X13] wurden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und nach Western Blot mit der entsprechenden Methode detektiert. Strep-Tag: StrepTactin-Alkalischer Phosphatase Konjugat. YFP: GFP-spezifischer Antikörper und Ziege anti-Maus IgG, konjugiert mit Alkalischer Phosphatase. \*: Diese Linien wurden für die weitere Charakterisierung der GSDA genutzt.

In einem ersten Experiment wurde überprüft, ob in den Komplementationslinien der molekulare Phänotyp revertiert ist und die, für die Verlustmutanten beobachtete, Akkumulation von Guanosen nicht mehr auftritt. Der Vergleich der Chromatogramme aller Linien zeigt, dass in der Verlustmutante, wie zuvor beschrieben, Guanosen angereichert war. In den Extrakten der Komplementationslinien war hingegen, wie auch beim Wildtyp, kein Guanosen detektierbar (Abb. 3.19). Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass die Überexpression der GSDA in der Verlustmutante den molekularen Phänotyp revertiert. Dies bestätigt, dass die Guanosenakkumulation durch den Verlust der Deaminase hervorgerufen wird.



**Abbildung 3.19 – Metabolitanalyse in den Komplementationslinien.** Metabolitextrakte von trockenen Samen des Wildtyps, der T-DNA Insertionslinie *gsda-2* [KO 28] sowie zweier Komplementationslinien (*gsda-2* + Strep-GSDA 1-2 [X5]; *gsda-2* + YFP-GSDA 3-1 [X13]) wurden mittels Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie aufgetrennt und mit einem Diodenarray-UV-Detektor analysiert. mAU: milli absorption units (Milli-Absorptionseinheiten)

### 3.3.3 Subzelluläre Lokalisation und Analyse des Expressionsprofils der GSDA

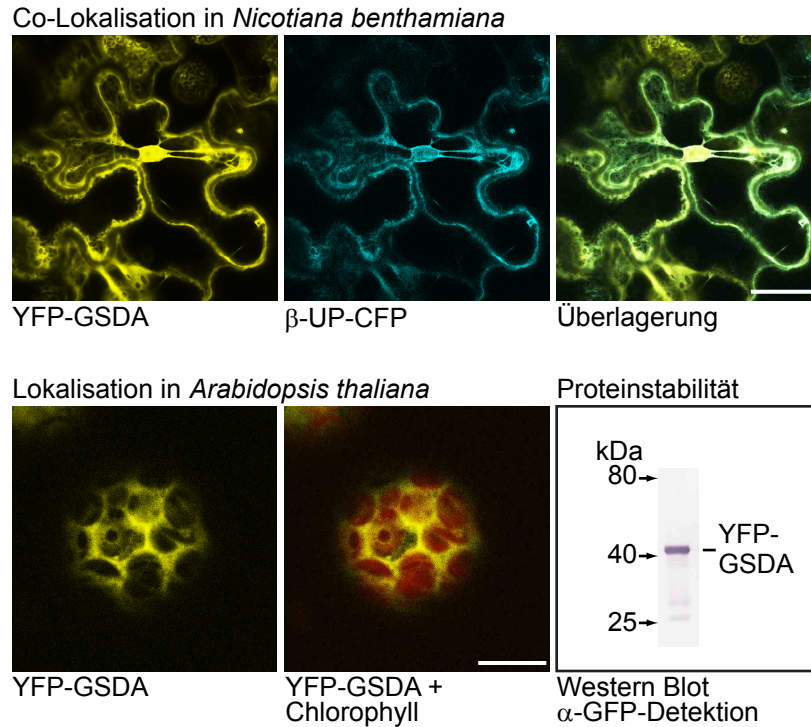
Nachdem sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Funktion als Guanosindeaminase nachgewiesen werden konnte, sollte im Folgenden die Lokalisation des Proteins in der Zelle sowie dessen Expressionsprofil in der Pflanze genauer untersucht werden.

#### 3.3.3.1 Subzelluläre Lokalisation

Für die Untersuchung der subzellulären Lokalisation der Guanosindeaminase wurden zunächst *in silico* Analysen genutzt um mögliche Transmembrandomänen (TMHMM Server v. 2.0) und N-terminale Präsequenzen (TargetP 1.1 Server) vorherzusagen. Dabei wurden keine potentiellen membranspannenden Domänen in der Aminosäuresequenz identifiziert. Die Suche nach Präsequenzen führte weder zu einer Identifizierung von plastidären oder mitochondrialen Signalsequenzen, noch konnte eine Signalpeptidschnittstelle vorhergesagt werden. Zusammengefasst sagen die *in silico* Daten voraus, dass das Protein im Cytosol lokalisiert ist.

Um dies experimentell zu überprüfen, wurde N-terminal YFP-markierte GSDA zusammen mit C-terminal CFP-markierter  $\beta$ -Ureidopropionase transient in *N. benthamiana* Blättern coexprimiert. Für die  $\beta$ -Ureidopropionase wurde bereits eine cytosolische Lokalisation beschrieben (Walsh *et al.*, 2001), daher konnte sie als Marker für dieses Kompartiment genutzt werden (2.2.4).

Die vergleichende Analyse beider Fluoreszenzsignale mittels konfokaler Mikroskopie zeigte, dass die YFP-GSDA im Cytosol mit der CFP-markierten  $\beta$ -Ureidopropionase kolokalisiert ist (Abb. 3.20). Instabiles YFP-markiertes Protein könnte dazuführen, dass das Signal des freien YFPs und nicht das des Fusionsproteins detektiert wird. Daher wurde die Stabilität des Fusionsproteins mittels Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Detektion mit einem anti-GFP Antikörper bestätigt (Abb. 3.20). Zusätzlich zur Analyse der Lokalisation im heterologen System *N. benthamiana*, wurden Mesophyllzell-Protoplasten aus Blättern der Komplementationslinie *gsda-2* + YFP-GSDA 3-2 isoliert und zur Lokalisation des Fluoreszenzsignals genutzt (2.2.4). Im Vergleich mit dem Signal der Autofluoreszenz des Chlorophylls wurde auch hier deutlich, dass die YFP-GSDA im Cytosol lokalisiert ist (Abb. 3.20). Da eine YFP-Markierung am N-Terminus des Proteins die Funktion eines Signalpeptids stören könnte, wurde auch ein Klon hergestellt, der die Expression einer C-terminal-markierten Variante ermöglicht (2.2.1). Es gelang jedoch nicht, ein solches Protein transient in Blättern von *N. benthamiana* zu exprimieren. Dass die Überexpression des YFP-GSDA Fusionsproteins in der Insertionslinie *gsda-2* zu einer Revertierung der Phänotypen führt, spricht für die Funktionalität des Proteins in der Mutante und somit auch für seine korrekte Lokalisation. Darüber hinaus wurde bereits für die ebenfalls am Purinabbau beteiligten Enzyme Nukleosidhydrolase 1 (NSH1) und Xanthindehydrogenase (XDH) eine cytosolische Lokalisation beschrieben (Jung *et al.*, 2009; Werner und Witte, 2011). Diese Daten werden durch eine Proteomanalyse von Ito *et al.* gestützt. In dieser Studie wurde die cytosolische Proteinfraction von Arabidopsiszellkulturen mittels Massenspektrometrie analysiert. Dabei wurden neben XDH1 und NSH2 unter anderem auch die Hypoxanthin-Guanin-



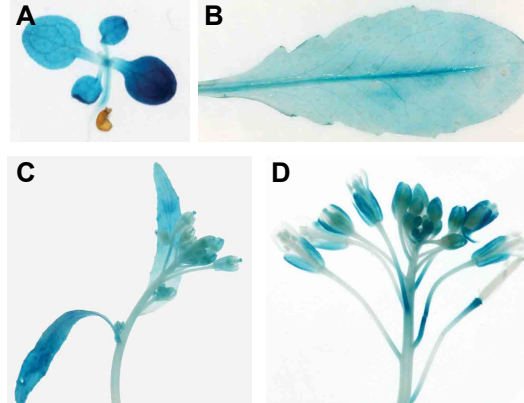
**Abbildung 3.20 – Subzelluläre Lokalisation der Guanosindeaminase.** Oben: Konfokalmikroskopische Aufnahmen der unteren Blattepidermis von *N. benthamiana* nach transienter Ko-Expression N-terminal YFP-markierter GSDA (YFP-GSDA) sowie des C-terminal CFP-markierten cytosolischen Proteins  $\beta$ -Ureidopropionase ( $\beta$ -UP-CFP). Zusätzlich ist die Überlagerung beider Fluoreszenzsignale dargestellt. Maßstabsbalken entspricht 20  $\mu$ m. Unten: Stabil mit YFP-GSDA transformierte *A. thaliana*-Pflanzen wurden zur Gewinnung von Mesophyllzell-Protoplasten gefolgt von konfokaler Mikroskopie genutzt. Dargestellt sind das Fluoreszenzsignal der YFP-GSDA und die Überlagerung mit der Autofluoreszenz der Chloroplasten (Maßstabsbalken entspricht 10  $\mu$ m). Auf der rechten Seite ist ein, mit einem GFP-spezifischen Antikörper entwickelter, Western Blot abgebildet, der die Stabilität des YFP-GSDA-Fusionsproteins zeigt.

Phosphoribosyltransferase (HGPRT) und die Guanosindeaminase im Cytosol nachgewiesen (Ito *et al.*, 2011). Fasst man die Lokalisationsvorhersagen mit den Ergebnissen der konfokalen Mikroskopie sowie den veröffentlichten Proteomdaten zusammen, so lässt sich Folgendes feststellen: Die Guanosindeaminase ist gemeinsam mit den Enzymen NSH1/2, XDH1 und HGPRT am Purinnukleotidabbau und -recycling im Cytosol beteiligt.

### 3.3.3.2 Analyse des GSDA - Expressionsprofils in der Pflanze

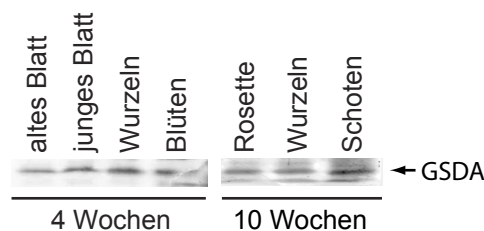
Das Expressionsprofil der GSDA wurde zum Einen mit Hilfe eines Reportergenansatzes analysiert, zum Anderen wurde das GSDA-Proteinniveau in verschiedenen Geweben untersucht. Für die Analyse der Promotoraktivität wurde ein 1100 bp Fragment stromaufwärts des ATG-Codons des GSDA-Gens mittels PCR amplifiziert und, in einem entsprechenden Vektor, mit dem Gen der  $\beta$ -Glucuronidase aus *E. coli* fusioniert (2.2.1). Stabil mit diesem Konstrukt transformierte Pflanzen wurden für die Ex-

pressionsanalyse genutzt. Die Aktivität der  $\beta$ -Glucuronidase konnte mittels histochemischer Färbung in unterschiedlichen Entwicklungsstadien und Geweben detektiert werden. So wurde die Genexpression indirekt, durch Bildung des blauen Farbstoffs 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo, in Keimlingen, Rosettenblättern, Stängelblättern und Blüten sichtbar gemacht (Abb. 3.21).



**Abbildung 3.21 – Histochemische Analyse der Promotoraktivität.** Zur Analyse der Aktivität des *GSDA*-Promotors wurde  $\beta$ -Glucuronidase als Reporter genutzt. Durch dieses System konnte in Keimlingen (A), Rosettenblättern (B), Stängelblättern (C) und Blüten (D) die Aktivität des Promotors in Form des blauen Farbstoffs 5,5'-Dibrom-4,4'-dichlor-indigo sichtbar gemacht werden.

Für die Untersuchung des *GSDA*-Proteinniveaus wurden Extrakte von jungen und alten Blättern, Wurzeln und Blüten vier Wochen alter Pflanzen sowie von Rosetten, Wurzeln und Schoten zehn Wochen alter Pflanzen hergestellt. Diese wurden durch denaturierende Gelelektrophorese aufgetrennt und nach einem Western Blot mit dem *GSDA*-spezifischen Antiserum detektiert (2.2.3). Die Darstellung der Detektion in Abbildung 3.22 zeigt, dass das Protein in allen getesteten Geweben exprimiert war. In Abbildung 3.14 wird zudem deutlich, dass die Guanosindeaminase auch in 8 Tage alten Keimlingen nachweisbar war.



**Abbildung 3.22 – Analyse des *GSDA*-Proteingehalts in verschiedenen Geweben.** Rohextrakte von jungen und alten Blättern, Wurzeln und Blüten vier Wochen alter Pflanzen (links) sowie von Rosetten, Wurzeln und Schoten zehn Wochen alter Pflanzen (rechts) des Wildtyps wurden mittels Gelelektrophorese, Western Blot und Nutzung eines *GSDA*-spezifischen Antikörpers hinsichtlich des Gehalts an Guanosindeaminase untersucht.

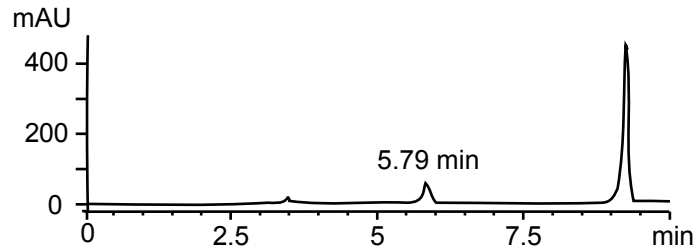
Die Analysen der Promotoraktivität sowie der Proteinexpression lassen eine ubiquitäre Expression der Guanosindeaminase vermuten. Öffentlich zugängliche Microarraydaten zeigen, dass das Transkript der GSDA in nahezu allen Geweben und Entwicklungsstadien nachgewiesen wurde (siehe eFP browser und Genevestigator). Darüberhinaus stehen auch Datensätze verschiedener Proteomanalysen zur Verfügung aus denen hervorgeht, dass die GSDA in Kotyledonen, Blättern, Wurzeln, Spross und Samen sowie weiteren Geweben nachgewiesen werden konnte (siehe pep2pro, AtProteome und PaxDB). Diese Daten bestätigen und vervollständigen die in der vorliegenden Arbeit erlangten Ergebnisse zur Expression der Guanosindeaminase in *Arabidopsis thaliana*.

### 3.3.4 Metabolitanalysen in unterschiedlichen Geweben

#### 3.3.4.1 Unbekanntes Signal in den Mutanten

Die Analyse von *gsda*-Mutanten zeigt eine Akkumulation von Guanosin aufgrund des *GSDA*-Verlusts (Abb. 3.15). Daneben wurde das Auftreten eines zweiten Signals im Bereich von 5,7 min nach Beginn der chromatographischen Auftrennung beobachtet (Abb. 3.23).

Zunächst war die Identität dieses Signals unbekannt. Eine erste Vermutung war, dass es sich dabei um 2'-Deoxyguanosin handelt, da diese Substanz *in vitro* von der GSDA deaminiert wird. Diese Theorie ließ sich jedoch nicht durch massenspektrometrische Analysen bestätigen (nicht gezeigt). In einer Veröffentlichung von Katahira und Ashihara ist beschrieben, dass die Deoxynukleoside während einer Perchlorsäureextraktion hydrolysiert werden (Katahira und Ashihara, 2006). Dies könnte auch auf das vermutete 2'-Deoxyguanosin in den Perchlorsäureextrakten der *gsda*-Mutanten zutreffen. In diesem Fall wäre Guanin der Metabolit, der während Chromatographie detektiert wird. Die Retentionszeit des unbekanntes Peaks und einer Guaninstandardlösung stimmen überein (nicht gezeigt). Eine Identifizierung über das UV-Spektrum war nicht möglich, da sich die Spektren von Guanin und 2'-Deoxyguanosin zu ähnlich sind. Aus diesem Grund wurde wie bei Katahira und Ashihara beschrieben eine Extraktion von Samen der Linie *gsda-2* mit 80 % Methanol durchgeführt. Parallel wurden reine Lösungen von Guanin, Guanosin und 2'-Deoxyguanosin ebenfalls auf diese Weise extrahiert. Der Test resultierte in schlechterer Qualität und geringer Intensität der Metabolitsignale. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass es sich bei dem unbekanntes Peak um Guanin und nicht um ein Extraktionsartefakt von 2'-Deoxyguanosin handelt (Abb. A.8, Anhang).



**Abbildung 3.23 – Identifizierung eines zweiten akkumulierenden Metaboliten in den *gsda*-Mutanten.** Dargestellt ist das Chromatogramm einer Metabolitanalyse trockener Samen der Linie *gsda*-2. Dies zeigt exemplarisch das Auftreten eines zweiten Signals bei 5.79 min. In nachfolgenden Analysen konnte der zweite akkumulierende Metabolit als Guanin identifiziert werden.

Die Akkumulation von Guanin in den *gsda*-2 Mutanten deutet einerseits daraufhin, dass es eine, noch unbekannte, Nukleosidhydrolase geben muss, die die Hydrolyse von Guanosin katalysiert. Andererseits kann man daraus auch schließen, dass es keine oder nur eine sehr geringe Guanindeaminaseaktivität (Reaktion 7 in Abb. 1.2) in *A. thaliana* gibt. Auch die Aktivität der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (Reaktion 9 in Abb. 1.2) scheint nicht hoch genug zu sein, um eine Akkumulation von Guanin in den *gsda*-Mutanten zu verhindern.

### 3.3.4.2 Metabolitanalyse in Samen

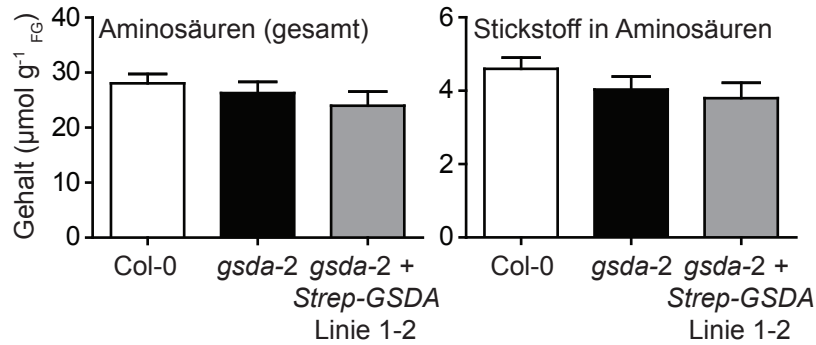
In 3.3.1.3 wurde bereits beschrieben, dass in den Samen der Insertionslinien *gsda*-1 [KO 27] und *gsda*-2 [KO 28] Guanosin akkumuliert. Darüber hinaus wurde auch gezeigt, dass weder für den Wildtyp noch die Komplementationslinien ein Guanosinsignal nach der chromatographischen Auftrennung sichtbar war. Das bedeutet, dass der Guanosingehalt in diesen Extrakten unter dem Detektionslimit der Methode liegt. Mit Hilfe einer Guanosinverdünnungsreihe (Abb. A.9) wurde als Untergrenze der Detektion eine Konzentration von circa  $1.9 \mu\text{mol l}^{-1}$  berechnet. Unter Berücksichtigung der Extraktionsmethode für Samen entspräche das ungefähr  $0.07 \mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$ . Der Guanosingehalt in Samen von Wildtyppflanzen sowie Pflanzen der Komplementationslinien liegt demnach unter diesem Wert.

Für Samen der Linien *gsda*-1 und *gsda*-2 wurde der Guanosingehalt in mehreren Experimenten quantifiziert. Je nach Samensatz lagen die Werte zwischen 6 und  $16 \mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$ . Der Gehalt von Guanin in den Mutanten wurde nur in zwei Experimenten quantifiziert, in einem davon in Samen. Der Grund dafür war die späte Identifizierung des Signals als Guanin im Verlauf der Doktorarbeit. In den davor durchgeführten Experimenten wurden entsprechende Standardlösungen nicht mitgeführt. Das Detektionslimit von Guanin ist ähnlich dem von Guanosin (nicht gezeigt). Der quantifizierte Guaningehalt betrug  $2.25 \mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$  in der Linie *gsda*-1 und  $1.82 \mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$  in der Linie *gsda*-2.

Zusätzlich zur Analyse der Purinabbaumetabolite wurde überprüft, ob der Verlust der Guanindeaminase einen Einfluss auf das Aminosäureprofil in den Samen hat. Dazu wurden ethanolische Extrakte von Samen der Linien *gsda*-2, *gsda*-2 + *Strep*-GSDA 1-2 und des Wildtyps hergestellt (2.2.5). Diese wurde mittels Umkehrphasen-Chromatographie aufgetrennt. Eine Derivatisierung der Amino-



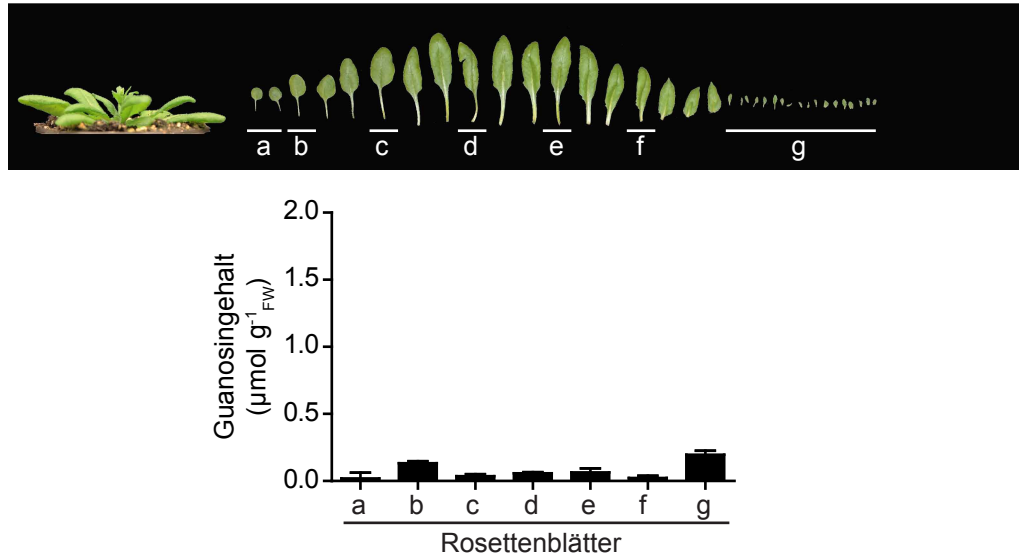
säuren kurz vor der Probeneinspritzung ermöglichte deren anschließende Fluoreszenzdetektion (2.2.5). In Abbildung 3.24 sind sowohl der jeweilige Gesamtaminosäuregehalt als auch der Gesamtgehalt von Stickstoff in den Aminosäuren dargestellt. In beiden Datensätzen ist kein signifikanter Unterschied zwischen den Linien nachweisbar. In Abbildung A.10 sind alle quantifizierten Aminosäuren noch einmal einzeln aufgeführt, auch hier werden keine signifikanten Unterschiede deutlich.



**Abbildung 3.24 – Quantifizierung des Aminosäuregehalts sowie des Aminosäurestickstoffgehalts in Samen.** Ethanologische Extrakte von Samen der Linien *gsda-2*, *gsda-2* + *Strep-GSDA* 1-2 und des Wildtyps wurden hergestellt, derivatisiert und mit Umkehrphasen-Chromatographie aufgetrennt. Die Fluoreszenzdetektion der Aminosäurederivate sowie die gleichzeitige Nutzung von Aminosäurestandardlösungen erlaubten eine anschließende Quantifizierung. Dargestellt ist der Gesamtgehalt an Aminosäuren. Der Aminosäurestickstoffgehalt wurde mit Hilfe der Summenformeln der einzelnen Aminosäuren berechnet. Von jeder Linie wurden drei Samenliquots unabhängig voneinander prozessiert und für die Quantifizierung genutzt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte und ihre Standardabweichung (n = 3). FG: Frischgewicht.

### 3.3.4.3 Guanosinakkumulation in vier Wochen alten Pflanzen

Für die Quantifizierung des Guanosingehalts Pflanzen der Linie *gsda-2* [KO 28] und des Wildtyps unter Langtag-Bedingungen angezogen. Nach vier Wochen wurden verschiedene Rosettenblätter analysiert. Dabei wurden junge, mittelalte und alte Blätter ausgewählt (Abb. 3.25). Das Balkendiagramm in Abbildung 3.25 zeigt die Akkumulation von Guanosin in der Linie *gsda-2*. Es wird deutlich, dass das Nukleosid in allen Blättern nachweisbar ist. Gleichzeitig ist auch zu erkennen, dass im Vergleich zu Samen nur geringe Mengen Guanosin akkumulieren. In alten Blättern ist der Guanosingehalt teilweise leicht erhöht. Der höchste Wert war jedoch in den jungen Blättern im Zentrum der Rosette detektierbar. Im Wildtyp wurde in keiner der Proben Guanosin nachgewiesen, deshalb sind die Daten hier nicht gezeigt. Der Gehalt von Guanin in den Proben der Linien *gsda-2* wurde nicht quantifiziert, da zum Zeitpunkt des Experiments die Identität des Signals noch nicht bekannt war und kein entsprechender Standard mitgeführt wurde.

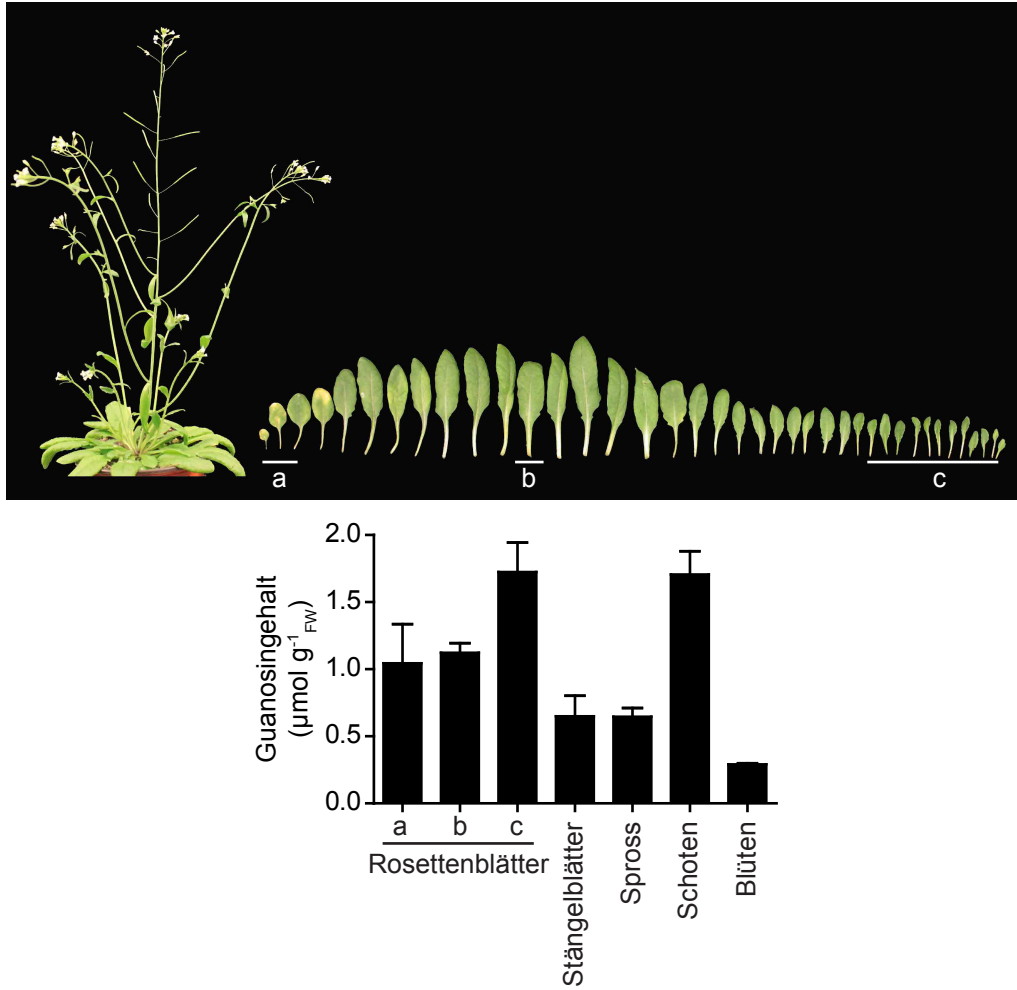


**Abbildung 3.25 – Analyse der Guanosinakkumulation in vier Wochen alten Pflanzen.** Der Guanosin-gehalt in verschiedenen Rosettenblättern vier Wochen alter Pflanzen der Linie *gsda-2* [KO 28] wurde mittels Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie und gleichzeitiger Verwendung von Guanosinstandard-lösungen bekannter Konzentrationen bestimmt. Für die Analyse wurden jeweils vergleichbare Blätter der Rosetten von vier Pflanzen geerntet und als Gemisch für drei unabhängige Metabolitextraktionen gefolgt von chromatographischer Analyse und Quantifizierung des Guanosingehalts genutzt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte dieser Quantifizierungen und ihre Standardabweichung ( $n = 3$ ). FG, Frischgewicht.

#### 3.3.4.4 Guanosinakkumulation in sieben Wochen alten Pflanzen

Für die Analyse der Guanosinakkumulation wurden Pflanzen der Linie *gsda-2* [KO 28] und des Wild-typs unter Langtag-Bedingungen angezogen. Nach sieben Wochen wurden Rosettenblätter, Stängel-blätter, Spross, Schoten sowie Blüten geerntet und Guanosin quantifiziert (Abb. 3.26). Das Balken-diagramm in Abbildung 3.26 zeigt die Akkumulation des Metabolits in allen analysierten Proben der Linie *gsda-2*. Auffällig ist, dass der Guanosingehalt in den Rosettenblättern deutlich höher ist als in denen vier Wochen alter Pflanzen (Abb. 3.25).

Der Guanosingehalt ist in den inneren Blättern der Rosette am höchsten, ähnlich hoch ist er in den Schoten. In Blüten hingegen war die geringste Guanosinkonzentration quantifizierbar. Wie bei den vier Wochen alten Pflanzen wurde auch hier in keiner der Wildtypproben ein Guanosinsignal detek-tiert (nicht gezeigt). Die Quantifizierung von Guanin in den Proben der Linie *gsda-2* erfolgte hier ebenfalls nicht, da das Signal zum Zeitpunkt des Experiments nicht identifiziert war und kein Stan-dard eingesetzt werden konnte.

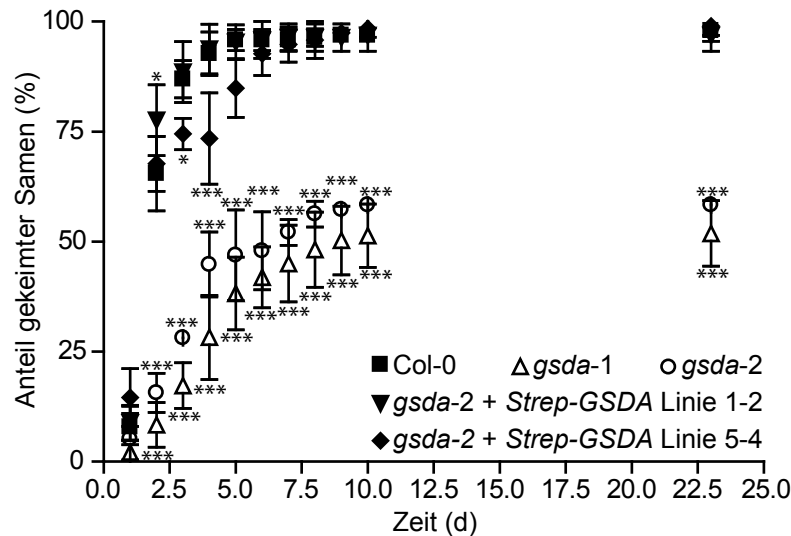


**Abbildung 3.26 – Analyse der Guanosisakkumulation in sieben Wochen alten Pflanzen.** Der Guanosingehalt in Rosettenblättern, Stängelblättern, Spross, Schoten und Blüten sieben Wochen alter Pflanzen der Linie *gsda-2* [KO 28] wurde mit Hilfe von Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie und gleichzeitiger Verwendung von Guanosinstandardlösungen bekannter Konzentrationen bestimmt. Für die Analyse wurden jeweils vergleichbare Proben von vier Pflanzen geerntet und als Gemisch für drei unabhängige Metabolitextraktionen gefolgt von chromatographischer Analyse und Quantifizierung des Guanosingehalts genutzt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte dieser Quantifizierungen und ihre Standardabweichung ( $n = 3$ ). FG: Frischgewicht.

### 3.4 Phänotypische Analyse der GSDA-Verlustmutanten

#### 3.4.1 Auswirkungen des Guanosindeaminaseverlusts auf die Keimung

Es wurde bereits für verschiedene Enzyme des Purin- und Pyrimidinnukleotidabbaus beschrieben, dass bei den entsprechenden T-DNA-Insertions- oder Stummschaltungslinien eine Keimungsverzögerung zu beobachten ist (1.3). Auch für die *gsda*-Mutanten wurde während der Keimung der Samen sowohl auf Erde als auch auf Agarplatten wiederholt eine Verzögerung beobachtet. Die Ausprägung dieses Phänotyps scheint vom Alter der Samen sowie den Wachstumsbedingungen abzuhängen. Im Zuge einer Masterarbeit in unserem Labor wurden genauere Untersuchungen zur Beschreibung von Phänotypen verschiedener Verlustmutanten im Purinabbau durchgeführt (L. Domnik, 2013). Die vergleichende Analyse der Keimung der Linien *gsda-1* [KO 27], *gsda-2* [KO 28], des Wildtyps sowie der Komplementationslinien *gsda-2* + *Strep-GSDA* 1-2 und 5-4 bestätigte die vorherigen Beobachtungen. Zusätzlich wurde die Keimungsrate im Verlauf von vier Tagen, nach Aussaat auf Agarplatten quantifiziert. In der hier vorliegenden Arbeit wurde das Keimungsverhalten der oben genannten Linien nochmals über einen längeren Zeitraum von insgesamt 23 Tagen beobachtet (Abb. 3.27). Dabei wurde ein einheitlicher Samensatz verwendet, das heißt, die Samen aller Linien wurden von Pflanzen geerntet, die parallel unter den gleichen Bedingungen angezogen wurden.



**Abbildung 3.27 – Beobachtung der Samenkeimung unter Langtag-Bedingungen.** Die Keimung von Samen des Wildtyps, beider T-DNA-Insertionslinien (*gsda-1* [KO 27]; *gsda-2* [KO 28]) sowie zweier Komplementationslinien (*gsda-2* + *Strep-GSDA* 1-2 und 5-4) wurde beobachtet (vier Monate nach der Ernte). Pro Linie wurden vier Platten mit je 48 Samen analysiert. Nach Stratifikation für ca. 60 Stunden bei 4 °C und Dunkelheit wurden die Samen über einen Zeitraum von 23 Tagen unter Langtag-Bedingungen inkubiert. Für jeden Samen wurde der Tag notiert an das Zerreißen des Endosperms zu beobachten war. Dargestellt sind die Mittelwerte der Messungen und deren Standardabweichung. Die statistische Signifikanzanalyse wurde mittels zweiseitiger ANOVA, gekoppelt mit einem Bonferroni-Posttest, durchgeführt. \*=  $p < 0.05$ ; \*\*\*=  $p < 0.001$

Nachdem die Samen aller Linien auf Agarplatten mit 1/2 MS-Medium ausgebracht waren, wurden sie für drei Tage im Dunkeln bei 4 °C stratifiziert. Anschließend wurde die Keimung unter Langtag-Bedingungen in einer Wachstumskammer beobachtet. Ein Samen galt als vollständig gekeimt, sobald das Zerreißen des Endosperms unter dem Binokular zu erkennen war. Die Auswertung der Daten zeigt, dass nach fünf Tagen circa 100 % der Samen des Wildtyps Col-0 gekeimt waren. Im selben Zeitraum war hingegen nur für 40-50 % der Samen beider T-DNA-Insertionslinien eine Keimung zu beobachten. Dies änderte sich auch im weiteren Verlauf des Experiments kaum, sodass nach 23 Tagen lediglich die Hälfte der Samen der *gsda*-Mutanten gekeimt war. Die Samen beider Komplementationslinien verhielten sich ähnlich denen des Wildtyps, der Phänotyp wurde durch die Wiedereinführung des *GSDA*-Gens vollständig revertiert (Abb. 3.27).

### 3.4.2 Auswirkungen des Guanosindeaminaseverlusts auf das Sprosswachstum

Während der Anzucht von Pflanzen der *gsda*-Linien (KO 27, KO 28] zeigte sich wiederholt, ein vom Wildtyp abweichendes Wachstum. Zunächst schien es, dass die Verlustmutanten im Vergleich zu Wildtyppflanzen eine geringere Sprosslänge erreichen. Eine Beobachtung von Pflanzen über den gesamten Lebenszyklus zeigte jedoch, dass die Mutanten eine Verzögerung beim Übergang von der vegetativen in die reproduktive Phase aufweisen. Das Sprosswachstum begann etwas später als bei Wildtyppflanzen (Abb. 3.28).

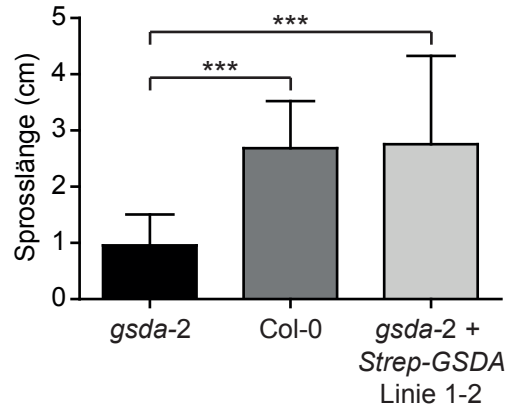


**Abbildung 3.28 – Beobachtung eines verzögerten Sprosswachstums der *gsda*-Mutanten.** Während der Anzucht von *gsda*-Verlustmutanten wurde wiederholt eine Verzögerung des Sprosswachstums beim Übergang von der vegetativen in die reproduktive Wachstumsphase beobachtet. Die Abbildung zeigt exemplarisch eine Pflanze der Linie *gsda*-2 (links), des Wildtyps (Mitte) sowie der Komplementationslinie *gsda*-2 + *Strep-GSDA* 1-2 (rechts).

Dies wurde zwischen Tag 30 und 35 der Entwicklung besonders deutlich. Für die Komplementationslinien war dieser Phänotyp nicht zu beobachten, hier zeigte sich sogar ein leicht beschleunigtes Sprosswachstum (Abb. 3.28).

Zur Quantifizierung der Beobachtungen wurden je vierzehn Pflanzen der Linie *gsda*-2, des Wildtyps sowie der Komplementationslinie *gsda*-2 + *Strep-GSDA* 1-2 auf Erde im Gewächshaus angezogen. Das Wachstum wurde beobachtet und hinsichtlich des Beginns des Sprosswachstums analysiert. Mit dem Auftreten des ersten Sprosses wurden täglich für alle Pflanzen die Sprosslängen gemessen, sofern ein Spross bereits gebildet war. Der Vergleich der Sprosslängen an Tag 31 des Lebenszyklus zeigt

deutlich den Wachstumsunterschied zwischen den Pflanzen der Linie *gsda-2* und denen des Wildtyps sowie der Komplementationlinie (Abb. 3.29). Das zuvor beobachtete, beschleunigte Wachstum von Pflanzen der Komplementationslinie im Vergleich zu Wildtyppflanzen lässt sich nicht gesichert feststellen.



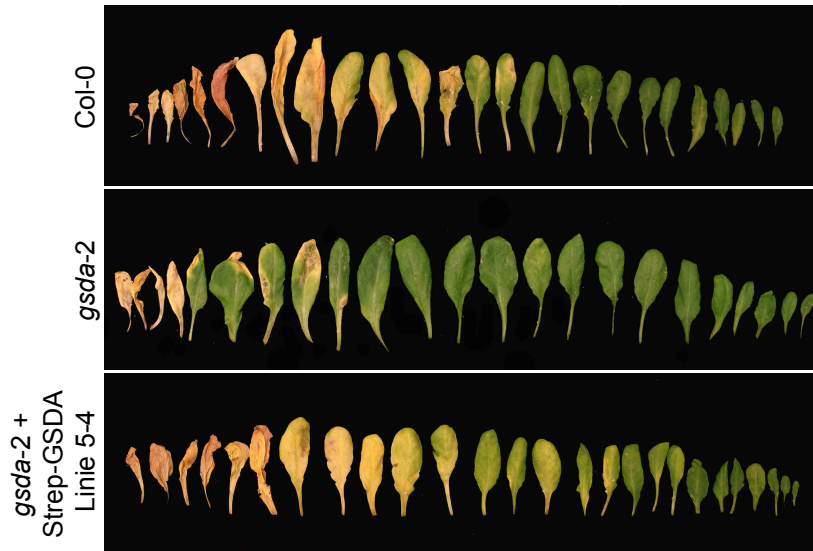
**Abbildung 3.29 – Quantifizierung der Sprosslänge an Tag 31 des Lebenszyklus.** Zur genaueren Beobachtung des verzögerten Sprosswachstums beim Übergang von der vegetativen in die reproduktive Wachstumsphase wurden Pflanzen der Linie *gsda-2* [KO 28], des Wildtyps sowie der Komplementationslinie *gsda-2* + *Strep-GSDA* 1-2 unter Langtag-Bedingungen angezogen. An Tag 31 des Lebenszyklus wurde die Sprosslänge von je 14 Pflanzen pro Linie ermittelt. Dargestellt sind die Mittelwerte der Messungen und deren Standardabweichung ( $n = 14$ ). Die statistische Signifikanzanalyse wurde mittels einseitiger ANOVA, gekoppelt mit einem *Bonferroni's Multiple Comparison Test*, durchgeführt. \*\*\*=  $p < 0.001$

### 3.4.3 Auswirkungen des Guanosindeaminaseverlusts auf die Blattseneszenz

Zusätzlich zur verlangsamten Keimung und dem verzögerten Eintreten in die reproduktive Phase, zeigten die *gsda*-Mutanten einen Unterschied zum Wildtyp hinsichtlich der Blattseneszenz.

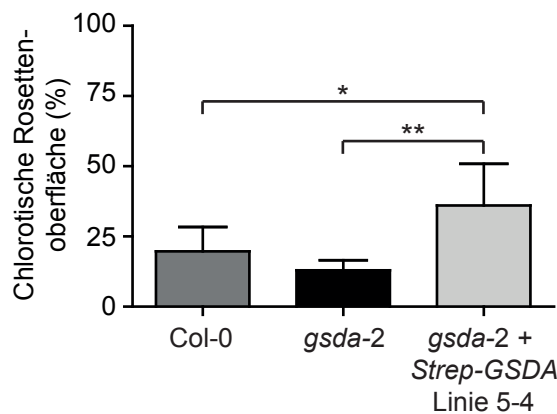
Bei der Anzucht der Pflanzen unter Langtag-Bedingungen war zu erkennen, dass die Rosettenblätter von Pflanzen der Linie *gsda-2* [KO 28] später chlorotisch wurden als die des Wildtyps. Darüber hinaus ließ sich bei Pflanzen der Komplementationslinie *gsda-2* + *Strep-GSDA* 5-4 eine leichte Beschleunigung der Seneszenz beobachten. Zur genaueren Analyse dieses Phänotyps wurden Pflanzen der drei Linien für mehrere Wochen unter Langtag-Bedingungen angezogen. Nach insgesamt neun Wochen wurde der Status der Pflanzen dokumentiert.

Die Abbildung 3.30 zeigt exemplarisch die Rosettenblätter einer Pflanze pro Linie. Die Gegenüberstellung verdeutlicht die verzögerte Seneszenz der Linie *gsda-2* [KO 28] im Vergleich zum Wildtyp. Ebenso wird die fortgeschrittene Chlorose der Blätter der Komplementationslinie *gsda-2* + *Strep-GSDA* 5-4 deutlich.



**Abbildung 3.30** – Beobachtung einer verzögerten Blattseneszenz der *gsda*-Mutanten. Während der Anzucht von Pflanzen der Linie *gsda* wurde eine Verzögerung der Blattseneszenz beobachtet. Die Abbildung zeigt exemplarisch die Rosettenblätter neun Wochen alter Pflanzen des Wildtyps, der Linie *gsda-2* sowie der Komplementationslinie *gsda-2* + *Strep-GSDA* 5-4.

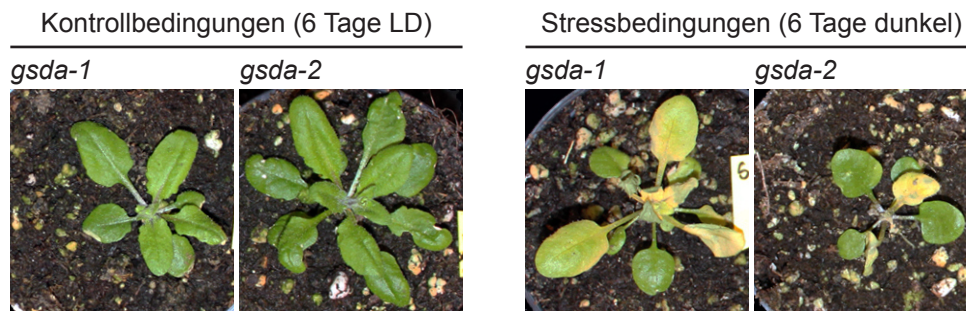
Für die quantitative Auswertung wurde der durchschnittliche Anteil der chlorotischen Rosettenoberfläche ermittelt (Abb. 3.31). Diese Daten bestätigen, dass die *gsda*-Mutanten eine geringere chlorotische Fläche aufwiesen als die Komplementationslinie. Der Unterschied zwischen Verlustmutante und Wildtyp ist nicht signifikant.



**Abbildung 3.31** – Quantifizierung des Anteils der chlorotischen Blattoberfläche. Pflanzen des Wildtyps, der Linie *gsda-2* [KO 28] sowie der Komplementationslinie *gsda-2* + *Strep-GSDA* 5-4 wurden unter Langtag-Bedingungen angezogen. Nach neun Wochen wurden fünf Pflanzen pro Linie fotografiert. Anschließend wurde mit Hilfe der Software ImageJ der Anteil der chlorotischen Rosettenoberfläche berechnet. Dargestellt sind die Mittelwerte und ihre Standardabweichung (n = 5). Die statistische Signifikanzanalyse wurde mittels einseitiger ANOVA, gekoppelt mit einem *Bonferroni's Multiple Comparison Test*, durchgeführt. \* = p < 0.05; \*\* = p < 0.01

### 3.4.4 Dunkelstress

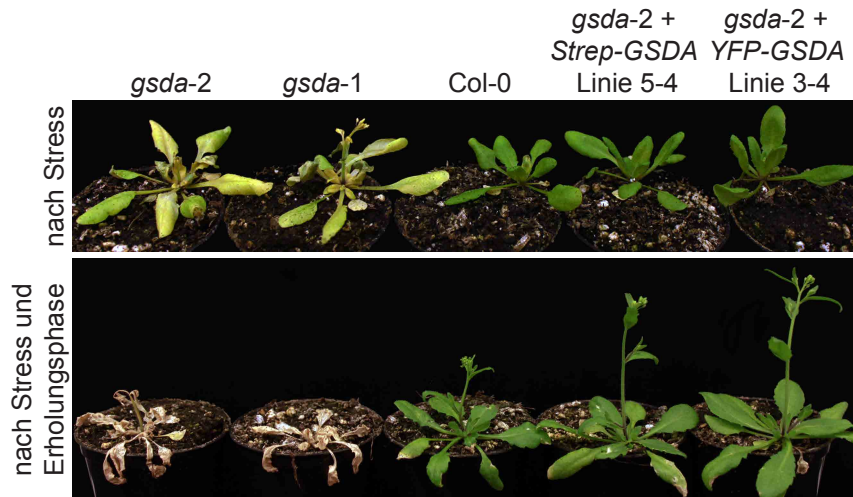
Für Verlustmutanen der Xanthindehydrogenase sowie die Nucleosidhydrolyase 1 wurde gezeigt, dass diese stärker auf eine mehrtägige Dunkelphase reagieren als der Wildtyp (Brychkova *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2011). Aus diesem Grund wurde getestet, ob sich der Verlust der GSDA ebenfalls auf die Überlebensfähigkeit der Pflanzen bei längerer Dunkelheit auswirkt. In einem Vortest wurden vier Wochen alte Pflanzen der Linien *gsda-1* [KO 27] und *gsda-2* [KO 28] für sechs Tage im Dunkeln gehalten. Der Vergleich der behandelten Pflanzen zu unbehandelten Kontrollpflanzen zeigte eine deutliche Gelbfärbung der Blätter (Abb. 3.32). Für Wildtyppflanzen war dies nicht zu beobachten (nicht gezeigt).



**Abbildung 3.32 – Phänotypische Analyse der Mutanten bei Dunkelstress.** Pflanzen beider T-DNA Insertionslinien (*gsda-1*; *gsda-2*) wurden unter Langtag-Bedingungen angezogen. Ein Teil der Pflanzen wurde für sechs Tage im Dunkeln gehalten. Die Kontrollpflanzen verblieben im Langtag. LD: Langtag

Im folgenden Experiment sollte geprüft werden, ob der Phänotyp in den Komplementationslinien vollständig revertiert ist. Dazu wurden Pflanzen beider T-DNA-Insertionslinien, des Wildtyps sowie der Komplementationslinien *gsda-2* + *Strep-GSDA* 5-4 und *gsda-2* + *YFP-GSDA* 3-4, wie für den Vortest beschrieben, angezogen und der Dunkelheit ausgesetzt. Nach sechs Tagen im Dunkeln wurden die Pflanzen für eine neuntägige Erholungsphase wieder unter Langtag-Bedingungen gehalten. Die Analyse des Phänotyps am Ende der Dunkelphase bestätigte die vorherige Beobachtung. Die Pflanzen der Linien *gsda-1* und *gsda-2* zeigten eine deutliche Gelbfärbung der Blätter, wohingegen dies für die Blätter der Wildtyppflanzen kaum zu beobachten war. Darüber hinaus zeigte das Experiment auch, dass der Phänotyp durch die Wiedereinführung des *GSDA*-Gens vollständig revertiert wird (Abb. 3.33). Am Ende der neuntägigen Erholungsphase bei Langtag-Bedingungen zeigte sich, dass die Dunkelheit-induzierte Seneszenz der *gsda-2* Pflanzen zu deren Tod führte. Die Pflanzen des Wildtyps und der Komplementationslinien hingegen sind in ihrem Wachstum nicht merklich beeinträchtigt (Abb. 3.33 unten).





**Abbildung 3.33 – Vergleich der *gsda*-Mutanten und Komplementationslinien bei Dunkelstress.** Pflanzen des Wildtyps, beider T-DNA Insertionslinien (*gsda-1*; *gsda-2*) sowie zweier Komplementationslinien (*gsda-2* + *Strep-GSDA* 5-4; *gsda-2* + *YFP-GSDA* 3-4) wurden vier Wochen unter Langtag-Bedingungen angezogen. Im Anschluss wurden sie sechs Tage im Dunkeln gehalten (oben), gefolgt von einer neuntägigen Erholungsphase unter Langtag-Bedingungen (unten).

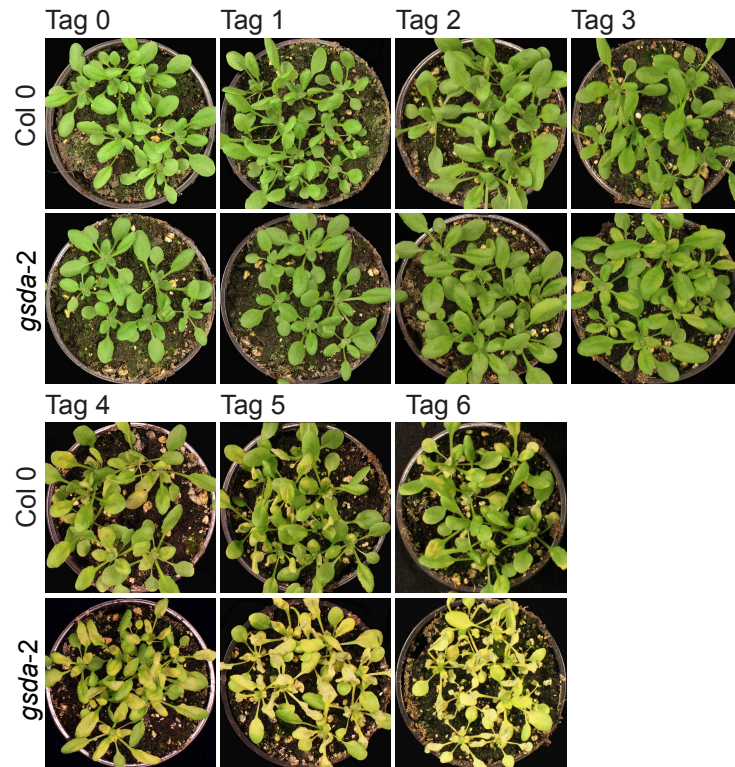
Die bisher beschriebenen Experimente zeigten einen Unterschied zwischen dem Wildtyp und der *gsda-2* Mutante [KO 28] nach sechs Tagen Dunkelheit. Außerdem verdeutlichten sie die Revertierung des Phänotyps bei den Linien *gsda-2* + *Strep-GSDA* 5-4 und *gsda-2* + *YFP-GSDA* 3-4.

Unklar war jedoch, wie schnell nach Beginn der Dunkelphase dieser Phänotyp zu beobachten ist. Aus diesem Grund wurden Pflanzen des Wildtyps und der Linie *gsda-2* drei Wochen unter Langtag-Bedingungen angezogen und anschließend für ein Zeitkursexperiment verwendet.

Von Tag 0 bis Tag 6 der Dunkelphase sollte der Phänotyp der Pflanzen dokumentiert werden, zusätzlich waren biochemische Analysen des Pflanzenmaterials geplant. Zu diesem Zweck wurden pro Linie und Tag drei Töpfe mit mehreren Pflanzen (8-12) angezogen. So konnten an jedem Tag des Zeitkurses Töpfe aus der Dunkelheit entfernt und dokumentiert werden. Die Pflanzen je eines Topfes wurden geerntet, schockgefroren und bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert. Die zwei verbleibenden Töpfe jeder Linie wurden für die Erholungsphase ins Gewächshaus gestellt.

Die schematische Darstellung des Experiments in [Abbildung 3.34](#) fasst den Ablauf des Zeitkursexperiments noch einmal zusammen.

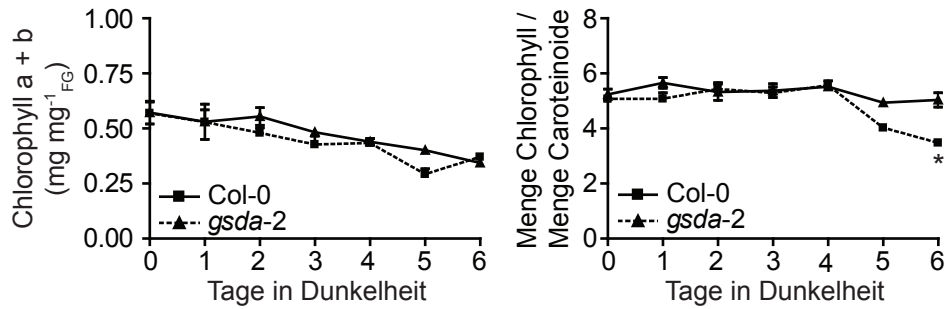




**Abbildung 3.35 – Phänotypische Analyse im Verlauf der sechstägigen Dunkelstress-Behandlung.** Pflanzen des Wildtyps und der Linie *gsda-2* [KO 28] wurden drei Wochen unter Langtag-Bedingungen angezogen und anschließend bis zu sechs Tage im Dunkeln gehalten. An jedem Tag der Stress-Behandlung wurden die Pflanzen beider Linien fotografiert.

### 3.4.4.2 Chlorophyll und Carotinoide

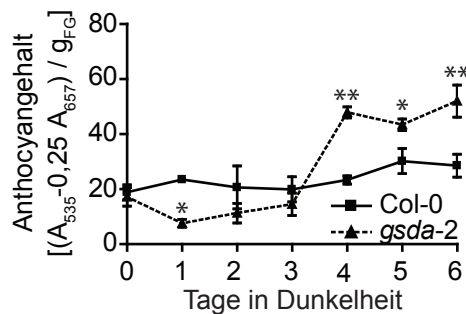
Zur Quantifizierung der unterschiedlich starken Gelbfärbung der Blätter des Wildtyps und der Linie *gsda-2* [KO 28] wurde der grüne Blattfarbstoff Chlorophyll extrahiert. Dazu wurde gefrorene Blattmaterial mit verdünntem Aceton (80 % v/v) versetzt und über Nacht bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Bei dieser Methode werden neben Chlorophyll a und b auch Carotinoide (Carotine und Xanthophylle) extrahiert. Zur besseren Beurteilung der Grünfärbung während der Seneszenz eines Blattes kann das Verhältnis von Gesamtchlorophyllmenge (a+b) zu Gesamtcarotinoidmenge (c+x) herangezogen werden. Während der Seneszenz verändert sich die Blattfärbung von grün zu gelb, dies spiegelt sich auch in einem sinkenden Verhältnis von Chlorophyllen (a+b) zu Carotinoiden (c+x) wider. Die Analyse dieses Verhältnisses für alle Proben des Wildtyps und der Linie *gsda-2* zeigte, dass für den Wildtyp nur eine schwache Veränderung zu beobachten ist. So sank der Wert an Tag 5 und 6 minimal ab, schwankte aber zuvor um den Anfangswert von 5,24 (Abb. 3.36). Eine deutlichere Veränderung war für die Linie *gsda-2* an Tag 5 und 6 feststellbar. Das Verhältnis von Chlorophyll zu Carotinoiden sinkt von anfänglich 5,07 (Tag 0) auf 3,48 an Tag 6. Auch hier war innerhalb der ersten vier Tage in Dunkelheit keine Änderung zu erkennen.



**Abbildung 3.36 – Analyse von Chlorophyll und Carotinoiden während der sechstägigen Dunkelstress-Behandlung.** Pflanzen des Wildtyps und der Linie *gsda-2* wurden drei Wochen unter Langtag-Bedingungen angezogen und anschließend bis zu sechs Tage im Dunkeln gehalten. An jedem Tag der Stress-Behandlung wurden die Blätter von 8-12 Pflanzen jeder Linie als Gemisch geerntet und für die Quantifizierung von Chlorophyll a und b sowie des Verhältnisses von Chlorophyll zu Carotinoiden genutzt. Für jede der Analysen wurden drei unabhängige Extrakte aus dem Gemisch der Proben hergestellt. Dargestellt sind für jede Analyse die Mittelwerte und deren Standardabweichungen. Die statistische Signifikanzanalyse wurde mittels zweiseitiger ANOVA, gekoppelt mit einem Bonferroni-Posttest, durchgeführt. \*=  $p < 0,05$

### 3.4.4.3 Anthocyane

Zusätzlich zur Quantifizierung von Chlorophyll und Carotinoiden wurde der Gehalt an Anthocyanen bestimmt. Die Absorption entsprechender Extrakte wurde bei 535 nm sowie 657 nm bestimmt (2.2.4). Bei beiden Genotypen war ein Anstieg des Anthocyanengehalts zu beobachten (Abb. 3.37). Während jedoch für die Wildtypproben lediglich eine leichte Zunahme an Tag 5 und 6 zu messbar war, stieg der Gehalt an Anthocyanen in der Mutante ab Tag 4 deutlich an.

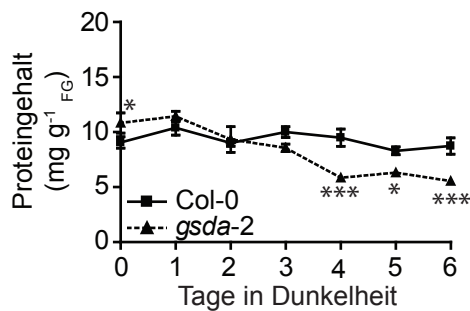


**Abbildung 3.37 – Analyse des Anthocyanengehalts während der sechstägigen Dunkelstress-Behandlung.** Pflanzen des Wildtyps und der Linie *gsda-2* wurden drei Wochen unter Langtag-Bedingungen angezogen und anschließend bis zu sechs Tage im Dunkeln gehalten. An jedem Tag der Stress-Behandlung wurden die Blätter von 8-12 Pflanzen jeder Linie als Gemisch geerntet und für die Bestimmung des Anthocyanengehalts genutzt. Für jede der Analysen wurden drei unabhängige Extrakte aus dem Gemisch der Proben hergestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung. Die statistische Signifikanzanalyse wurde mittels zweiseitiger ANOVA, gekoppelt mit einem Bonferroni-Posttest, durchgeführt. \*=  $p < 0,05$ ; \*\*=  $p < 0,01$

### 3.4.4.4 Lösliche Proteine, RuBisCO und GSDA

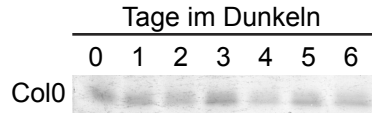
Für alle Blattproben der Linie *gsda-2* sowie des Wildtyps wurde ein Proteinrohextrakt aus dem gefohrenen Material hergestellt. Dieser wurde anschließend für eine photometrische Bestimmung des Gesamtproteingehalts nach Bradford genutzt (2.2.3).

Vor dem Wechsel der Lichtbedingungen von Langtag zu Dunkelheit (Tag 0) wurde ein durchschnittlicher Proteingehalt von  $9.05 \text{ mg g}_{\text{FG}}^{-1}$  in den Extrakten des Wildtyps gemessen. In den Extrakten der Linie *gsda-2* konnten  $10.83 \text{ mg g}_{\text{FG}}^{-1}$  nachgewiesen werden. Der Gehalt löslicher Proteine in Extrakten des Wildtyps schwankte während der kompletten Dunkelphase um den Ausgangswert (Abb. 3.38). Im Gegensatz dazu zeigt die Analyse der Extrakten der Linie *gsda-2* einen sinkenden Proteingehalt ab Tag 2 des Zeitkurses (Abb. 3.38).



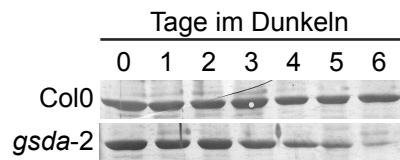
**Abbildung 3.38 – Analyse des Proteingehalts während der sechstägigen Dunkelstress-Behandlung.** Pflanzen des Wildtyps und der Linie *gsda-2* wurden drei Wochen unter Langtag-Bedingungen angezogen und anschließend bis zu sechs Tage im Dunkeln gehalten. An jedem Tag der Stress-Behandlung wurden die Blätter von 8-12 Pflanzen jeder Linie als Gemisch geerntet und für die Bestimmung des Proteingehalts genutzt. Für jede der Analysen wurden drei unabhängige Extrakte aus dem Gemisch der Proben hergestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung. Die statistische Signifikanzanalyse wurde mittels zweiseitiger ANOVA, gekoppelt mit einem Bonferroni-Posttest, durchgeführt. \*=  $p < 0.05$ ; \*\*\*=  $p < 0.001$

Neben der Gesamtproteinmenge wurde der GSDA-Gehalt im Wildtyp und der *gsda*-Mutante [KO 28] überprüft. Dazu wurden Blattrohextrakte für jeden Tag des Zeitkurses hergestellt, mittels Gelelektrophorese aufgetrennt und nach einem Western-Blot mit dem polyklonalen GSDA-spezifischen Antiserum detektiert (2.2.3). Das Ergebnis der Detektion im Wildtyp ist in Abbildung 3.39 dargestellt. Trotz zunehmender Dauer der Dunkelheit war keine deutliche Veränderung der GSDA-Menge in den Extrakten in Bezug auf das Frischgewicht zu beobachten. Da in der Mutante erwartungsgemäß keine GSDA nachgewiesen werden konnte, ist diese nicht dargestellt.



**Abbildung 3.39 – Analyse der GSDA-Proteinmenge im Wildtyp während der sechstägigen Dunkelstress-Behandlung.** Pflanzen des Wildtyps wurden drei Wochen unter Langtag-Bedingungen angezogen und anschließend bis zu sechs Tage im Dunkeln gehalten. An jedem Tag der Stress-Behandlung wurden die Blätter von 8-12 Pflanzen als Gemisch geerntet und für Herstellung von Blattrohextrakten genutzt. Diese wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach einem Western Blot mit Hilfe des polyklonalen GSDA-spezifischen Antiserums detektiert.

Gleichzeitig wurde durch die unspezifische Hintergrunddetektion des Antiserums eine starke Abnahme der Menge der großen Untereinheit der RuBisCO in den Proben der *gsda-2* Mutante im Verlauf der Dunkelphase sichtbar (Abb. 3.40). Für den Wildtyp war lediglich eine leichte Abnahme ab Tag 4 zu beobachten.



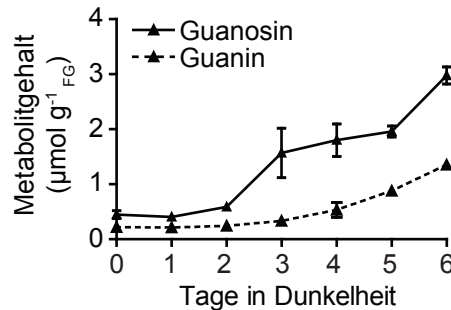
**Abbildung 3.40 – Proteinmenge der großen Untereinheit der RuBisCO während der sechstägigen Dunkelstress-Behandlung.** Pflanzen des Wildtyps und der Linie *gsda-2* wurden drei Wochen unter Langtag-Bedingungen angezogen und anschließend bis zu sechs Tage im Dunkeln gehalten. An jedem Tag der Stress-Behandlung wurden die Blätter von 8-12 Pflanzen als Gemisch geerntet und für Herstellung von Blattrohextrakten genutzt. Diese wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und nach einem Western Blot mit Hilfe des polyklonalen GSDA-spezifischen Antiserums detektiert (Abb. 3.39). Dabei wurde im Hintergrund auch die große Untereinheit der RuBisCO unspezifisch detektiert.

#### 3.4.4.5 Akkumulation von Guanosenin und Guanin

Zusätzlich zu den oben beschriebenen Analysen, wurde untersucht ob sich, während des sechstägigen Zeitkurses, die Mengen von Guanosenin und Guanin in der Verlustmutante verändern. Unabhängig von der Dauer der Dunkelheit war in keiner Wildtypprobe Guanosenin oder Guanin im Chromatogramm identifizierbar. Aus diesem Grund ist in Abbildung 3.41 der Metabolitgehalt im Verlauf der sechs Tage nur für die Linie *gsda-2* dargestellt.

Vor Beginn der Dunkelphase (Tag 0) konnte in einem Gramm Blattmaterial ein Guanosin Gehalt von 0.45  $\mu\text{mol}$  nachgewiesen werden. Nach einem Tag in Dunkelheit hatte sich der Guanosin Gehalt im Vergleich zum Vortag nicht verändert, auch an Tag 2 war nur eine schwache Veränderung messbar. Am dritten Tag des Zeitkurses hingegen ließ sich eine deutliche Veränderung feststellen. Es wurde eine circa dreifach erhöhte Guanosinkonzentration ( $1.56 \mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$ ) gegenüber den vorherigen Tagen bestimmt. Im Verlauf der Dunkelphase stieg der Guanosin Gehalt in den Blättern weiter an, sodass an Tag 6 ein Gehalt von  $2.98 \mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$  Guanosin quantifizierbar war. Dies entsprach einer sechsfach

höheren Guanosinkonzentration in den Blättern als zu Beginn des Zeitkurses. Der Guaningehalt zeigte einen ähnlichen Verlauf und stieg kontinuierlich an, sodass der Wert an Tag 6 mit  $1.35 \mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$  ebenfalls circa sechsmal höher war als an Tag 0 ( $0.21 \mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$ ). Der Anstieg der Metabolitkonzentrationen lässt einen verstärkten Stofffluss durch den Purinnukleotidabbauweg während der Dunkelphase vermuten.

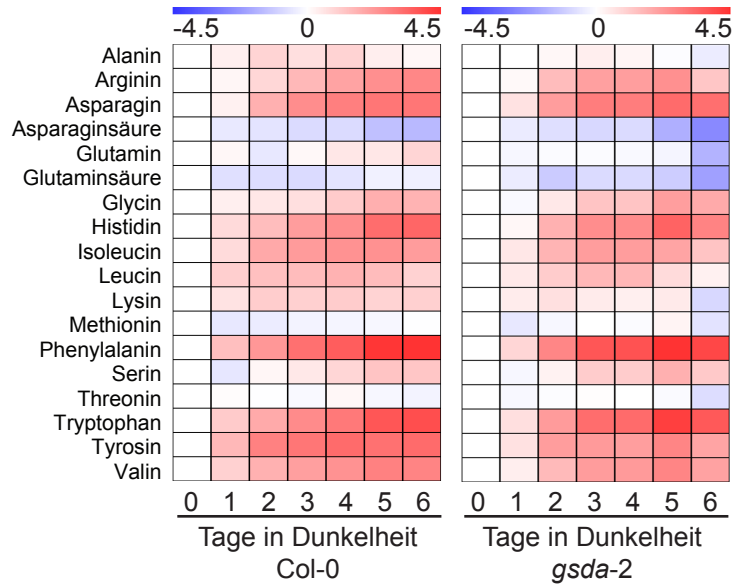


**Abbildung 3.41 – Analyse des Guanin- und Guanosingehalts während der sechstägigen Dunkelstress-Behandlung.** Pflanzen des Wildtyps und der Linie *gsda-2* wurden drei Wochen unter Langtag-Bedingungen angezogen und anschließend bis zu sechs Tage im Dunkeln gehalten. An jedem Tag der Stress-Behandlung wurden die Blätter von 8-12 Pflanzen jeder Linie als Gemisch geerntet und für die Bestimmung des Guanin- und Guanosingehalts genutzt. Für jede der Analysen wurden drei unabhängige Extrakte aus dem Gemisch der Proben hergestellt. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung.

#### 3.4.4.6 Aminosäuren

Durch anhaltende Dunkelheit wird Kohlenstoffmangel in der Pflanze induziert, als eine Folge davon wurde eine Änderung des Aminosäureprofils nachgewiesen. So konnte zum Beispiel gezeigt werden, dass während einer viertägigen Dunkelphase der Asparagingehalt in verschiedenen Geweben von Mais ansteigt (Brouquisse *et al.*, 1998). Ähnliches konnte auch für den überirdischen Teil 18-Tage alter Arabidopsispflanzen nachgewiesen werden (Miyashita und Good, 2008). Darüber hinaus wurde gezeigt, dass bei anhaltender Dunkelheit verzweigt-kettige und aromatisch Aminosäuren vermehrt als alternative respiratorische Substrate genutzt werden (Araújo *et al.*, 2011).

Aufgrund dieses Zusammenhangs zwischen anhaltender Dunkelheit und dem Aminosäureprofil der Pflanze wurden die Zeitkursproben des Wildtyps und der Linie *gsda-2* hinsichtlich ihres Aminosäuregehaltes untersucht. Nach einer ethanolischen Extraktion wurden die Proben chromatographisch aufgetrennt (2.2.5). Einen Überblick der Ergebnisse gibt die Heatmap in Abbildung 3.42, die entsprechenden Konzentrationen der einzelnen Aminosäuren sind in den Tabellen B.1 und B.2 (Anhang) aufgeführt. Bei beiden Linien war ein ansteigender Gehalt vieler Aminosäuren zu beobachten. Besonders stark stiegen die Konzentrationen von Phenylalanin, Tryptophan, Tyrosin, Valin, Histidin und Asparagin an.

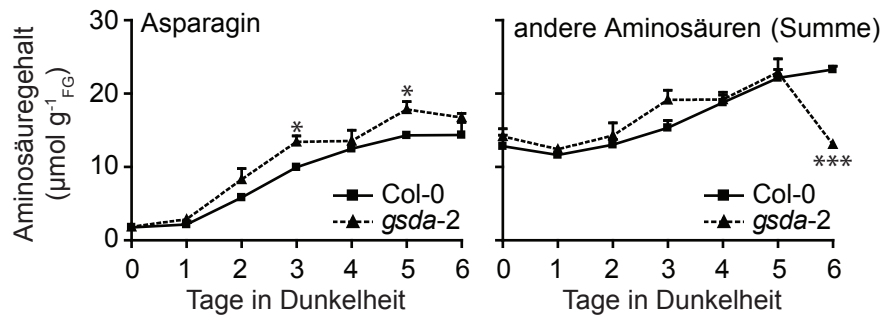


**Abbildung 3.42 – Analyse des Aminosäureprofils während der sechstägigen Dunkelstress-Behandlung.** Pflanzen des Wildtyps und der Linie *gsda-2* wurden drei Wochen unter Langtag-Bedingungen angezogen und anschließend bis zu sechs Tage im Dunkeln gehalten. An jedem Tag der Stress-Behandlung wurden die Blätter von 8-12 Pflanzen jeder Linie als Gemisch geerntet und für die Quantifizierung der einzelnen Aminosäuren genutzt. Für jede der Analysen wurden drei unabhängige Extrakte aus dem Gemisch der Proben hergestellt, derivatisiert und mit Umkehrphasen Chromatographie aufgetrennt. Die Mittelwerte des Gehalts der einzelnen Aminosäuren in Blättern des Wildtyps und der Linie *gsda-2* wurden auf den jeweiligen Mittelwert an Tag 0 normiert. Dargestellt ist der log<sub>2</sub> Wert des Verhältnisses von Tag X zu Tag 0.

Bemerkenswert ist das der Gehalt von Asparagin in den Blättern zum Ende der Dunkelphase fast genauso hoch war wie der Gehalt aller anderen Aminosäuren zusammen (Abb. 3.43). Vor Beginn der Dunkelphase (Tag 0) konnten  $1.75 \mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$  Asparagin in den Blättern nachgewiesen werden. Bereits nach einem Tag konnte ein leichter Anstieg auf  $2.17 \mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$  gemessen werden. Eine deutlich stärkere Erhöhung des Niveaus dieser Aminosäure in den Wildtypblättern war an den darauffolgenden vier Tagen (Tag 2 bis 5) quantifizierbar. Von Tag 5 zu Tag 6 wurde keine Veränderung gemessen, es scheint als habe die Asparaginkonzentration ein Plateau bei circa  $14.3 \mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$  erreicht. Damit war die Konzentration 8,2-mal höher als vor Beginn der Dunkelphase. Vergleicht man diese Resultate mit denen der Linie *gsda-2*, so wird deutlich, dass in den Blättern der Mutante ein ähnlicher Verlauf der Asparaginkonzentration während der Dunkelphase zu beobachten war. Jedoch war die Konzentration an jedem der Tage immer noch etwas höher als in den Blättern des Wildtyps (Abb. 3.43). Die höchste Asparaginkonzentration wurde mit  $17.85 \mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$  an Tag 5 erreicht, dies entspricht einer 9.6-mal höheren Konzentration im Vergleich zu Tag 0. Am letzten Tag der Dunkelphase sank der Wert wieder leicht ab, auf  $16.74 \mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$ . Die Zunahme von Asparagin während der anhaltenden Dunkelheit stimmt mit den Beobachtungen in Mais und 18-Tage alten Arabidopsispflanzen überein (Brouquisse *et al.*, 1998; Miyashita und Good, 2008). Auch der Anstieg des Gehalts von Phenylalanin, Valin, Tryptophan



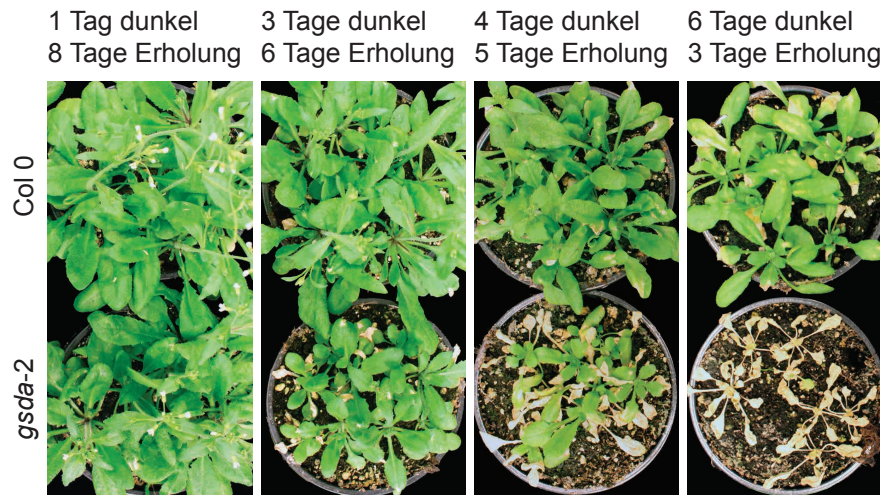
tophan, Tyrosin und Histidin während der Dunkelphase stimmt mit veröffentlichten Beobachtungen überein (Miyashita und Good, 2008).



**Abbildung 3.43 – Analyse des Asparagingehalts im Vergleich zu den übrigen Aminosäuren während der sechstägigen Dunkelstress-Behandlung.** Pflanzen des Wildtyps und der Linie *gsda-2* wurden drei Wochen unter Langtag-Bedingungen angezogen und anschließend bis zu sechs Tage im Dunkeln gehalten. An jedem Tag der Stress-Behandlung wurden die Blätter von 8-12 Pflanzen jeder Linie als Gemisch geerntet und für die Quantifizierung der einzelnen Aminosäuren genutzt. Dargestellt sind die Mittelwerte und deren Standardabweichung ( $n = 3$ ). Die statistische Signifikanzanalyse wurde mittels zweiseitiger ANOVA, gekoppelt mit einem Bonferroni-Posttest, durchgeführt. \* =  $p < 0.05$ ; \*\*\* =  $p < 0.001$

#### 3.4.4.7 Phänotyp der Pflanzen in der Erholungsphase

Am Ende der jeweiligen Dunkelphase wurden die Pflanzen zurück in den Langtag gebracht. Insgesamt neun Tage nach Beginn der Dunkelphase wurden alle Pflanzen nochmals fotografiert (siehe Schema Abb. 3.34). Dies führte dazu, dass im Moment der Dokumentation die Erholungsphasen unterschiedlich lang waren. Der Einfluss des *GSDA*-Verlusts auf den Phänotyp war jedoch bereits zu diesem Zeitpunkt sichtbar. In Abbildung 3.44 sind Pflanzen dargestellt, die einen Tag beziehungsweise drei, vier oder sechs Tage im Dunkeln standen. Zu allen Zeitpunkten war deutlich zu erkennen, dass sich die Wildtyppflanzen wieder erholten. Die Pflanzen der Linie *gsda-2* erholten sich nach einem Tag Dunkelheit vollständig. Nach drei Tagen im Dunkeln waren wenige Blätter abgestorben, der Großteil der Pflanze war grün. Die Pflanzen waren jedoch deutlich kleiner als die des Wildtyps. Beim Übergang von drei zu vier Tagen im Dunkeln machte sich der Verlust der *GSDA* stärker bemerkbar. Bereits während der Dunkelphase des Zeitkurses wurde deutlich, dass die Blätter nach vier Tagen Dunkelheit deutlich chlorotischer waren als die des Wildtyps. Dieser Unterschied setzte sich auch in der Erholungsphase fort. Während die Blätter der Wildtyppflanzen nur leichte Schäden aufwiesen, waren bei den Pflanzen der Linie *gsda-2* fast die Hälfte der Blätter abgestorben. Dieser Unterschied war nach fünf Tagen im Dunkeln noch stärker sichtbar (nicht gezeigt). Die sechs Tage andauernde Dunkelphase überlebte keine der Mutanten.



**Abbildung 3.44 – Phänotypische Analyse der Mutanten während der Erholungsphase.** Pflanzen des Wildtyps und der Linie *gsda-2* wurden drei Wochen unter Langtag-Bedingungen angezogen und anschließend bis zu sechs Tage im Dunkeln gehalten. Im Anschluss an die jeweilige Dunkelphase wurden Töpfe jeder Linie wieder in den Langtag gebracht. Neun Tage nach Beginn der Dunkelbehandlung wurden diese Töpfe nochmals fotografiert. Die Abbildung zeigt exemplarisch je einen Topf pro Linie von Pflanzen die 1, 3, 4 oder 6 Tage im Dunkeln standen.

### 3.5 Die Rolle der Guanosindeaminase im Purinnukleotidabbau

Zur Beurteilung der Rolle der Guanosindeaminase im Purinnukleotidabbau von *A. thaliana* wurden die Metabolitprofile von Kreuzungen analysiert, bei denen ein Verlust von zwei Enzymen des Stoffwechselweges vorlag. Bei diesen Doppelmutanten handelte es sich um Linie *gsda-2 nsh1-1* (Guanosindeaminase und Nukleosidhydrolase 1) sowie die Linie *gsda-2 nsh1-2*, bei der eine weitere T-DNA-Insertionslinie der NSH1 für die Kreuzung genutzt wurde. Darüber hinaus wurde auch eine Kreuzung der Linien *gsda-2* und *hgp1-1* analysiert. Hier lag neben dem Verlust der Guanosindeaminase zusätzlich ein Verlust der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase vor. Aus den Vergleichen der einzelnen Analysen der ließen sich Rückschlüsse auf den Stofffluss im Purinnukleotidabbau ziehen.

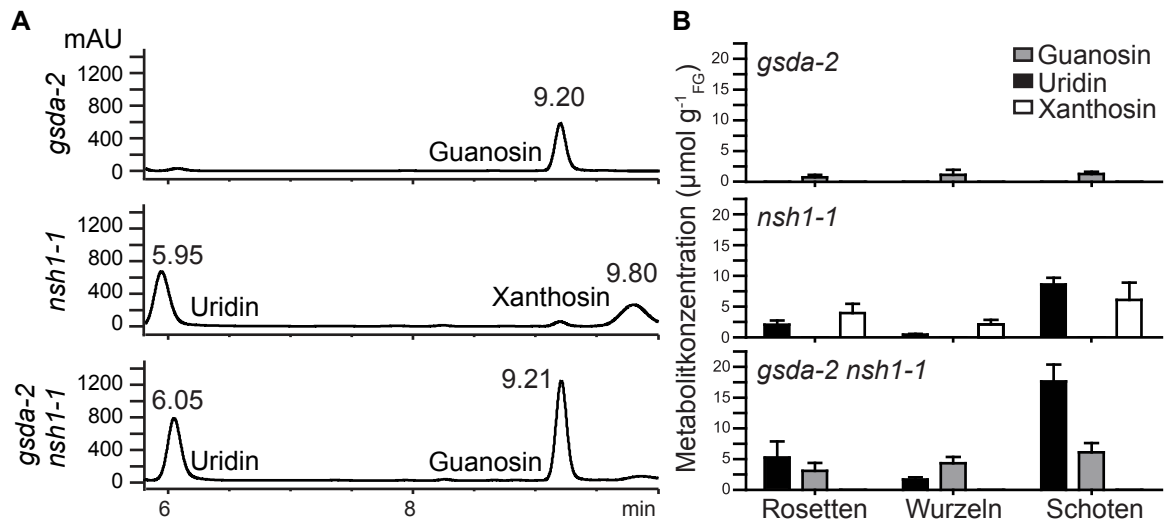
#### 3.5.1 Analyse der *gsda-nsh1*-Doppelmutanten

Die Nukleosidhydrolase 1 (NSH1) ist im Purinnukleotidstoffwechsel am Abbau von Xanthosin und Inosin zu Xanthin und Hypoxanthin beteiligt (Reaktion 6 in Abbildung 1.2). Darüber hinaus katalysiert dieses Enzym auch die Hydrolyse von Uridin im Pyrimidinnukleotidstoffwechsel (Jung 2009 und 2011, Riegler 2011). Für die Mutante *nsh1-1* wurde bereits eine Akkumulation von Xanthosin und Uridin gezeigt (Jung *et al.*, 2009 und 2011, Riegler *et al.*, 2011).

Bislang war nicht geklärt, ob der Xanthosingehalt in der Pflanze gleichermaßen durch den Abbau von Xanthosinmonophosphat (XMP) und Guanosinmonophosphat (GMP) gespeist wird. Die Dephospho-

rylierung dieser Nukleotide wird durch bisher unbekannte 5'-Nukleotidphosphatasen katalysiert (Reaktion 5 in Abbildung 1.2).

Mithilfe der *gsda-nsh1*-Doppelmutanten ließ sich nun ermitteln, wie groß der Beitrag des Weges über GMP und Guanodin zum Xanthosin Gehalt in der Pflanze ist. In einer solchen Doppelmutante kann Guanodin nicht mehr zu Xanthosin umgesetzt werden, dies sollte wie in den Linien *gsda-1* und *gsda-2* zu einer Akkumulation von Guanodin führen. Gleichzeitig sollte demzufolge der Gehalt von Xanthosin in den Doppelmutanten geringer sein als in den *nsh1*-Mutanten.



**Abbildung 3.45 – Metabolitanalyse in der Doppelmutante *gsda-2 nsh1-1*.** **A:** Metabolitextrakte von trockenen Samen der Linien *gsda-2* [KO 28], *nsh1-1* [KO 34] sowie der Doppelmutante *gsda-2 nsh1-1* [C47] wurden mittels Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie aufgetrennt und mit einem Diodenarray-UV-Detektor analysiert. **B:** Quantifizierung der Metabolite in Rosetten, Wurzeln und Schoten 10 Wochen alter Pflanzen der Linien *gsda-2*; *nsh1-1* sowie der Doppelmutante *gsda-2 nsh1-1*. mAU, milli absorption units (Milli-Absorptionseinheiten)

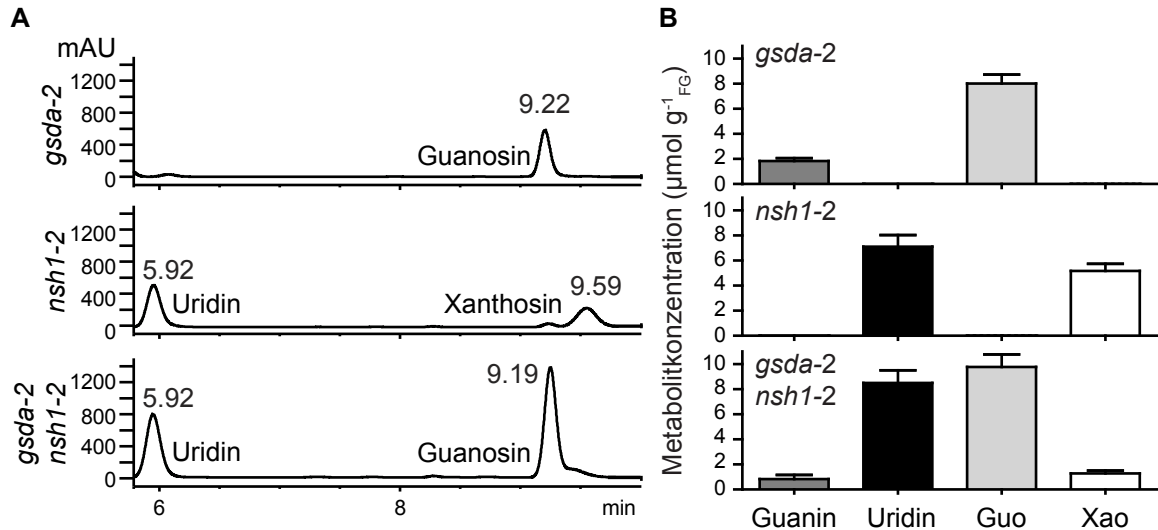
Die Analyse der Doppelmutante *gsda-2 nsh1-1* [C47] im Vergleich zu den Einzelmutanten wurde sowohl mit trockenen Samen durchgeführt als auch mit Rosetten, Wurzeln und Schoten zehn Wochen alter Pflanzen (Abb. 3.45). Für die Gewebeanalysen der seneszenten Pflanzen wurden die Metabolitkonzentrationen zudem quantifiziert.

In Abbildung 3.45 A sind die Chromatogramme der Linien *gsda-2* [KO 28], *nsh1-1* [KO 34] sowie der Doppelmutante *gsda-2 nsh1-1* [C47] vergleichend dargestellt. Wie erwartet war in der Linie *nsh1-1* eine Akkumulation von Uridin und Xanthosin zu erkennen. Die Identität dieser Signale wurde mit Hilfe von Massenspektrometrie bestätigt (Abb. A.7, Anhang). Die untere Spur zeigt die Analyse der Doppelmutante. Hier wurde eine Akkumulation von Uridin und Guanodin detektiert. Bemerkenswert ist, dass kein Xanthosin in der Doppelmutante nachgewiesen wurde. Die Quantifizierung der Metabolite in den Geweben seneszenten Pflanzen der Linie *gsda-2* zeigt, dass Guanodin sowohl in Rosetten und Wurzeln als auch in Schoten akkumulierte (Abb. 3.45 B). Ähnliches war für die Linie *nsh1-1* zu

beobachte. Die Akkumulation von Uridin und Xanthosin war ebenfalls in allen drei Geweben quantifizierbar. Die Menge beider Metabolite war in den Schoten deutlich höher. Auffällig ist auch, dass in den Schoten mehr Uridin als Xanthosin messbar war, während in den Rosetten und den Wurzeln die Xanthosinkonzentration höher. Die Analyse der Doppelmutante zeigt, dass auch in den zehn Wochen alten Pflanzen Xanthosin messbar war. Guanosin und Uridin hingegen waren in Rosetten, Wurzeln und Schoten quantifizierbar. Wieder wurden in Schoten die höchsten Metabolitkonzentrationen bestimmt. Außerdem wird deutlich, dass die Konzentrationen beider Metabolite höher waren als in den entsprechenden Einzelmutanten.

Zusätzlich zu den beschriebenen Linien wurden Samen der Doppelmutante *gsda-2 nsh1-2* [C31] im Vergleich zu Samen der Einzelmutanten analysiert. In Abbildung 3.46 A sind die entsprechenden Chromatogramme dargestellt. Zunächst sollte erwähnt werden, dass auch in der Linie *nsh1-2* [KO 33] der Verlust der NSH1 zu einer Akkumulation von Uridin und Xanthosin führt. Die Analyse der Doppelmutante *gsda-2 nsh1-2* [C31] wiederum zeigt eine Akkumulation von Uridin und Guanosin. Dieses Ergebnis stimmt mit den Beobachtungen für die Linie *gsda-2 nsh1-1* [C47] überein.

In einem zweiten, unabhängigen Experiment wurden nochmals Samen derselben Linien analysiert, um die entsprechenden Metabolite zu quantifizieren (Abb. 3.46 B). Guanin konnte in die Quantifizierung einbezogen werden, da zum Zeitpunkt des Experiments die Identität des Signals bekannt war. Die Nukleobase wurde in Samen der Linie *gsda-2* und in denen der Doppelmutante *gsda-2 nsh1-2* [C31] detektiert und quantifiziert. Es war kein Einfluss des NSH1-Verlusts auf die Guaninkonzentration erkennbar. Was bei diesem Experiment auffiel, war die Detektion von Xanthosin in der Doppelmutante. Dies wurde in den vorherigen Experimenten nicht beobachtet. Ein Grund dafür war wahrscheinlich die Optimierung des Extraktionsprotokolls für Samen. Diese hat zwischen den zuerst beschriebenen Versuchen und dem letzten Experiment stattgefunden. Gleichzeitig geht aus der Quantifizierung aber hervor, dass die Konzentration von Xanthosin hier deutlich geringer ist als in der Linie *nsh1-2*. Mit durchschnittlich  $1,27 \mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$  beträgt sie in der Doppelmutante nur noch ein Viertel der Konzentration in der Linie *nsh1-2*. Es kann demzufolge immer noch davon ausgegangen werden, dass der größte Teil des Xanthosins durch die Deaminierung von Guanosin entsteht.



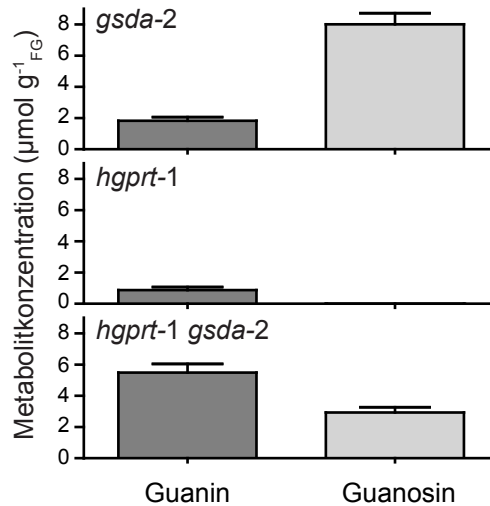
**Abbildung 3.46 – Metabolitanalyse in der Doppelmutante *gsda-2 nsh1-2*.** Metabolitextrakte von trockenen Samen der Linien *gsda-2* [KO 28], *nsh1-2* [KO 33] sowie der Doppelmutante *gsda-2 nsh1-2* [C31] wurden mittels Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie aufgetrennt und mit einem Diodenarray-UV-Detektor analysiert. **A:** Darstellung der Chromatogramme der entsprechenden Linien. **B:** Quantifizierung der Metabolite in trockenen Samen der entsprechenden Linien. mAU, milli absorption units (Milli-Absorptionseinheiten)

### 3.5.2 Analyse der *gsda-hgprt*-Doppelmutante

Neben den bereits beschriebenen Doppelmutanten wurden Samen einer Kreuzung untersucht in der außer des *GSDA*-Verlusts ein Verlust des Gens der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase (HGPRT) vorlag. Dieses Enzym katalysiert das Recycling der Nucleobasen Guanin und Hypoxanthin zu den Nucleotiden GMP und IMP (Reaktion 9 in Abb. 1.2). Diese Reaktion gehört zum sogenannten „salvage-pathway“, der die Synthese der Nucleotide aus ihren Abbauprodukten ermöglicht.

Die Analyse der entsprechenden Einzel- und Doppelmutanten sollte folgende Fragen beantworten: (i) Ist in der *hgprt*-Mutante eine Akkumulation von Hypoxanthin und/oder Guanin nachweisbar? (ii) Wie wirkt sich der Verlust der *GSDA* auf das Metabolitprofil der *hgprt*-Mutante aus? Bei letzter Frage besteht die Vermutung, dass sich die Menge von Guanin in der Doppelmutante im Vergleich zur Linie *gsda-2* noch erhöht, da keine Möglichkeit mehr besteht Guanin in GMP umzuwandeln.

Zur Beantwortung beider Fragen wurden die Metabolite in Samen der Linien *gsda-2* [KO 28], *hgprt-1* [KO 29] und der Doppelmutante *hgprt-1 gsda-2* [C68] analysiert und quantifiziert. In der *hgprt*-Mutante konnte eine geringe Akkumulation von Guanin nachgewiesen werden (Abb. 3.47). Es wurde jedoch kein Signal für Hypoxanthin detektiert. In der Doppelmutante wurden Guanin und Guanosin nachgewiesen.



**Abbildung 3.47 – Metabolitanalyse in der Doppelmutante *hgprt-1 gsda-2*.** Metabolitextrakte von trockenen Samen der Linien *gsda-2* [KO 28], *hgprt-1* [KO 29] sowie der Doppelmutante *hgprt-1 gsda-2* [C68] wurden mittels Ionenpaar-Umkehrphasen-Chromatographie aufgetrennt und mit einem Diodenarray-UV-Detektor analysiert und die Metabolite anschließend quantifiziert.

Die Konzentration von Guanin war dabei deutlich höher als in den entsprechenden Einzelmutanten (Abb. 3.47). Dies bestätigt die Vermutung, dass der Verlust der HGPRT die Reaktion von Guanin zu GMP verhindert und dadurch der Guaninspiegel ansteigt. Gleichzeitig zeigt die Quantifizierung, dass die Konzentration von Guanosin in Samen der Doppelmutanten deutlich geringer ist als in Samen der Linie *gsda-2*. Hier kann spekuliert werden, dass die fehlende Umsetzung von Guanin zu GMP die Dephosphorylierung dieses Metabolits verlangsamt. Vorstellbar wäre aber auch, dass die fehlende Phosphoribosyl-Transferaseaktivität und damit ein eventuell sinkender GMP-Spiegel die Hydrolyse von Guanosin positiv regulieren. Eine dritte Möglichkeit wäre das Vorhandensein eines sogenannten „futile cycle“, also eines Zyklus’ bei dem katabole und anobole Reaktionen zeitgleich ablaufen. Es ist möglich, dass ein solcher Zyklus zwischen Abbau und Recycling von GMP besteht. Dieser würde durch den Verlust der HGPRT unterbrochen werden, was zur Akkumulation von Guanin führen würde.

# Diskussion

## 4.1 In Pflanzen ist eine Guanosindeaminase am Purinnukleotidabbau beteiligt.

Für Säuger und Bakterien wurde gezeigt, dass die Deaminierung des Guanylrestes der Nukleotide stattfindet nachdem die Base Guanin gebildet wurde. Diese Reaktion wird bei den meisten Organismen durch Aminohydrolasen katalysiert. Für einige Prokaryoten konnte jedoch gezeigt werden, dass Proteine der Cytidin-/ Deoxycytidylat-Deaminase Superfamilie die Deaminierung von Guanin katalysieren (1.1.3). Ausgehend von diesen Erkenntnissen war das Ziel der hier vorliegenden Arbeit die Identifizierung und Charakterisierung einer Guanindeaminase in *Arabidopsis thaliana*. Im folgenden Abschnitt werden die Beobachtungen zur Deaminierung des Guanylrestes in *Arabidopsis thaliana* mit den Analysen des Purinabbaus anderer Organismen verglichen.

### 4.1.1 Identifizierung der Guanosindeaminase in *Arabidopsis thaliana*

Mit Hilfe eines Proteinsequenzvergleichs zwischen der Guanindeaminase von *Bacillus subtilis* und den Proteinen von *Arabidopsis thaliana* konnten fünf potentielle Guanindeaminasen in der Pflanzen identifiziert werden (3.1). Alle Kandidaten gehören zur Cytidin-/ Deoxycytidylat-Deaminase Superfamilie. Beim Vergleich mit dem bakteriellen Protein erwies sich das durch den Locus At5g28050 kodierte Protein als bester Kandidat. In diesem Protein sind Aminosäuren konserviert, für die beim bakteriellen Protein eine Beteiligung an der Bindung von Guanin nachgewiesen werden konnte.

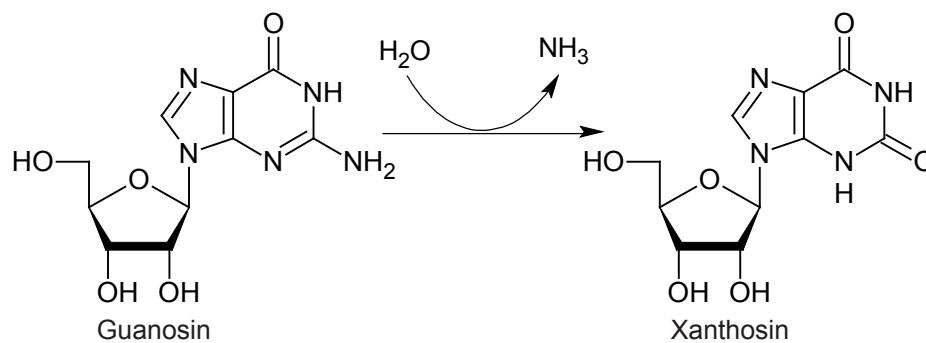
Zusätzlich zur Konservierung wichtiger Aminosäuren im durch At5g28050 kodierten Protein, deuten auch Coexpressiondaten darauf hin, dass dieser Kandidat am Purinnukleotidabbau beteiligt ist. Die Suche in entsprechenden Datenbanken (Genevestigator, CSB.DB und ATTED-II) zeigte eine Coexpression von At5g28050 mit *NSH1*, welches für die Nucleosidhydrolase 1 kodiert. Dieses Enzym ist im Purinnukleotidkatabolismus an der Hydrolyse von Xanthosin und Inosin beteiligt (Jung *et al.*, 2009 und 2011, Riegler *et al.*, 2011).

Darüber hinaus wurde für das durch At4g20960 kodierte Enzym bereits eine Beteiligung an der Biosynthese von Vitamin B2 (Riboflavin) nachgewiesen (Fischer *et al.*, 2004). Das Gen At1g68720 kodiert für eine im Chloroplasten lokalisierte tRNA-Adenosin Deaminase Arginin (TADA) (Delannoy

*et al.*, 2009). Das durch At1g48175 kodierte Protein ist hochkonserviert in Pflanzen und ist Homolog zur tRNA-spezifischen Adenosindeaminase 2 in Menschen. Laut TAIR-Datenbank stellt zudem die TADA den nächsten Verwandten dieses Proteins in Arabidopsis dar. Verlustmutanten von At1g48175 in *A. thaliana* sind embryolethal. Aus diesen Informationen lässt sich schließen, dass At1g48175 für die tRNA-spezifische Adenosindeaminase 2 in Arabidopsis kodiert (Dahncke und Witte, 2013).

Orthologe des Gens At3g05300 sind nur in wenigen Mitgliedern der *Brassicaceae* konserviert. Laut EST-Daten wird das entsprechende Gen in *Brassica rapa* und *Raphanus raphanistrum* exprimiert, in Arabidopsis konnte aber kein Transkript nachgewiesen werden (Dahncke und Witte, 2013). Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei At3g05300 um ein Pseudogen handelt.

At5g28050 war demnach der beste Kandidat für die weitere Untersuchung. Die biochemische Analyse des aufgereinigten Proteins zeigte jedoch keine Guanindeaminaseaktivität. Viel mehr konnte die Deaminierung von Guanodin nachgewiesen werden (Reaktion in Abb. 4.1). Dieses Ergebnis wird zusätzlich durch die Akkumulation von Guanodin in den Mutanten *gsda-1* und *gsda-2* gestützt. Dies ist insofern erstaunlich, als dass ein für eine Guanindeaminase kodierendes Gen bislang nicht identifiziert wurde.



**Abbildung 4.1 – Deaminierung von Guanodin.** Dargestellt ist die, durch die Guanindeaminase katalysierte, Deaminierung von Guanodin zu Xanthosin. Dabei wird die exocyclische Aminogruppe des Guanodins hydrolytisch und irreversibel abgespalten.

Für Säuger wurde Guanindeaminaseaktivität in Milchdrüsen-Homogenisaten von Ratten (Williams und Turner, 1957) sowie in humanem Serum nachgewiesen (Jones *et al.*, 1983; Kalkan *et al.*, 1999). Folgende Analysen zeigten jedoch, dass die beobachtete Guanindeaminaseaktivität auf eine gekoppelte Reaktion der Purin-Nukleosid-Phosphorylase und der Guanindeaminase zurückzuführen war (Roberts und Newton, 2004).

Bei Prokaryoten wurde lediglich für das Bodenbakterium *Pseudomonas putida* eine GSDA beschrieben (Ishida *et al.*, 1969). Dieses Protein wurde teilweise aufgereinigt und anschließend biochemisch charakterisiert. Dabei wurde gezeigt, dass neben Guanodin auch 2'-Deoxyguanodin deaminiert wird. Trotz dieser biochemischen Charakterisierung des Proteins als Guanindeaminase, gibt es keine Informationen über das dafür kodierende Gen.



#### 4.1.2 Guanosindeaminasen in anderen Pflanzen

In Pflanzen wurde bereits 1992 eine geringe Guanosindeaminaseaktivität in zellfreien Extrakten von Teeblättern (*Camellia sinensis*) nachgewiesen werden (Negishi *et al.*, 1992). In einer nachfolgenden Studie wurde das entsprechende Protein mit Hilfe von Anionenaustausch-Chromatographie und Gelfiltration partiell aus Teeblättern aufgereinigt (Negishi *et al.*, 1994). Die Autoren beschreiben zusätzlich die partielle Aufreinigung und biochemische Analyse einer potentiellen Guanindeaminase, deren Aktivität jedoch deutlich geringer ist. Auffällig ist dabei, dass die entsprechende Proteinfraction eine deutlich höhere Deaminierungsaktivität mit Cytidin und Cytosin aufweist als mit Guanin. Möglicherweise wurde eine Deaminase aufgereinigt, die Guanin nur als Nebensubstrat akzeptiert. Das in Pflanzen keine oder nur eine geringe GDA-Aktivität vorhanden ist, wurde mit Hilfe radiochemischer Studien gezeigt. So konnte zum Beispiel bei der Analyse des Purinmetabolismus in Keimlingen der Urbohne (*Vigna mungo*) mit Hilfe radioaktiv-markierten Guanins keine GDA-Aktivität nachgewiesen werden (Nobusawa und Ashihara, 1982). Ähnliches wurde auch bei der Analyse von Sprossspitzen von Tee beobachtet. Nach Inkubation des Gewebes in  $8^{14}\text{C}$  Guanin war nur eine schwache Abnahme der Radioaktivität in Guanin zu beobachten (Suzuki und Takahashi, 1976; Suzuki *et al.*, 1992). Daraus schließen die Autoren, dass sowohl die Aktivität einer GDA als auch einer HGPRT in diesem Gewebe nur gering oder nicht vorhanden ist. Zusätzlich wird diskutiert, dass Xanthosin durch die Deaminierung von Guanosin gebildet wird. Weitere radiochemische Analysen verschiedener Gewebe von Mate (*Ilex paraguariensis*), Rosafarbener Cataranthe (*Catharanthus roseus*), Urbohne, Tee sowie Kartoffel (*Solanum tuberosum*), bei denen der Stoffwechsel von  $8^{14}\text{C}$  Guanosin beobachtet wurde, weisen auf eine Guanosindeaminaseaktivität hin (Ashihara, 1993; Ashihara *et al.*, 1997 und Katahira *et al.*, 2006). Im Fall der Kartoffel konnte die Guanosindeaminaseaktivität zudem direkt in zellfreien Extrakten der Knollen nachgewiesen werden. Eine Guanindeaminaseaktivität hingegen war auch hier nicht nachweisbar (Katahira *et al.*, 2006). Auf Grund der fehlenden beziehungsweise sehr geringen Nachweisbarkeit einer Guanindeaminaseaktivität in Pflanzen wurde geschlussfolgert, dass die Deaminierung des Guanylrestes der Nukleotide hauptsächlich durch eine Guanosindeaminase katalysiert wird. Die Resultate der hier vorliegenden Arbeit bestätigen diese Hypothese hinsichtlich des Purinnukleotidabbaus in *Arabidopsis thaliana*.

#### 4.1.3 Unterscheidung zwischen GDAs und GSDAs

Die biochemischen Analysen des in dieser Arbeit untersuchten Proteins führten zu dem überraschenden Ergebnis, dass hier keine Guanin- sondern eine Guanosindeaminase identifiziert wurde. Ausgehend von den anfänglich durchgeführten Sequenzvergleichen war dies erstaunlich, da im Pflanzenprotein viele Aminosäuren konserviert sind, für die im bakteriellen Protein eine Beteiligung an der Substratbindung nachgewiesen wurde. Allerdings konnte auch gezeigt werden, dass der Tryptophanrest an Position 92 des bakteriellen Proteins im Protein aus *A. thaliana* nicht vorhanden ist. An vergleichbarer Position befindet sich hier ein Leucinrest. Ein Sequenzvergleich mit mehreren bakte-

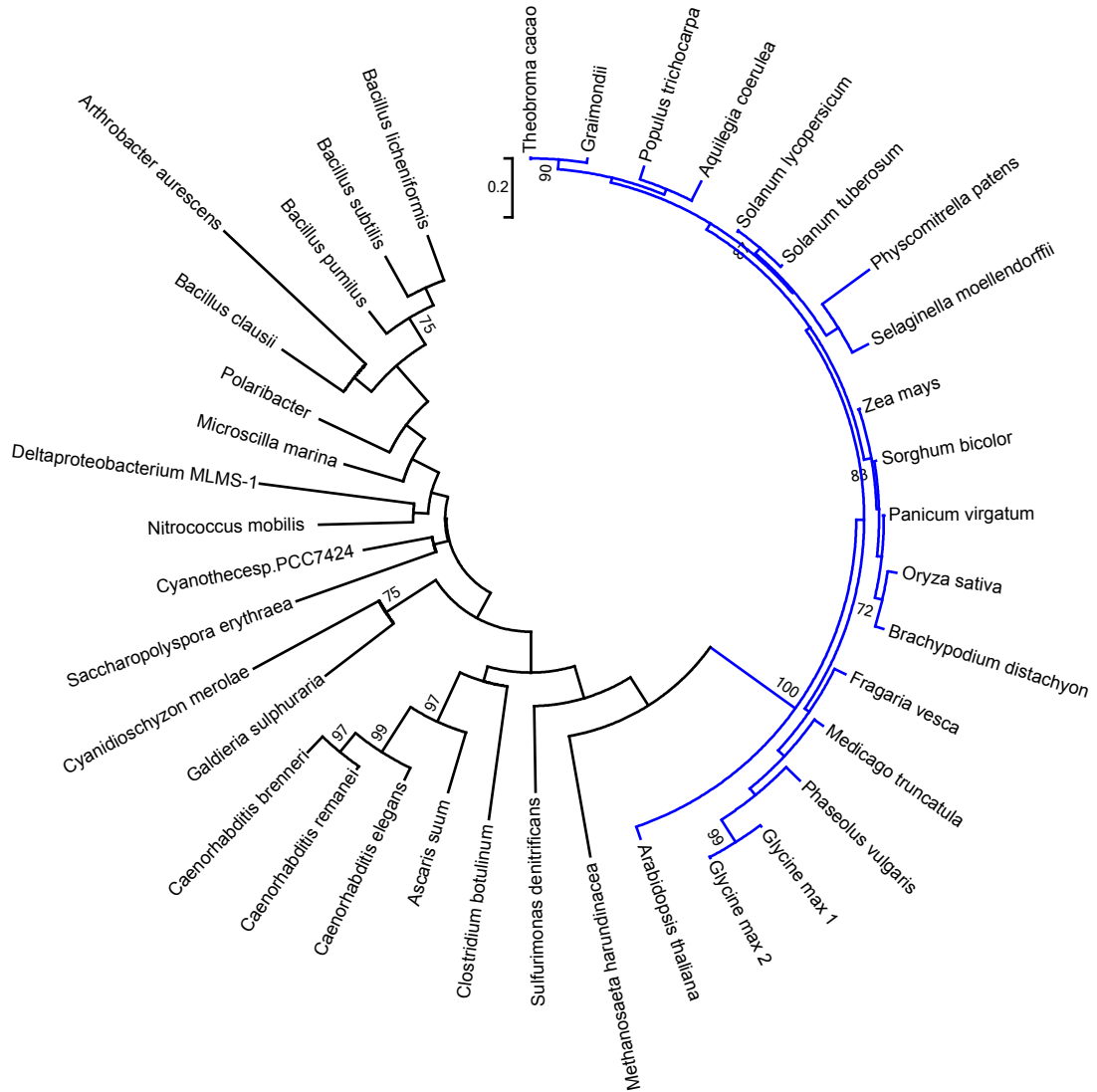
riellen und pflanzlichen Proteinen zeigte, dass die jeweiligen Aminosäuren innerhalb der Bakterien beziehungsweise Pflanzen konserviert sind. Es ist anzunehmen, dass dieser Unterschied in der Sequenz ein Unterscheidungsmerkmal zwischen den Guanin- und Guanosindeaminasen der Cytidin-/Deoxycytidylat-Deaminase Superfamilie darstellt. Die Hypothese, dass ein Austausch von Tryptophan und Leucin die Substratspezifität der jeweiligen Deaminase verändern würde, ließ sich nicht bestätigen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass beide Aminosäuren notwendig für die katalytische Aktivität der Deaminasen sind.

Basierend auf dem Sequenzvergleich zwischen bakteriellen GDAs und pflanzlichen GSDAs (Abb. A.5, Anhang) wurde eine phylogenetische Analyse durchgeführt. Dabei wurden zusätzlich die Sequenzen orthologer Proteine des Mooses *Selaginella moellendorffii*, der Rotalgen *Cyanidioschyzon merolae* und *Galdieria sulphuraria*, des Archaeons *Methanosaeta harundinacea* sowie der Nematoden *Caenorhabditis brenneri*, *Caenorhabditis remanei*, *Caenorhabditis elegans* und *Ascaris suum* in die Analyse einbezogen (Abb. 4.2). Es wurden nur Orthologe ausgewählt, die einen Tyrosinrest am C-Terminus besitzen.

Die phylogenetische Analyse zeigt, dass nur die pflanzlichen Proteine zu den Guanosindeaminasen zu zählen sind. Die Orthologen aus Bakterien, Rotalgen und Nematoden sowie des Archaeons hingegen wurden den Guanindeaminasen zugeordnet. Für die Proteine aus *Caenorhabditis elegans* und *Galdieria sulphuraria* zeigte bereits eine von PD. Dr. Claus-Peter Witte durchgeführte phylogenetische Analyse, dass diese zu den Guanindeaminasen zählen (Dahncke und Witte, 2013). Damit konnten erstmals GDAs der Cytidin-/Deoxycytidylat-Deaminase Superfamilie in Eukaryoten identifiziert werden. Die Analyse der Sequenzen von *Cyanidioschyzon merolae*, *Caenorhabditis brenneri*, *Caenorhabditis remanei* und *Ascaris suum* ergänzt die obgenannte Analyse für Rotalgen und Nematoden. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass auch das Protein des Archaeons *Methanosaeta harundinacea* zu den GDAs zu zählen ist.

Es ist also möglich anhand der Sequenz einer Deaminase vorherzusagen, ob diese eine Guanin- oder Guanosindeaminase ist. Welche Aminosäuren für die Aktivität der GSDA verantwortlich sind, geht aber auch aus der phylogenetischen Analyse nicht hervor. Aus diesem Grund wurde in unserem Labor die GSDA aus *A. thaliana* für eine Kristallisationsstudie aufgereinigt (erste Versuche im Rahmen dieser Arbeit; fortgesetzt von Benjamin Wellner in Kooperation mit der AG Wahl). Durch anschließende Röntgenstrukturanalyse sollte der Reaktionsmechanismus des Enzyms aufgeklärt werden. Bislang war es jedoch nicht möglich das Protein zu kristallisieren.

Zur Zeit sind Folgeversuche mit der GSDA von Sojabohne angedacht. Sollte es gelingen die Struktur der Guanosindeaminase aufzuklären, ließen sich vermutlich auch die Aminosäuren identifizieren, die für die Deaminierung des Nucleosids verantwortlich sind.



**Abbildung 4.2 – Phylogenetische Analyse der GDAs und GSDAs.** Der Sequenzvergleich zwischen GDAs und GSDAs aus Abbildung A.5 wurde für eine phylogenetische Analyse mit der Software MEGA5 genutzt. Dabei wurden zusätzlich die Sequenzen orthologer Proteine aus *Selaginella moellendorffii*, *Cyanidioschyzon merolae*, *Galdieria sulphuraria*, *Methanosaeta harundinacea*, *Caenorhabditis brenneri*, *Caenorhabditis remanei*, *Caenorhabditis elegans*, *Ascaris suum* berücksichtigt. Der phylogentische Baum ist der Konsensusbaum aus 500 Bootstrappings, dabei werden nur Bootstrap-Werte über 70 angezeigt. Die Äste der GSDAs sind blau dargestellt, die der GDAs schwarz. (Parameter der phylogentischen Analyse: *maximum likelihood, WAG+G model, nearest neighbor interchange*)

## 4.2 Phänotypen der *gsda*-Mutanten

### 4.2.1 Auswirkungen anhaltender Dunkelheit auf den Purinnukleotidabbau

Der deutlichste Phänotyp, der für die *gsda*-Mutanten beobachtet wurde, tritt bei anhaltender Dunkelheit auf. Diese Versuche wurden in Anlehnung an Experimente mit Verlustmutanten der XDH1 sowie der NSH1 durchgeführt (Brychkova *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2011). Sowohl für die *xdh1*- als auch die *nsh1*-Mutanten wurde nach sechs beziehungsweise fünf Tagen Dunkelheit, verglichen mit dem Wildtyp, eine deutlich stärkere Gelbfärbung der Blätter beobachtet.

Dunkelstress wird häufig genutzt, um die Seneszenz aller beziehungsweise einzelner Blätter zu induzieren und zu untersuchen (Lin und Wu, 2004). Während dieses Prozesses findet ein vermehrter Abbau von Makromolekülen wie Proteinen, Membranlipiden und RNA statt (Lim *et al.*, 2007).

Erste Versuche im Rahmen dieser Doktorarbeit zeigten, dass die Blätter von *gsda*-Mutanten nach sechs Tagen im Dunkeln eine deutliche Gelbfärbung aufweisen (Abb. 3.32). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass dieser Phänotyp bei Wiedereinführung des *GSDA*-Gens in die Mutante *gsda-2* aufgehoben wird (Abb. 3.33). Somit kann eine Verbindung zwischen dem Verlust der Guanosindeaminase und der Chlorose der Blätter nach sechstägiger Dunkelheit hergestellt werden.

Für eine genauere Charakterisierung dieses Phänotyps wurde ein Zeitkursexperiment durchgeführt. Die Dokumentation und Analyse der Pflanzen von Tag 0 bis Tag 6 der Dunkelphase ermöglichte ein detaillierteres Verständnis der Vorgänge in den *gsda*-Mutanten im Vergleich zum Wildtyp. Dabei ließ sich feststellen, dass die stärkere Chlorose der Blätter der *gsda*-Pflanzen ab Tag 4 sichtbar wird. Die Quantifizierung der Blattfarbstoffe zeigte eine signifikante Differenz des Chlorophyll-zu-Carotinoid-Verhältnisses zwischen Wildtyp und Mutante ab Tag 5.

Auch für die NSH1 und die XDH wurde gezeigt, dass die entsprechenden Verlustmutanten nach mehrtägiger Dunkelheit weniger Chlorophyll enthalten als der Wildtyp (Jung *et al.*, 2011; Brychkova *et al.*, 2008). Neben dieser Beobachtung wurde für die *xdh*-Mutanten auch eine stärkere Abnahme der Gesamtproteinmenge im Vergleich zum Wildtyp beschrieben (Brychkova *et al.*, 2008). In den Blättern der *gsda*-Mutanten war die Proteinkonzentration an den Tagen 4, 5 und 6 signifikant geringer als in denen des Wildtyps. Dies war auch an der abnehmenden Menge der großen Untereinheit der RuBisCO ablesbar.

Die Detektion der Guanosindeaminase nach einem Western Blot zeigte keine signifikanten Veränderungen im Gehalt dieses Enzyms bei gleicher Frischgewichtsmenge. In Transkriptomanalysen von Arabidopsispflanzen wurde jedoch eine verstärkte Expression der Guanosindeaminase während anhaltender Dunkelheit nachgewiesen (Lin und Wu, 2004; Thimm *et al.*, 2004).

Eine erhöhte Transkriptmenge im Zusammenhang mit mehrtägiger Dunkelheit wurde auch für die XDH beobachtet (Brychkova *et al.*, 2008; Thimm *et al.*, 2004; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Während der Charakterisierung des Dunkelstressphänotyps der *xdh*-Mutanten konnten Brychkova und Kollegen mittels quantitativer PCR zudem eine erhöhte Transkription der AMP-Deaminase, der Allantoinase sowie der Allantoatamidohydrolase nachweisen (Brychkova *et al.*, 2008). Außerdem

wurde in einer Microarray-Analyse ebenfalls ein Anstieg der Transkription der Allantoinase sowie der Uricase gezeigt (Buchanon-Wollaston *et al.*, 2005). Aus diesen Daten kann man schlussfolgern, dass der Abbau der Purinnukleotide bei anhaltender Dunkelheit verstärkt abläuft. Dies deutet auch die Akkumulation von Xanthin in der *xdh*-Mutante sowie von Xanthosin und Inosin in der *nsh1*-Mutante während beziehungsweise am Ende der Dunkelphase (Brychkova *et al.*, 2008; Jung *et al.*, 2011) sowie der zunehmende Gehalt von Guanosin und Guanin in den *gsda*-Mutanten (Abb. 3.41) an. Da während einer verlängerten Dunkelphase vermehrt RNA abgebaut wird, ist eine Zunahme der Purinnukleotidabbau-Aktivität die logische Konsequenz.

## **4.2.2 Zusammenhang zwischen Purinnukleotidabbau und Kohlenhydratstoffwechsel**

### **4.2.2.1 Analysen des Stoffwechsels in *Saccharomyces cerevisiae***

Ein Zusammenhang zwischen dem Purinnukleotidabbau und der Kohlenstoffversorgung wurde kürzlich bei der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* festgestellt (Xu *et al.*, 2013). Hier wurde gezeigt, dass die Anzucht der Hefe unter Kohlenstoffmangelbedingungen zu einer Akkumulation von Nucleosiden, Nucleobasen und Sedoheptulose-7-Phosphat, einem Intermediat des nicht-oxidativen Pentosephosphatweges, führt. Bei Kohlenstoffmangel wird Autophagie und als Folge dessen der Abbau der Ribosomen ausgelöst (Xu *et al.*, 2013). Diese bestehen ungefähr zu gleichen Teilen aus Proteinen und RNA. Ihr Abbau liefert daher neben Aminosäuren auch Nucleotide. Letztere werden zu Ribose beziehungsweise Ribose-1-Phosphat und Nucleobasen abgebaut. Anders als in Pflanzen existiert in Hefe sowohl eine Nucleosidhydrolase (Uridinhydrolase1, URH1) als auch eine Purinnucleosidphosphorylase (PNP1). Die Autoren gehen davon aus, dass sowohl Ribose als auch Ribose-1-Phosphat in den Pentosephosphatweg eingespeist wird.

Für eine genauere Analyse des Zusammenhangs zwischen Nucleotidkatabolismus und Pentosephosphatweg wurden *pnp1*- und *urh1*-Deletionsstämme unter Kohlenstoffmangel kultiviert. Dabei wurde beobachtet, dass sich die jeweiligen Nucleoside anreicherten (Uridin und Cytidin in der *urh1*-Mutante; Inosin und Guanosin in der *pnp1*-Mutante). Gleichzeitig war der Gehalt an Nucleobasen und Ribose sowie Sedoheptulose-7-Phosphat und Sedoheptulose-1,7-Bisphosphat deutlich geringer als beim Wildtyp. Beide Enzyme (PNP1 und URH1) sind demnach am Recycling von Ribose beteiligt. Ribose-1-Phosphat wird dabei durch die Phosphoglucomutase 3 in Ribose-5-Phosphat umgewandelt. Welches Enzym die Phosphorylierung von Ribose katalysiert ist bislang nicht geklärt. Die Autoren spekulieren, dass eine der Hexokinasen von Hefe an dieser Reaktion beteiligt ist.

### **4.2.2.2 Interpretation der Analysen von *Arabidopsis thaliana***

Der Dunkelstress-Phänotyp der *gsda*-Mutanten lässt vermuten, dass auch in *Arabidopsis thaliana* ein Zusammenhang zwischen dem Purinnukleotidabbau und der Kohlenstoffversorgung besteht. Es ist vorstellbar, dass auch hier die freigesetzte Ribose in den Pentosephosphatweg eingespeist und damit

für den Kohlenstoff- und Energiestoffwechsel nutzbar gemacht werden könnte. Der Verlust der Guanosindeaminase könnte zu einer deutlichen Verringerung des Ribosespiegels führen, da kein beziehungsweise nur noch sehr wenig Xanthosin zur Verfügung steht, welches hydrolysiert werden kann. Auch der für *nsh1*-Mutanten beobachtete Phänotyp bei anhaltender Dunkelheit (Jung *et al.*, 2011) deuten darauf hin, dass ein Zusammenhang zwischen der Hydrolyse der Nukleoside und der Kohlenstoffversorgung der Pflanze bestehen könnte. Bei Analysen in unserem Labor war der Dunkelstress-Phänotyp der *nsh1*-Mutanten nach sechstägiger Dunkelheit ebenfalls sichtbar aber nicht so stark ausgeprägt, wie bei den *gsda*-Mutanten (nicht gezeigt). Möglicherweise können andere, noch unbekannt, Nukleosidasen den Verlust der NSH1 teilweise kompensieren.

Damit die im Purinnukleotidabbau freigesetzte Ribose für den Kohlenhydratstoffwechsel genutzt werden kann, müsste sie zunächst phosphoryliert werden. Das vom Locus At1g17160 kodierte Protein ist in der TAIR-Datenbank als Ribokinase annotiert. Die Vorhersage dieser Funktion beruht auf dem Vorhandensein von Domänen, die laut InterPro-Datenbank ([www.ebi.ac.uk/interpro](http://www.ebi.ac.uk/interpro)) eine Zuordnung zu den Proteinfamilien der Ribokinasen (IPR002139) und der Phosphofruktokinase B ähnlichen Kohlenhydratkinasen (IPR002173) zulassen. Eine biochemische Analyse des Enzyms liegt bislang nicht vor. Es kann demnach nur vermutet werden, dass das von At1g17160 kodierte Protein die Phosphorylierung von Ribose katalysiert. Transkriptomanalysen zeigen eine Akkumulation der mRNA dieses Gens bei anhaltender Dunkelheit (Lin und Wu 2004; Thimm *et al.*, 2004)

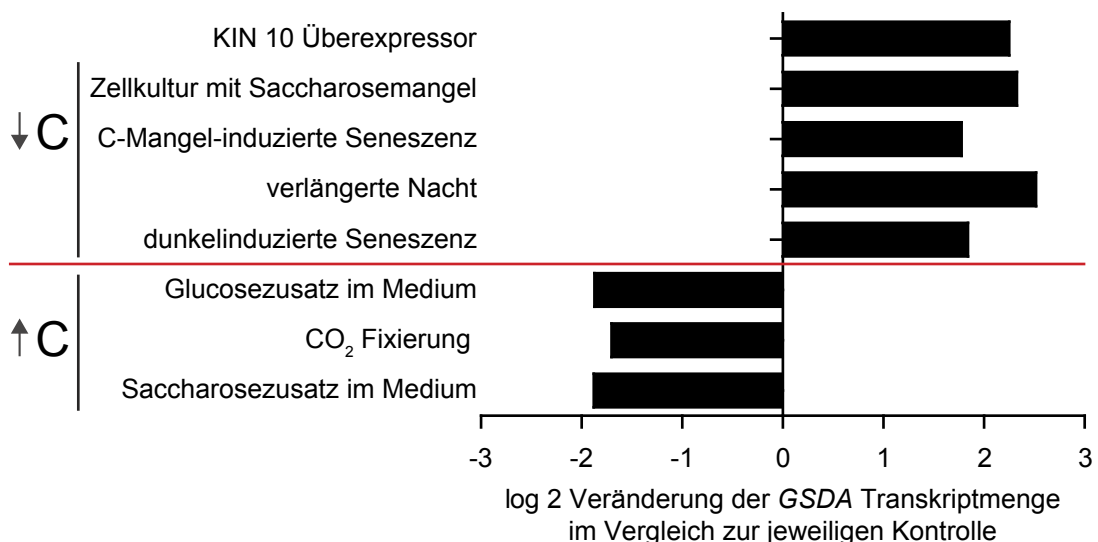
Der für die *xdh*-Mutanten beobachtete Dunkelstress-Phänotyp (Brychkova *et al.*, 2008) konnte in unserem Labor nicht reproduziert werden (nicht gezeigt). Brychkova und Kollegen vermuten, dass die Ureide Allantoin und Allantoinensäure eine schützende Funktion bei oxidativem Stress besitzen, da diese im Wildtyp bei anhaltender Dunkelheit akkumulieren. Das Fehlen der XDH verhindert die Produktion dieser Metabolite (Brychkova *et al.*, 2008). In vergleichenden Transkriptomanalysen wurde gezeigt, dass die Transkription der Uricase, der XDH und der Allantoinase induziert wird. Die Autoren diskutieren hier eine Funktion der Ureide als Stickstofftransportmetabolite (Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005). Für eine gesicherte Aussage über die Funktion der Ureide bei anhaltender Dunkelheit und somit auch über die Rolle der XDH, sind weitere Analysen notwendig.

#### **4.2.2.3 Einfluss von Signaltransduktionswegen**

Neben der Bedeutung des Purinnukleotidabbaus für den Kohlenhydratstoffwechsel in *S. cerevisiae*, wurde in der bereits genannten Studie der Einfluss von Signaltransduktionswegen untersucht (Xu *et al.*, 2013). Um diesen Zusammenhang näher aufzuklären, wurde unter anderem ein *snf1*-Deletionsstamm genutzt. SNF1 (*sucrose non fermenting 1*) ist ein Ortholog der AMP-aktivierten Proteinkinase (AMPK) von Säugern und an Signalkaskaden beteiligt, die durch Nährstoff- und Energiemangel ausgelöst werden. Die Expression dieser Kinase wird bei Anwesenheit von Glucose reprimiert und bei Kohlenstoffmangel induziert. Sie ist notwendig für das Wachstum von Hefe auf alternativen Koh-

lenstoffquellen. Bei Kohlenstoffmangel wurden im *snf1*-Deletionsstamm verglichen mit dem Wildtypstamm deutlich geringere Mengen von Nucleosiden, Nucleobasen und Sedoheptulose-7-Phosphat gemessen. Daraus schließen die Autoren, dass SNF1 mitverantwortlich für die Induktion der Autophagie und somit auch den Ribosomenabbau ist (Xu *et al.*, 2013).

Orthologe Kinasen zu SNF1 in Hefe und AMPK in Säugern existieren auch in Pflanzen und werden *sucrose non fermenting related kinases*, kurz SnRKs, genannt. In *Arabidopsis thaliana* sind 38 solcher Proteinkinasen bekannt. Während es in Säugern nur eine Familie dieser Kinasen gibt, wurden für Arabidopsis die drei Untergruppen SnRK1, SnRK2 und SnRK3 beschrieben. Diese teilen sich nach Sequenzähnlichkeit und Domänenstruktur auf. Die Untergruppe SnRK1 ist am stärksten mit SNF1 und AMPK verwandt und besteht in Arabidopsis aus drei Mitgliedern (Hrabak *et al.*, 2003). Wie die Kinasen in Hefe und Säugern, sind auch die Mitglieder der SnRK1 Untergruppe an der Regulation des Stoffwechsels in Abhängigkeit der Nährstoffverfügbarkeit beteiligt (Review siehe Halford und Hardie, 1998). Vor allem KIN10 löst bei Zucker- oder Energiemangel eine Veränderung der Transkription vieler Gene aus, wodurch der Katabolismus unterstützt und der Anabolismus herunterreguliert wird (Baena-González *et al.*, 2007). Das Ziel dieser Regulation ist die Bereitstellung von Zuckern, die in der Mangelsituation das Überleben der Pflanze sichern. Die Analyse einer *KIN10*-



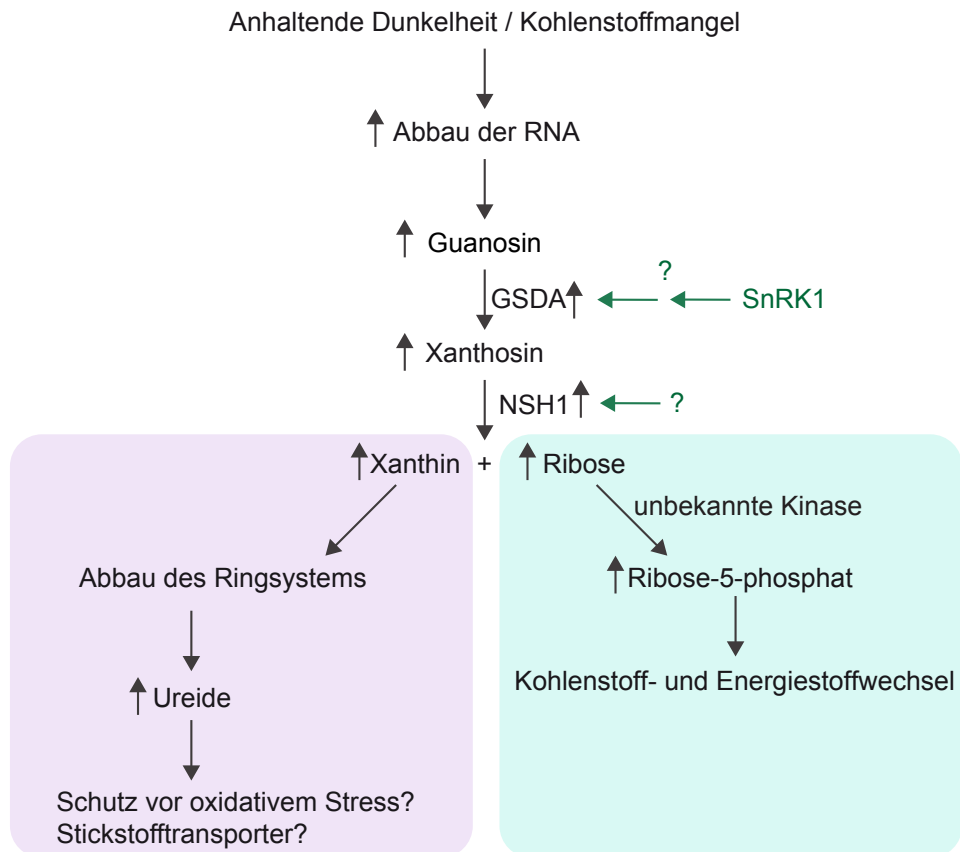
**Abbildung 4.3 – Regulation der *GSDA*-Expression in Abhängigkeit vom Kohlenstoffstatus der Pflanze.** Die relative Transkriptmenge des *GSDA*-Gens in einer *KIN10*-Überexpressionslinie wurde mit Expressionsdaten verglichen, die im Zusammenhang mit einem Mangel oder Überschuss an Kohlenstoff stehen. Die vergleichenden Daten wurden der Publikation von Baena-González *et al.*, 2007 entnommen.

Überexpressionmutante ermöglichte die Identifizierung von Genen, deren Transkription durch die Kinase aktiviert oder reprimiert wird. Als eines der Gene mit aktivierter Transkription wurde das der Guanosindeaminase identifiziert (Baena-González *et al.*, 2007).

Zusätzlich verglichen die Autoren ihre Daten mit veröffentlichten Expressionstudien, bei denen der

Einfluss von Kohlenstoffmangel oder -überschuss analysiert wurde. Dieser Vergleich zeigt, dass die Transkription der GSDA generell durch einen Mangel an Kohlenstoff induziert wird. Im Gegensatz dazu führt Kohlenstoffüberschuss zu einer verringerten Transkription (Abb. 4.3). Drei der Datensätze in diesem Vergleich entstammen Studien, bei denen der Einfluss anhaltender Dunkelheit untersucht wurde (Thimm *et al.*, 2004; Lin und Wu, 2004; Buchanan-Wollaston *et al.*, 2005).

Ein mögliches Erklärungsmodell zum Zusammenhang zwischen anhaltender Dunkelheit, dem Purinnukleotidabbau und dem Kohlenstoffhaushalt ist in Abbildung 4.4 dargestellt.



**Abbildung 4.4 – Modell der Regulation bei anhaltender Dunkelheit.** Die anhaltende Dunkelheit löst Kohlenstoffmangel in der Pflanze aus, dieser führt unter anderem zum Abbau der RNA. Zusätzlich wird die Transkription der GSDA aktiviert (direkt / indirekt durch SnRK1). Eine erhöhte *NSH1*-Transkription der bei anhaltender Dunkelheit wurde ebenfalls nachgewiesen. Der verstärkt stattfindende Abbau der Nucleotide führt neben der Remobilisierung von Stickstoff zur Freisetzung von Ribose. Diese wird durch eine Kinase phosphoryliert und in den Kohlenhydrat- und Energiestoffwechsel eingespeist. Die Funktion der Ureide bei anhaltender Dunkelheit ist nicht ausreichend aufgeklärt.

Basierend auf dem Modell lässt sich die Hypothese aufstellen, dass in den *gsda*-Mutanten ein Beitrag der Ribose zu Kohlenstoffversorgung nicht möglich ist, da kein Xanthosin für die Hydrolyse bereitgestellt werden kann. Als Folge dessen wirkt sich die anhaltende Dunkelheit auf die Mutante stärker aus als auf den Wildtyp.



Zur Überprüfung dieses Erklärungsmodells sollte ein weiterer Dunkelstress-Versuch durchgeführt werden, bei dem die vergleichende Analyse der Zuckermetabolite im Wildtyp und der *gsda*-Mutante im Mittelpunkt stehen sollte. Darüber hinaus könnte untersucht werden, ob die externe Zuführung einer Zuckerquelle den Phänotyp der Mutante aufheben kann.

#### **4.2.3 Zusammenhang zwischen dem möglichen Kohlenstoffmangel und der Verzögerung von Keimung, Sprosswachstum und Seneszenz**

Die Studien zu SnRK1 zeigten, dass die Aktivität der Kinase durch Trehalose-6-Phosphat inhibiert wird (Zhang *et al.*, 2009). Hierbei handelt es sich um ein Disaccharid, das aus UDP-Glucose und Glucose-6-Phosphat synthetisiert wird. Diese Reaktion wird durch die Trehalose-6-Phosphat-Synthase katalysiert (Blazquez *et al.*, 1998).

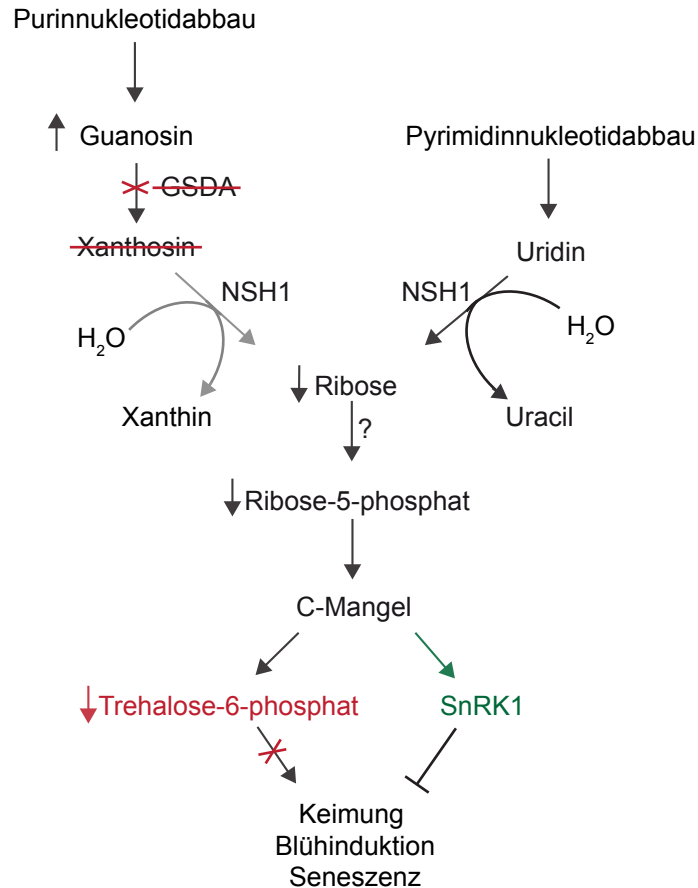
Es wird davon ausgegangen, dass Trehalose-6-Phosphat ein Signal für einen hohen Kohlenhydratgehalt in der Zelle ist (Schluepmann *et al.*, 2004). Außerdem konnte gezeigt werden, dass ein Zusammenhang zwischen dem Trehalose-6-Phosphat-Gehalt und der Blühinduktion besteht (Wahl *et al.*, 2013). Ein geringer Gehalt des Disaccharids führte zu einer Verzögerung der Blühinduktion.

Die Analyse der KIN10-Überexpressionslinien zeigte, dass diese eine verlängerte Lebenszeit aufweisen. Das bedeutet, dass sowohl die Blüte als auch die Seneszenz der Überexpressoren später eintraten als beim Wildtyp. (Baena-González *et al.*, 2007). Außerdem wurde bei Samen von KIN10-Überexpressoren eine verzögerte Keimung beobachtet (Tsai und Gazzarini, 2013).

Berücksichtigt man diese Daten bei der Auswertung der Phänotypen der *gsda*-Mutanten, fällt auf, dass auch diese eine Verzögerung der Keimung, der Blüte und der Seneszenz zeigten.

Ein Modell zu den Zusammenhängen zwischen einem eventuellen Kohlenstoffmangel in den *gsda*-Mutanten und den Wachstums- und Entwicklungsphänotypen ist in [Abbildung 4.5](#) dargestellt.

Die in dem Modell aufgestellte Hypothese sollte mithilfe einer Metabolitanalyse von Samen und Blättern der *gsda*-Mutanten überprüft werden. Stimmt das Erklärungsmodell, wären hier geringere Zuckerkonzentrationen, inklusive Trehalose-6-phosphat, als im Wildtyp zu erwarten. Auch die quantitative Analyse der Expression von KIN10 wäre in diesem Zusammenhang sinnvoll. Hier wäre eine erhöhte Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp zu erwarten. Zusätzlich ist ein Wachstumsexperiment denkbar, bei dem untersucht wird, ob der Zusatz von Zuckern zum Nährmedium die Verzögerung von Keimung, Blüte und Seneszenz aufhebt.



**Abbildung 4.5 – Möglicher Zusammenhang zwischen Kohlenstoffmangel in den *gsda*-Mutanten und den Wachstums- und Entwicklungsphänotypen.** Eine mögliche Erklärung der Phänotypen ist, dass in Folge des *GSDA*-Verlusts weniger Ribose aus den Nukleotiden recycelt werden kann. Als Konsequenz daraus ist der Kohlenhydratgehalt in den *gsda*-Mutanten geringer als im Wildtyp. Dies führt zu einer niedrigeren Konzentration an Trehalose-6-Phosphat und gleichzeitig zu einer Aktivierung von SnRK1 (KIN10). Beides zieht die Verzögerung von Keimung, Blüte und Seneszenz nach sich.

## 4.3 Analyse des Purinnukleotidabbaus

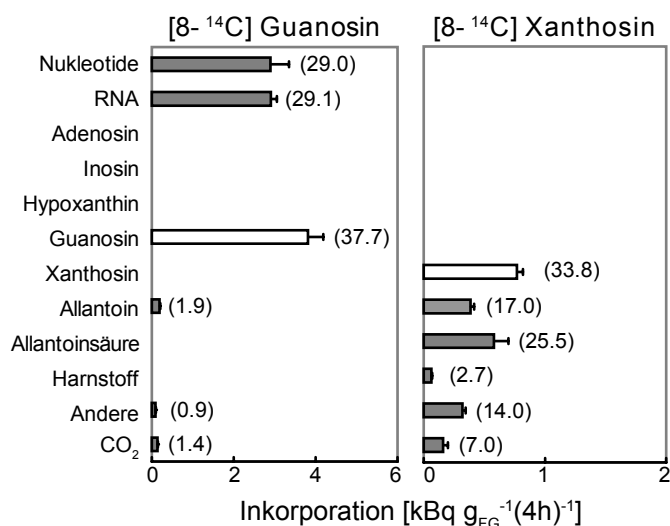
### 4.3.1 *In vivo* Funktion der GSDA

Wie in 4.1 erwähnt, wurde eine Guanosindeaminaseaktivität bereits in zellfreien Extrakten von Teeblättern (*Camellia sinensis*) und Kartoffelknollen (*Solanum tuberosum*) nachgewiesen (Negishi *et al.*; 1992, Katahira *et al.*, 2006) sowie teilweise aus Teeblättern aufgereinigt (Negishi *et al.*, 1994). Zusätzlich weisen mehrere radiochemische Studien auf die Beteiligung eines solchen Enzyms am Purinnukleotidabbau in Pflanzen hin (Ashihara, 1993; Ashihara *et al.*, 1997 und Katahira *et al.*, 2006). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals das kodierende Gen einer Guanosindeaminase identifiziert werden. Die Nutzung homozygoter T-DNA-Insertionslinien für Metabolitanalysen zeigte, dass der

Verlust des *GSDA*-Gens zu einer Akkumulation von Guanosin führt. Dies wurde sowohl in Samen als auch in Wurzeln, verschiedenen Rosettenblättern, Stängelblättern, im Spross, in Schoten und in Blüten nachgewiesen. Damit konnte die *in vitro* beobachtete Substratspezifität des Enzyms *in vivo* bestätigt und gleichzeitig dessen Beteiligung am Purinnukleotidabbau belegt werden.

### 4.3.2 Abbau und Recycling der Purinnukleotide

Eine Kinase, welche die Phosphorylierung von Guanosin zu GMP katalysiert ist in *Arabidopsis* bislang unbekannt. In Tombinambur (*Heliantus tuberosus*), Kartoffel und Tee hingegen konnte eine Inosin-Guanosinkinaseaktivität nachgewiesen werden (Combes *et al.*, 1989; Katahira *et al.*, 2006 und Deng *et al.*, 2010). Zudem zeigten Experimente mit radioaktiv-markiertem Guanosin und Zellkulturen von *Catharanthus roseus*, Blättern von Tee und Kakao (*Theobroma cacao*) sowie Kartoffelknollen, dass nach kurzer Zeit zwischen 35 und mehr als 50% der Radioaktivität in Nukleotiden und Nucleinsäuren detektierbar war (Ashihara *et al.*, 1997; Koyama *et al.*, 2003; Katahira *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2010 und Abb. 4.6).



**Abbildung 4.6 – Radiochemische Analyse des Purinnukleotidstoffwechsels in Kartoffelknollen.** Scheiben von Kartoffelknollen wurden für 4 Stunden mit radioaktiv-markiertem Guanosin oder Xanthosin inkubiert. Die Inkorporation und Verteilung der Radioaktivität in den Zwischenprodukten des Purinnukleotidstoffwechsels wurde verfolgt. Während die Radioaktivität des aufgenommenen Guanosins hauptsächlich in Guanosin selbst und in Recyclingprodukten detektiert wurde, war die von Xanthosin ausschließlich in Abbauprodukten nachweisbar. Modifiziert nach Katahira *et al.*, 2006.

Es ist demzufolge vorstellbar, dass auch in den *gsda*-Mutanten Guanosinrecycling stattfindet, die entsprechenden Produkte aber nicht in erhöhter Konzentration auftreten. Das trotz der ubiquitären Expression der *GSDA* in jungen *gsda*-Mutanten deutlich weniger Guanosin nachweisbar ist als in sieben- oder zehnwochen alten Pflanzen (Abb. 3.25 verglichen mit den Abb. 3.26 und 3.45) zeigt, dass

der Purinabbau mit zunehmendem Alter der Blätter verstärkt stattfindet. Auch zwischen verschiedenen Geweben scheinen Unterschiede in der Balance zwischen Abbau und Recycling zu herrschen (Abb. 3.25, 3.26 und 3.45).

Bei Analysen sich entwickelnder Embryos von Raps (*Brassica napus*) und Weiß-Fichte (*Picea glauca*) wurde deutlich, dass zu Beginn eine hohe Recyclingrate vorherrscht, die im Lauf der Embryogenese absinkt, während gleichzeitig mehr Abbau zu beobachten ist (Ashihara *et al.*, 2001 und 2008). In Teekeimlingen konnte zudem nachgewiesen werden, dass sich die Inkorporation radioaktiv-markierter Purinmetabolite in Blättern und Wurzeln unterscheidet. So wurde zum Beispiel für Inosin in Blättern mehr Radioaktivität in Abbauprodukten nachgewiesen. In Wurzeln hingegen war der Anteil radioaktiv-markierter Recyclingprodukte deutlich größer (Deng *et al.*, 2010). Damit solche Aussagen auch über das Verhältnis zwischen Purinnukleotidabbau und -recycling in *Arabidopsis thaliana* getroffen werden können, sind weitere Experimente erforderlich. Dabei könnten Isotopen-markierte Metabolite genutzt und deren metabolische Umsetzung in der Pflanze mithilfe von Massenspektrometrie untersucht werden.

### 4.3.3 Die Akkumulation von Guanin weist auf eine Guanosinhydrolase hin

Neben der Akkumulation von Guanosin konnte eine erhöhte Konzentration von Guanin in den *gsda*-Mutanten nachgewiesen werden. Die hydrolytische Spaltung von Guanosin ist vermutlich der Grund für diese Akkumulation ist. Bislang wurde jedoch keine Nukleosidhydrolase in *Arabidopsis thaliana* identifiziert, die diese Reaktion katalysiert. Für die Nukleosidhydrolase 1 wurde die Umsetzung von Uridin, Xanthosin und Inosin beschrieben wobei davon auszugehen ist, dass Uridin und Xanthosin die wichtigsten Substrate sind, da in *nsh1*-Mutanten kaum Inosin akkumuliert (Jung *et al.*, 2009 und 2011; Riegler *et al.*, 2011). Die Nukleosidhydrolase 2 wird vor allem in seneszenten Blättern exprimiert (Jung *et al.*, 2011). Es nicht vollständig geklärt, in welchem Umfang dieses Enzym am Purinnukleotidabbau beteiligt ist. Weder für NSH1 noch NSH2 wurde eine Umsetzung von Guanosin nachgewiesen.

Bei der Messung der Nukleosidhydrolaseaktivität in unlöslichen Wurzelfractionen von *nsh1*- und *nsh2*-Mutanten mit verschiedenen Substraten wurde Folgendes sichtbar: Während die Uridin- und Xanthosinhydrolaseaktivitäten in beiden Mutanten im Vergleich zum Wildtyp deutlich abnehmen, ändern sich die Inosin- und Guanosinhydrolaseaktivitäten nicht (Riegler *et al.*, 2011). Dies kann als Hinweis auf eine weitere Nukleosidhydrolase gewertet werden. Studien in denen eine Guanosin-Inosin-Hydrolaseaktivität in Sprossextrakten von Tombinambur, jungen Pfirsichpflanzen (*Prunus persica*), Kartoffelknollen sowie Teeblättern nachgewiesen werden konnte, stützen diese Vermutung (Le Floc'h und Lafleuriel, 1981; Le Floc'h und Faye, 1995; Katahira *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2010). Zudem konnte aus Samen der Gelben Lupine (*Lupinus luteus*) ein entsprechendes Enzym aufgereinigt werden (Szuwart *et al.*, 2006). Auch Analysen der Enzyme des Laubmooses *Physcomitrella patens* sowie von Mais (*Zea mays*) zeigen, dass sowohl die Nukleosidhydrolase 1 aus *P. patens* als auch die

Nukleosidhydrolasen 2a, 2b und 3 aus Mais Guanosin als Substrat akzeptieren, jedoch andere Nucleoside kinetisch bevorzugt werden (Kopečná *et al.*, 2013).

#### 4.3.4 Rolle der HGPRT im Purinnucleotidmetabolismus

Die Akkumulation von Guanin deutet neben dem Vorhandensein einer weiteren Nucleosidhydrolase in Arabidopsis auch auf eine geringe Aktivität der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase hin. Durch die Analyse der HGPRT aus Arabidopsis ist bekannt, dass *in vitro* Guanin das bevorzugte Substrat des Enzyms ist (Liu *et al.*, 2007). Die, in der vorliegenden Arbeit durchgeführte, Metabolitanalyse von Samen einer *hgprt*-Mutante bestätigt dies. Hier konnte eine geringe Akkumulation von Guanin nachgewiesen werden, jedoch kein Hypoxanthin. Auch Experimente mit radioaktiv markierten Metaboliten belegen, dass deutlich mehr Guanin in den Bergungsweg fließt als Hypoxanthin, welches eher abgebaut wird (Katahira *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2010). In Samen der *hgprt-gsda*-Doppelmutante war ein höherer Guaningehalt messbar als in den beiden Einzelmutanten, während die Guanosinkonzentration im Vergleich zur *gsda-2* Mutante sank. Der höhere Guaningehalt zeigt, dass die HGPRT am Recycling des Guanins beteiligt ist. Die gleichzeitig geringere Guanosinkonzentration deutet an, dass der Stoffwechsel bei Abwesenheit beider Enzyme anders reguliert wird. Vorstellbar sind zwei Szenarien: (i) Die HGPRT kann kein Guanin zu GMP recyceln, deshalb wird die Dephosphorylierung des Nucleotids verlangsamt und weniger Guanosin in den Abbauweg eingespeist. (ii) Die HGPRT kann kein Guanin zu GMP recyceln, deshalb wird die (bisher nicht nachgewiesene) Guanosinkinaseaktivität erhöht und so Guanosin dem Abbauweg entzogen. Für gesicherte Aussagen über die Regulation des Purinnucleotidstoffwechsels in *A. thaliana* und das Verhältnis zwischen Recycling- und Abbauaktivitäten sind jedoch weitere Analysen notwendig.

#### 4.3.5 Metabolismus der Purindeoxynucleoside

Neben Guanosin wurde *in vitro* auch 2'-Deoxyguanosin als Substrat der GSDA nachgewiesen, in den *gsda*-Mutanten war dieser Metabolit jedoch nicht detektierbar. Analysen in Kartoffelknollen und Teeblättern zeigten, dass 2'-Deoxyguanosin sowie 2'-Deoxyadenosin nicht abgebaut, sondern hauptsächlich recycelt werden (Katahira *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2010). In Arabidopsis wurde eine Multisubstrat-Deoxyribonucleosidkinase identifiziert, die am Recycling der Deoxynucleoside beteiligt ist (Clausen *et al.*, 2012). Der in geringem Maß stattfindende Abbau der Deoxynucleoside in Kartoffel und Tee wird vermutlich durch eine Adenosin-sowie eine Inosin-Guanosin-Hydrolase katalysiert. Die entstehenden Basen Adenin und Guanin werden anschließend durch die Adenin-Phosphoribosyltransferase und die HGPRT zu AMP und GMP umgesetzt (Katahira *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2010).

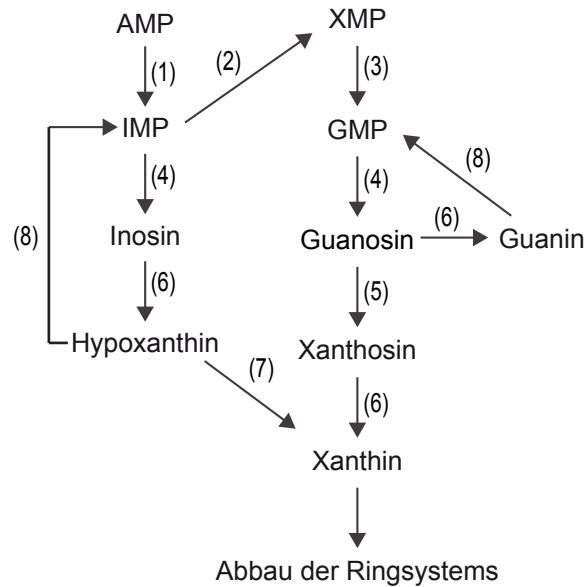
#### 4.3.6 Metabolismus von Xanthosin und Uridin

Die Analyse der Nukleosidhydrolase1-Mutanten *nsh1-1* und *nsh1-2* zeigt, dass sowohl in Samen als auch in den Rosetten, Wurzeln und Schoten zehn Wochen alter Pflanzen eine Akkumulation von Uridin und Xanthosin zu beobachten ist. Dies entspricht den bereits veröffentlichten Analysen von Blättern und Wurzeln der Nukleosidhydrolase1 Mutante *nsh1-1* (Jung *et al.*, 2011; Riegler *et al.*, 2011). In beiden Studien war zudem die gemessene Xanthosinkonzentration in Blättern und Wurzeln höher als die von Uridin. Auch dies wird durch die Messungen in der hier vorliegenden Arbeit bestätigt. Die Analysen von Schoten und Samen zeigen allerdings, dass sich das Mengenverhältnis der Metabolite umkehrt und mehr Uridin als Xanthosin nachgewiesen wurde. Möglicherweise sind der Purin- und Pyrimidinstoffwechsel bezüglich des Verhältnisses von Abbau und Recycling in verschiedenen Geweben der Pflanze unterschiedlich reguliert. Weiterführende Analysen sind hier nötig, um gesicherte Aussagen treffen zu können. Analysen mit radioaktiv-markiertem Xanthosin zeigten für *Arabidopsis thaliana*, dass ein gewisser Anteil der Radioaktivität (14%) in Nukleinsäuren inkorporiert wurde (Riegler *et al.*, 2011). Dies widerspricht den radiochemischen Experimenten, die mit Blättern von Kakao, Kartoffelknollen sowie Keimlingen von Tee und Urbohne durchgeführt wurden (Koyama *et al.*, 2003; Katahira *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2010; Ashihara *et al.*, 2012). In all diesen Studien konnte nach der Inkubation der entsprechenden Gewebe mit radioaktiv-markiertem Xanthosin keine Inkorporation der Radioaktivität in Recyclingprodukte nachgewiesen werden. Xanthosin wurde entweder abgebaut (Urbohne und Kartoffel; Abb. 4.6) oder für den Abbau und die Synthese von Purinalkaloiden genutzt (Tee und Kakao). Hinzu kommt, dass bei Enzymaktivitätsstudien in Kartoffelknollen und Teeblättern keine Xanthosinkinaseaktivität nachweisbar war. Ob sich der Purinnukleotidstoffwechsel von *Arabidopsis* in diesem Punkt von dem anderer Pflanzen unterscheidet (Riegler *et al.*, 2011) oder der jeweilige experimentelle Aufbau der Grund für die abweichenden Beobachtungen ist (Ashihara *et al.*, 2012), bleibt zu klären.

#### 4.3.7 Der Abbau von XMP folgt einem linearen Weg

Die Analyse der Doppelmutante *gsda-2 nsh1-1* im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit zeigt, dass neben einer Akkumulation von Uridin und Guanosin kein beziehungsweise nur eine geringe Menge Xanthosin in Samen, Rosetten, Wurzeln und Schoten nachweisbar ist. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass die Deaminierung von Guanosin die Hauptquelle für den Xanthosin Gehalt in der Pflanze darstellt.

Für die endgültige Erklärung der Herkunft des Xanthosins in der Doppelmutante *gsda-2 nsh1-1* sind weitere Analysen, möglicherweise auch mit einer anderen Verlustmutante, notwendig. Gleichwohl bleibt festzuhalten, dass die Guanosindeaminase den größten Anteil an der Bereitstellung von Xanthosin in *Arabidopsis* hat. Berücksichtigt man zusätzlich, dass eine Guanindeaminaseaktivität in Pflanzen bisher nicht nachgewiesen wurde (Suzuki und Takahashi, 1976; Suzuki *et al.*, 1992; Katahira *et al.*



**Abbildung 4.7 – Modell des Purinnukleotidabbaus in *A. thaliana* basierend auf den Ergebnissen dieser Doktorarbeit und Zrenner *et al.*, 2006.** Die in dieser Arbeit durchgeführten Metabolitanalysen weisen deutlich auf einen linearen Verlauf des Abbaus von XMP zu Xanthin hin. 1: AMP-Deaminase, 2: IMP-Dehydrogenase oder Phosphotransferase, 3: GMP-Synthetase oder Phosphotransferase, 4: 5'-Nukleotidase, 5: Guanosindeaminase, 6: Nukleosidhydrolasen, 7: Xanthindehydrogenase, 8: Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyl-Transferase.

*al.*, 2006), lässt sich folgendes Fazit ziehen: Der Purinnukleotidabbau verläuft linear von XMP über GMP und Guanosin zu Xanthosin und Xanthin (Abb. 4.7). Auch der bei anhaltender Dunkelheit auftretende Phänotyp der *gsda*-Mutanten weist auf diesen linearen Abbauweg hin. Würden andere Reaktionen in ausreichender Menge zum Xanthosin Gehalt beitragen, stünde nach dessen Hydrolyse mehr Ribose zur Verfügung, die zur Kohlenstoffversorgung genutzt werden könnte. Da Xanthosin, wenn überhaupt, nur zu einem geringen Maß recycelt werden kann und bislang auch für Xanthin kein Recycling nachgewiesen wurde (Koyama *et al.*, 2003; Katahira *et al.*, 2006; Deng *et al.*, 2010; Ashihara *et al.*, 2012), stellt die Deaminierung von Guanosin demzufolge eine Schlüsselreaktion dar, die den endgültigen Abbau der Guanylate und von XMP einleitet.

### 4.3.8 Mögliche Rolle der GSDA in anderen Pflanzen

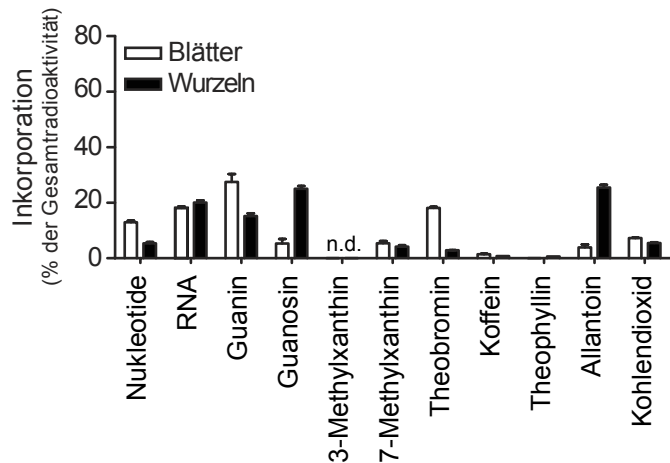
#### 4.3.8.1 Beitrag zum Ureidexport in Leguminosen

In bestimmten Leguminosen, wie zum Beispiel der Sojabohne (*Glycine max*), spielt der Purinnukleotidabbau eine wichtige Rolle beim Export des fixierten Stickstoffs aus den Knöllchen (1.2.1). In Sojabohnen kommen fünf Orthologe der GSDA aus *Arabidopsis thaliana* vor. Mithilfe von RNAseq-Analysen konnte die Transkription für drei dieser Isoformen nachgewiesen werden (Severin *et al.*,

2010). Für eines dieser Gene wurde eine starke Expression in den Knöllchen beobachtet. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die Guanosindeaminase für die Synthese der Ureide in diesem Gewebe benötigt wird. Aus diesem Grund sollte die Funktion der GSDA in der Sojabohne genauer untersucht werden. Erste Versuche zur Stilllegung des Gens der Guanosindeaminase in den Knöllchen der Sojabohne werden in unserem Labor bereits von Dr. Medina-Escobar durchgeführt. Zusammen mit Metabolitanalysen können so die Auswirkungen des *GSDA*-Verlusts auf die Ureidsynthese untersucht werden.

#### 4.3.8.2 Beitrag zur Biosynthese von Purinalkaloiden

Wie in 1.2.2 erwähnt, besteht zum Beispiel bei Kaffee, Tee und Kakao ein Zusammenhang zwischen dem Abbau der Purinnukleotide und der Synthese von Purinalkaloiden wie Koffein und Theobromin. Das Bindeglied beider Stoffwechselwege ist Xanthosin, welches der Ausgangspunkt der Purinalkaloidsynthese ist. Analysen mit radioaktiv-markiertem Guanosin in Tee zeigten zum Beispiel, dass die Radioaktivität sowohl in Recycling- und Abbauprodukten als auch in Theobromin und Koffein nachgewiesen werden konnte (Abb. 4.8 und Deng *et al.*, 2010).



**Abbildung 4.8 – Radiochemische Analyse des Guanostoffwechsels in Blättern und Wurzeln von Teekeimlingen.** Blätter und Wurzeln von Teekeimlingen wurden für 10 Stunden mit radioaktiv-markiertem Guanosin inkubiert. Anschließend wurde die Verteilung der Radioaktivität in den Zwischenprodukten des Purinnukleotidstoffwechsels detektiert. Modifiziert nach Deng *et al.*, 2010.

Auch die Koffeinsynthese in Kaffeeepflanzen geht von Xanthosin aus. Das heißt, die Deaminierung von Guanosin leistet wahrscheinlich einen wichtigen Beitrag zur Synthese dieses Purinalkaloids. Sollte der Purinnukleotidabbau in Kaffee, wie der in Arabidopsis, linear von XMP über GMP und Guanosin zu Xanthosin verlaufen, so würde die Guanosindeaminase sogar den Hauptanteil des Ausgangsstoffs der Biosynthese zur Verfügung stellen. Die Untersuchung dieser Zusammenhänge in Kaffee ist insofern interessant, als dass die Dekoffeinierung von Kaffeebohnen eine große wirtschaftliche Bedeutung hat. Sollte die Guanosindeaminase den Hauptanteil des Xanthosins zur Verfügung stellen, wäre



die Stummschaltung ihres Gens eine biotechnologische Möglichkeit zur Herstellung koffeinfreien Kaffees.

#### 4.4 Schlussbemerkungen

Im Rahmen dieser Doktorarbeit gelang es eine Guanosindeaminase in *Arabidopsis thaliana* genetisch zu identifizieren. Gleichzeitig stellt dies die erste Beschreibung eines GSDA-Gens in allen bekannten Organismen dar.

Biochemische Analysen zeigten, dass das untersuchte Protein Guanosin deaminiert. Darüber hinaus konnte die Funktionalität des Enzyms im Purinnukleotidabbau von *A. thaliana* nachgewiesen werden. Der Mechanismus der Deaminierung des Nucleosids bleibt vorerst ungeklärt. Kristallstrukturanalysen könnten dies ändern und zur Charakterisierung des Enzyms beitragen. Dadurch würde vermutlich auch der strukturelle Unterschied zwischen den Guanin- und Guanosindeaminasen in der Superfamilie der Cytidin-/ Deoxycytidylat-Deaminasen aufgeklärt werden.

Auf der Basis von Metabolitanalysen konnte gezeigt werden, dass der Katabolismus der Purinnucleotide in *Arabidopsis* weitgehend einem linearen Weg folgt. Damit liefert die vorliegende Doktorarbeit einen wichtigen Beitrag zum Verständnis dieses Stoffwechselweges. Weitere Analysen sind jedoch notwendig, um die Regulation des Gleichgewichts zwischen Abbau und Recycling der Purinnucleotide besser zu charakterisieren. Auch der Zusammenhang zwischen der Hydrolyse der Nucleoside und dem Kohlenhydratstoffwechsel stellt eine noch offene Fragestellung dar, die zukünftig genauer untersucht werden sollte.

Neben der weiterführenden Analyse des Purinnucleotidstoffwechsels in *A. thaliana*, sollte die Rolle der Guanosindeaminase in ureid-exportierenden Leguminosen sowie ihr Beitrag zur Synthese von Purinalkaloiden, zum Beispiel in Kaffee, untersucht werden.

# Literaturverzeichnis

- [1] ALONSO, J. M. ; STEPANOVA, A. ; LEISSE, T. ; KIM, C. ; CHEN, H. ; SHINN, P. ; STEVENSON, D. ; ZIMMERMAN, J. ; BARAJAS, P. ; CHEUK, R. ; GADRINAB, C. ; HELLER, C. ; JESKE, A. ; KOESEMA, E. ; MEYERS, C. ; PARKER, H. ; PREDNIS, L. ; ANSARI, Y. ; CHOY, N. ; DEEN, H. ; GERALT, M. ; HAZARI, N. ; HOM, E. ; KARNES, M. ; MULHOLLAND, C. ; NDUBAKU, R. ; SCHMIDT, I. ; GUZMAN, P. ; AGUILAR-HENONIN, L. ; SCHMID, M. ; WEIGEL, D. ; CARTER, D. ; MARCHAND, T. ; RISSEEUW, E. ; BROGDEN, D. ; ZEKO, A. ; CROSBY, W. ; LERRY, C. ; ECKER, J. : Genome-Wide Insertional Mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. In: *Science* 301 (2003), Nr. 5633, S. 653–657
- [2] ARAÚJO, W. L. ; TOHGE, T. ; ISHIZAKI, K. ; LEAVER, C. J. ; FERNIE, A. R.: Protein degradation – an alternative respiratory substrate for stressed plants. In: *Trends in Plant Science* 9 (2011), Nr. 16, S. 1360–1385
- [3] ASHIHARA, H. : Purine Metabolism and the Biosynthesis of Caffeine in Maté Leaves. In: *Phytochemistry* 33 (1993), Nr. 6, S. 1427–1430
- [4] ASHIHARA, H. : Xanthosine metabolism in plants: Metabolic fate of exogenously supplied <sup>14</sup>C-labelled xanthosine and xanthine in intact mungbean seedlings. In: *Phytochemistry Letters* 5 (2012), Nr. 1, S. 100–103. – ISSN 18743900
- [5] ASHIHARA, H. ; CROZIER, A. : Caffeine: a well known but little mentioned compound in plant science. In: *Trends in Plant Science* 6 (2001), Nr. 9, S. 1360–1385
- [6] ASHIHARA, H. ; KATO, M. ; CROZIER, A. : Distribution, Biosynthesis and Catabolism of Methylxanthines in Plants. In: *Handbook of Experimental Pharmacology* (2011), S. 11–31
- [7] ASHIHARA, H. ; STASOLLA, C. ; LOUKANINA, N. ; THORPE, T. A.: Purine metabolism during white spruce somatic embryo development: salvage of adenine, adenosine, and inosine. In: *Plant Science* (2001), Nr. 160, S. 647–657
- [8] ASHIHARA, H. ; TAKASAWA, Y. ; SUZUKI T.: Metabolic fate of guanosine in higher plants. In: *Physiologia Plantarum* (1997), Nr. 100, S. 909–916

- [9] ASHIHARA, H. ; LUIT, B. ; BELMONTE, M. ; STASOLLA, C. : Metabolism of nicotinamide, adenine and inosine in developing microspore-derived canola (*Brassica napus*) embryos. In: *Plant Physiology and Biochemistry* 46 (2008), Nr. 8-9, S. 752–759. – ISSN 09819428
- [10] BAENA-GONZÁLEZ, E. ; ROLLAND, F. ; THEVELEIN, J. M. ; SHEEN, J. : A central integrator of transcription networks in plant stress and energy signalling. In: *Nature* 448 (2007), Nr. 7156, S. 938–942
- [11] BAERENFALLER, K. ; HIRSCH-HOFFMANN, M. ; SVOZIL, J. ; HULL, R. ; RUSSENBERGER, D. ; BISCHOF, S. ; LU, Q. ; GRUISSEM, W. ; BAGINSKY, S. : pep2pro: a new tool for comprehensive proteome data analysis to reveal information about organ-specific proteomes in *Arabidopsis thaliana*. In: *Integrative Biology* 3 (2011), Nr. 3, S. 225
- [12] BARANKIEWICZ, J. ; PASZKOWSKI, J. : Purine Metabolism in Mesophyll Protoplasts of Tobacco (*Nicotiana tabacum*) Leaves. In: *Biochemical Journal* (1980), Nr. 186, S. 343–350
- [13] BROUQUISSE, R. ; GAUDILLÈRE, J.-P. ; RAYMOND, P. : Induction of a Carbon-Starvation-Related Proteolysis in Whole Maize Plants Submitted to Light/Dark Cycles and to Extended Darkness. In: *Plant Physiology* (1998), Nr. 117, S. 1281–1291. – ISSN 0032–0889
- [14] BRYCHKOVA, G. ; ALIKULOV, Z. ; FLUHR, R. ; SAGI, M. : A critical role for ureides in dark and senescence-induced purine remobilization is unmasked in the *Atxdh1* *Arabidopsis* mutant. In: *The Plant Journal* 54 (2008), Nr. 3, S. 496–509
- [15] BUCHANAN-WOLLASTON, V. ; PAGE, T. ; HARRISON, E. ; BREEZE, E. ; LIM, P. O. ; NAM, H. G. ; LIN, J.-F. ; WU, S.-H. ; SWIDZINSKI, J. ; ISHIZAKI, K. ; LEAVER, C. J. : Comparative transcriptome analysis reveals significant differences in gene expression and signalling pathways between developmental and dark/starvation-induced senescence in *Arabidopsis*. In: *The Plant Journal* 42 (2005), Nr. 4, S. 567–585
- [16] CAO, F.-Q. ; WERNER, A. K. ; DAHNCKE, K. ; ROMEIS, T. ; LIU, L.-H. ; WITTE, C.-P. : Identification and Characterization of Proteins Involved in Rice Urea and Arginine Catabolism. In: *Plant Physiology* 154 (2010), Nr. 1, S. 98–108. – ISSN 0032–0889
- [17] CHOMCZYNSKI, P. ; SACCHI, N. : The single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction: twenty-something years on. In: *Nature Protocols* (2006), Nr. 1, S. 581–585
- [18] CLAUSEN, A. R. ; GIRANDON, L. ; ALI, A. ; KNECHT, W. ; ROZPEDOWSKA, E. ; SANDRINI, M. P. B. ; ANDREASSON, E. ; MUNCH-PETERSEN, B. ; PIŠKUR, J. : Two thymidine kinases and one multisubstrate deoxyribonucleoside kinase salvage DNA precursors in *Arabidopsis thaliana*. In: *FEBS Journal* 279 (2012), Nr. 20, S. 3889–3897

- [19] CLOUGH, S. J. ; BENT, A. F.: Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. In: *The Plant Journal* 6 (1998), Nr. 16, S. 735–743
- [20] COMBES, A. ; LAFLEURIEL, J. ; LE FLOC'H, F. : The inosine-guanosine kinase activity of mitochondria in tubers of Jerusalem artichoke. In: *Plant Physiology and Biochemistry* (1989), Nr. 27, S. 729–736. – ISSN 09819428
- [21] CORNELIUS, S. ; WITZ, S. ; ROLLETSCHKE, H. ; MÖHLMANN, T. : Pyrimidine degradation influences germination seedling growth and production of *Arabidopsis* seeds. In: *Journal of Experimental Botany* 62 (2011), Nr. 15, S. 5623–5632. – ISSN 0022–0957
- [22] DAHNCKE, K. ; WITTE, C.-P. : Plant Purine Nucleoside Catabolism Employs a Guanosine Deaminase Required for the Generation of Xanthosine in *Arabidopsis*. In: *The Plant Cell* 25 (2013), Nr. 10, S. 4101–4109
- [23] DATE, R. : Nitrogen, a major limitation in the productivity of natural communities, crops and pastures in the pacific area. In: *Soil Biology and Biochemistry* 5 (1973), Nr. 1, S. 5–18
- [24] DELANNOY, E. ; LE RET, M. ; FAIVRE-NITSCHKE, E. ; ESTAVILLO, G. M. ; BERGDOLL, M. ; TAYLOR, N. L. ; POGSON, B. J. ; SMALL, I. ; IMBAULT, P. ; GUALBERTO, J. M.: *Arabidopsis* tRNA Adenosine Deaminase Arginine Edits the Wobble Nucleotide of Chloroplast tRNA<sup>Arg</sup>(ACG) and Is Essential for Efficient Chloroplast Translation. In: *The Plant Cell* 21 (2009), Nr. 7, S. 2058–2071
- [25] DENG, W.-W. ; ASHIHARA HIROSHI: Profiles of Purine Metabolism in Leaves and Roots of *Camellia sinensis* Seedlings. In: *Plant and Cell Physiology* 51 (2010), Nr. 12, S. 2105–2118. – ISSN 0032–0781
- [26] DIAZ, C. ; LEMAITRE, T. ; CHRIST, A. ; AZZOPARDI, M. ; KATO, Y. ; SATO, F. ; MOROT-GAUDRY, J.-F. ; LE DILY, F. ; MASCLAUX-DAUBRESSE, C. : Nitrogen Recycling and Remobilization Are Differentially Controlled by Leaf Senescence and Development Stage in *Arabidopsis* under Low Nitrogen Nutrition. In: *Plant Physiology* 147 (2008), Nr. 3, S. 1437–1449. – ISSN 0032–0889
- [27] DOMNIK, L. : Untersuchung des Purinkatabolismus und Charakterisierung möglicher 5'-Nukleotidasen in *Arabidopsis thaliana*. In: *Masterarbeit* (2013)
- [28] DOUCET, J.-P. ; TRIFARÓ, J.-M. : A discontinuous and highly porous sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide slab gel system of high resolution. In: *Analytical Biochemistry* (1988), Nr. 168, S. 265–271
- [29] EDWARDS, K. ; JOHNSTONE, C. ; THOMPSON, C. : A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. In: *Nucleic Acids Research* (1991), Nr. 19, S. 1349. – ISSN 0305–1048

- [30] FERNÁNDEZ, J. R. ; BYRNE, B. ; FIRESTEIN, B. L.: Phylogenetic Analysis and Molecular Evolution of Guanine Deaminases: From Guanine to Dendrites. In: *Journal of Molecular Evolution* 68 (2009), Nr. 3, S. 227–235
- [31] FEYS, B. J. ; WIERMER, M. ; BHAT, R. A. ; MOISAN, L. J. ; MEDINA-ESCOBAR, N. ; NEU, C. ; CABRAL, A. ; PARKER, J. E.: Arabidopsis SENESCENCE-ASSOCIATED GENE101 Stabilizes and Signals within an ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 Complex in Plant Innate Immunity. In: *The Plant Cell* 17 (2005), Nr. 9, S. 2601–2613
- [32] FISCHER, M. ; RÖMISCH, W. ; SALLER, S. ; ILLARIONOV, B. ; RICHTER, G. ; ROHDICH, F. ; EISENREICH, W. ; BACHER, A. : Evolution of Vitamin B2 Biosynthesis: Structural and Functional Similarity between Pyrimidine Deaminases of Eubacterial and Plant Origin. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (2004), Nr. 35, S. 36299–36308. – ISSN 0021–9258
- [33] GEIGER, M. ; WALCH-LIU, P. ; ENGELS, C. ; HARNECKER, J. ; SCHULZE, E.-D. ; LUDEWIG, F. ; SONNEWALD, U. ; SCHEIBLE, W.-R. ; STITT, M. : Enhanced carbon dioxide leads to a modified diurnal rhythm of nitrate reductase activity in older plants, and a large stimulation of nitrate reductase activity and higher levels of amino acids in young tobacco plants. In: *Plant, Cell and Environment* (1998), Nr. 21, S. 253–268
- [34] GIBON, Y. ; USADEL, B. ; BLAESING, O. E. ; KAMLAGE, B. ; HOEHNE, M. ; TRETHERWEY, R. ; STITT, M. : Integration of metabolite with transcript and enzyme activity profiling during diurnal cycles in Arabidopsis rosettes. In: *Genome Biology* 7 (2006), Nr. 8, S. R76. – ISSN 14656906
- [35] GRBIC, V. ; BLEECKER, A. : Ethylene regulates the timing of leaf senescence in Arabidopsis. In: *The Plant Journal* (1995), Nr. 8, S. 595–602
- [36] GURANOWSKI, A. : Purine Catabolism in Plants. In: *Plant Physiology* (1982), Nr. 70, S. 344–349. – ISSN 0032–0889
- [37] HARDIE, D. ; CARLING, D. ; CARLSON, M. : THE AMP-ACTIVATED/SNF1 PROTEIN KINASE SUBFAMILY: Metabolic Sensors of the Eukaryotic Cell? In: *Annual Reviews of Biochemistry* (1998), Nr. 67, S. 821–855
- [38] HARDY, R. W. F. ; HAVELKA, U. D.: Nitrogen Fixation Research: A Key to World Food? In: *Science* (1975), Nr. 188, S. 633–643
- [39] HE, Y. ; FUKUSHIGE, H. ; HILDEBRANDE, D. ; GAN, S. : Evidence supporting a role for jasmonic acid in Arabidopsis leaf senescence. In: *Plant Physiology* (2002), Nr. 128, S. 876–884. – ISSN 0032–0889

- [40] HESBERG, C. ; HÄNSCH, R. ; MENDEL, R. ; BITTNER, F. : Tandem Orientation of Duplicated Xanthine Dehydrogenase Genes from *Arabidopsis thaliana*: Differential Gene Expression and Enzyme Activity. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (2004), Nr. 14, S. 13547–13554. – ISSN 0021–9258
- [41] HIGGINS, R. ; DAHMUS, M. : Rapid visualization of protein bands in preparative SDS-Polyacrylamide gels. In: *Analytical Biochemistry* (1979), Nr. 93, S. 257–260
- [42] HÖRTENSTEINER, S. ; FELLER, U. : Nitrogen metabolism and remobilization during senescence. In: *Journal of Experimental Botany* 53 (2002), Nr. 370, S. 927–937. – ISSN 0022–0957
- [43] HRABAK, E. M. ; CHAN, C. ; GRIBSKOV, M. ; HARPER, J. ; CHOI, J. ; HALFORD, N. ; KUDLA, J. ; LUAN, S. ; NIMMO, H. ; SUSSMANN, M. ; THOMAS, M. ; WALKER-SIMMONS, K. ; ZHU, J.-K. ; HARMON, A. : The *Arabidopsis* CDPK-SnRK Superfamily of Protein Kinases. In: *Plant Physiology* 132 (2003), Nr. 2, S. 666–680. – ISSN 0032–0889
- [44] ISIHIDA, Y. S. H. K. M. ; YONEDA, M. : Studies on the guanosine degrading system in bacterial cell. III. Preparation and properties of guanosine deaminase. In: *Agricultural Biology and Chemistry* (1969), Nr. 33, S. 384–390
- [45] ITO, J. ; BATH, T. S. ; PETZOLD, C. J. ; REDDING-JOHANSON, A. M. ; MUKHOPADHYAY, A. ; VERBOOM, R. ; MEYER, E. H. ; MILLAR, A. H. ; HEAZLEWOOD, J. L.: Analysis of the *Arabidopsis* Cytosolic Proteome Highlights Subcellular Partitioning of Central Plant Metabolism. In: *Journal of Proteome Research* 10 (2011), Nr. 4, S. 1571–1582
- [46] IZUMI, M. ; HIDEMA, J. ; MAKINO, A. ; ISHIDA, H. : Autophagy Contributes to Nighttime Energy Availability for Growth in *Arabidopsis*. In: *Plant Physiology* 161 (2013), Nr. 4, S. 1682–1693. – ISSN 0032–0889
- [47] JONES, D. ; ROBERTS, E. ; DAVIES, A. : The Estimation of Serum Guanosine Deaminase in Liver Disease. In: *Journal of Clinical Chemistry & Clinical Biochemistry* (1983), Nr. 21, S. 835–840
- [48] JUNG, B. ; FLÖRCHINGER, M. ; KUNZ, H.-H. ; TRAUB, M. ; WARTENBERG, R. ; JEBLICK, W. ; NEUHAUS, H. E. ; MÖHLMANN, T. : Uridine-Ribohydrolase Is a Key Regulator in the Uridine Degradation Pathway of *Arabidopsis*. In: *THE PLANT CELL ONLINE* 21 (2009), Nr. 3, S. 876–891. – ISSN 1040–4651
- [49] JUNG, B. ; HOFFMANN, C. ; MÖHLMANN, T. : *Arabidopsis* nucleoside hydrolases involved in intracellular and extracellular degradation of purines. In: *The Plant Journal* 65 (2011), Nr. 5, S. 703–711

- [50] KAHN, K. ; TIPTON, P. A.: Spectroscopic Characterization of Intermediates in the Urate Oxidase Reaction. In: *Biochemistry* 37 (1998), Nr. 33, S. 11651–11659. – ISSN 0006–2960
- [51] KALKAN, A. ; BULUT, V. ; EREL, O. ; AVCI, S. ; BINGOL, N. : Adenosine Deaminase and Guanosine Deaminase Activities in Sera of Patients with Viral Hepatitis. In: *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 3 (1999), Nr. 94, S. 383–386
- [52] KATAHIRA, R. ; ASHIHARA H.: Profiles of purine biosynthesis, salvage and degradation in disks of potato (*Solanum tuberosum* L.) tubers. In: *Planta* 225 (2006), Nr. 1, S. 115–126. – ISSN 0032–0935
- [53] KATO, M. ; MIZUNO, K. ; CROZIER, A. ; FUJIMURA, T. ; ASHIHARA, H. : Plant biotechnology: Caffeine synthase gene from tea leaves. In: *Nature* 406 (2000), Nr. 6799, S. 956–957
- [54] KATO, M. ; MIZUNO, K. ; FUJIMURA, T. ; IWAMA, M. ; IRIE, M. ; CROZIER, A. ; ASHIHARA, H. : Purification and Characterization of Caffeine Synthase from Tea Leaves. In: *Plant Physiology* (1999), Nr. 120, S. 579–586. – ISSN 0032–0889
- [55] KLEINBOELTING, N. ; HUEP, G. ; KLOETGEN, A. ; VIEHOEVER, P. ; WEISSHAAR, B. : GABI-Kat SimpleSearch: new features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database. In: *Nucleic Acids Research* 40 (2011), Nr. D1, S. D1211–D1215. – ISSN 0305–1048
- [56] KO, T.-P. ; LIN, J.-L. ; HU, C. ; HSU, Y.-H. ; WANG, A. H.-J. : Crystal Structure of Yeast Cytosine Deaminase: Insights into Enzyme Mechanism and Evolution. In: *Journal of Biological Chemistry* 278 (2003), Nr. 21, S. 19111–19117. – ISSN 0021–9258
- [57] KONCZ, C. ; SCHELL, J. : The promoter of TL-DNA gene 5 controls the tissuespecific expression of chimaeric genes carried by a novel type of *Agrobacterium* binary vector. In: *Molecular Genetics and Genomics* (1986), Nr. 204, S. 383–396
- [58] KOPEČNÁ, M. ; BLASCHKE, H. ; KOPECNY, D. ; VIGOUROUX, A. ; KONCITIKOVA, R. ; NOVAK, O. ; KOTLAND, O. ; STRNAD, M. ; MORERA, S. ; SCHWARTZENBERG, K. v.: Structure and Function of Nucleoside Hydrolases from *Physcomitrella patens* and Maize Catalyzing the Hydrolysis of Purine, Pyrimidine, and Cytokinin Ribosides. In: *Plant Physiology* 163 (2013), Nr. 4, S. 1568–1583. – ISSN 0032–0889
- [59] KOSHIISHI, C. ; KATO, A. ; YAMA, S. ; CROZIER, A. ; ASHIHARA, H. : A new caffeine biosynthetic pathway in tea leaves: utilisation of adenosine released from the S-adenosyl-L-methionine cycle. In: *FEBS Letters* 499 (2001), Nr. 1, S. 50–54. – ISSN 00145793
- [60] KOSHIISHI, C. ; ITO, E. ; AYAKO KATO, A. ; YOSHIDA, Y. ; CROZIER, A. ; ASHIHARA, H. : Purine Alkaloid Biosynthesis in Young Leaves of *camellia sinensis* in Light and Darkness. In: *Journal of Plant Research* (2000), Nr. 113, S. 217–221

- [61] KOYAMA, Y. ; TOMODA, Y. ; KATO, M. ; ASHIHARA, H. : Metabolism of purine bases, nucleosides and alkaloids in theobromine-forming *Theobroma cacao* leaves. In: *Plant Physiology and Biochemistry* 41 (2003), Nr. 11-12, S. 977–984. – ISSN 09819428
- [62] LAI, W. L. ; CHOU, L. Y. ; TING, C. Y. ; KIRBY, R. ; TSAI, Y. C. ; WANG, A. H.-J. ; LIAW, S.-H. : The Functional Role of the Binuclear Metal Center in D-Aminoacylase. In: *Journal of Biological Chemistry* (2004), Nr. 279, S. 13962–13967. – ISSN 0021–9258
- [63] LE FLOC'H, F. ; LAFLEURIEL, J. : The purine nucleosidases of jerusalem artichoke shoots. In: *Phytochemistry Letters* 20 (1981), Nr. 9, S. 2127–2129. – ISSN 18743900
- [64] LE FLOC'H, F. ; FAYE, F. : Metabolic Fate of Adenosine and Purine Metabolism Enzymes in Young Plants of Peach Tree. In: *Journal of Plant Physiology* 145 (1995), Nr. 4, S. 398–404. – ISSN 01761617
- [65] LEE, D. ; MOFFATT, B. A.: Adenine salvage activity during callus induction and plant growth. In: *Physiologia Plantarum* (1994), Nr. 90, S. 739–747
- [66] LIAW, S.-H. ; CHANG, Y.-J. ; LAI, C.-T. ; CHANG, H.-C. ; CHANG, G.-G. : Crystal Structure of *Bacillus subtilis* Guanine Deaminase: The First Domain-Swapped Structure in the Cytidine Deaminase Superfamily. In: *Journal of Biological Chemistry* 279 (2004), Nr. 34, S. 35479–35485. – ISSN 0021–9258
- [67] LICHTENTHALER, H. K. ; BUSCHMANN, C. : Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy. In: *Current Protocols in Food Analytical Chemistry* (2001), S. F.4.3.1–F.4.3.8
- [68] LIM, P. O. ; KIM, H. J. ; GIL NAM, H. : Leaf Senescence. In: *Annual Review of Plant Biology* 58 (2007), Nr. 1, S. 115–136. – ISSN 1543–5008
- [69] LIN, J.-F. ; WU, S.-H. : Molecular events in senescing *Arabidopsis* leaves. In: *The Plant Journal* 39 (2004), Nr. 4, S. 612–628
- [70] LIU, J. ; CAO, S. ; JIA, B. ; WEI, D. ; LIAO, X. ; LU, J. ; ZHAO, Y. : A theoretical and mass spectrometry study of the novel mechanism of N-glycosidic bond cleavage in nucleoside. In: *International Journal of Mass Spectrometry* (2009), Nr. 282, S. 1–5
- [71] LIU, R. ; YE, Y. ; QIANG, L. ; LIAO, X. ; ZHAO, Y. : The fragmentation pathway of the nucleosides under the electrospray ionization multi-stage mass spectrometry. In: *Life Science Journal* 5 (2008), Nr. 2
- [72] LIU, X. ; QIAN, W. ; LIU, X. ; QIN, H. ; WANG, D. : Molecular and functional analysis of hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. In: *New Phytologist* 175 (2007), Nr. 3, S. 448–461. – ISSN 0028646X



- [73] MASCLAUX-DAUBRESSE, C. ; REISDORF-CREN, M. ; ORSEL, M. : Leaf nitrogen remobilisation for plant development and grain filling. In: *Plant Biology* 10 (2008), S. 23–36. – ISSN 14358603
- [74] MATSCHI, S. ; WERNER, S. ; SCHULZE, W. X. ; LEGEN, J. ; HILGER, H. H. ; ROMEIS, T. : Function of calcium-dependent protein kinase CPK28 of *Arabidopsis thaliana* in plant stem elongation and vascular development. In: *The Plant Journal* 73 (2013), Nr. 6, S. 883–896
- [75] MAYNES, J. T. ; YUAN, R. G. ; SNYDER, F. F.: Identification, Expression, and Characterization of *Escherichia coli* Guanine Deaminase. In: *Journal of Bacteriology* 16 (2000), Nr. 182, S. 4658–4660
- [76] MAZZAFERA, P. ; CARVALHO, A. : Breeding for low seed caffeine content of coffee (*Coffea L.*) by interspecific hybridization. In: *Euphytica* (1992), Nr. 59, S. 55–60
- [77] MIYASHITA, Y. ; GOOD, A. G.: NAD(H)-dependent glutamate dehydrogenase is essential for the survival of *Arabidopsis thaliana* during dark-induced carbon starvation. In: *Journal of Experimental Botany* 59 (2008), Nr. 3, S. 667–680. – ISSN 0022–0957
- [78] MOFFATT, B. A. ; WANG, L. ; ALLEN, M. S. ; STEVENS, Y. Y. ; QIN, W. ; SNIDER, J. ; SCHWARTZENBERG, K. v.: Adenosine Kinase of *Arabidopsis*. Kinetic Properties and Gene Expression. In: *Plant Physiology* (2000), Nr. 124, S. 1775–1785. – ISSN 0032–0889
- [79] MORRIS, K. ; MACKERNES, S. ; PAGE, T. ; JOHN, C. ; MURPHY, A. ; CARR, J. ; BUCHANAN-WOLLASTON, V. : Salicylic acid has a role in regulating gene expression during leaf senescence. In: *The Plant Journal* (2000), Nr. 23, S. 677–685
- [80] MULLIS, K. ; FALOONA, F. ; SCHARF, S. ; SAIKI, R. ; HORN, G. ; ERLICH, H. : Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. In: *Cold Spring* (1986), Nr. 51, S. 263–273
- [81] MURASHIGE, T. ; SKOOG, F. : A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. In: *Physiologia Plantarum* 15 (1962), Nr. 3, S. 473–497
- [82] NAKAGAWA, A. ; SAKAMOTO, S. ; TAKAHASHI, M. ; MORIKAWA, H. ; SAKAMOTO, A. : The RNAi-Mediated Silencing of Xanthine Dehydrogenase Impairs Growth and Fertility and Accelerates Leaf Senescence in Transgenic *Arabidopsis* Plants. In: *Plant and Cell Physiology* 48 (2007), Nr. 10, S. 1484–1495. – ISSN 0032–0781
- [83] NEGISHI, O. ; OZAWA, T. ; IMAGAWA, H. : Biosynthesis of Caffeine from Purine Nucleotides in Tea Plant. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 3 (1992), Nr. 56, S. 499–503
- [84] NEGISHI, O. ; OZAWA, T. ; IMAGAWA, H. : Guanosine deaminase and guanine deaminase from tea leaves. In: *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 7 (1994), Nr. 58, S. 1277–1281

- [85] NYGAARD, P. ; BESTED, S. M. ; ANDERSEN, K. A. ; SAXLID, H. H.: Bacillus subtilis guanine deaminase is encoded by the yknA gene and is induced during growth with purines as the nitrogen source. In: *Microbiology* (2000), Nr. 146, S. 3061–3069
- [86] OUYANG, M. ; MA, J. ; ZOU, M. ; GUO, J. ; WANG, L. ; LU, C. ; ZHANG, L. : The photosensitive phs1 mutant is impaired in the riboflavin biogenesis pathway. In: *Journal of Plant Physiology* 167 (2010), Nr. 17, S. 1466–1476. – ISSN 01761617
- [87] PALETZKI, R. : Cloning and characterization of guanine deaminase from mouse and rat brain. In: *Neuroscience* 109 (2002), Nr. 1, S. 15–26
- [88] PEREIRA-CARO, G. ; BORGES, G. ; NAGAI, C. ; JACKSON, M. C. ; YOKOTA, T. ; CROZIER, A. ; ASHIHARA, H. : Profiles of Phenolic Compounds and Purine Alkaloids during the Development of Seeds of Theobroma cacao cv. Trinitario. In: *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61 (2013), Nr. 2, S. 427–434
- [89] PRICE, J. ; LAXMI, A. ; ST. MARTIN, S. K. ; JANG, J.-C. : Global Transcription Profiling Reveals Multiple Sugar Signal Transduction Mechanisms in Arabidopsis. In: *The Plant Cell* 16 (2004), Nr. 8, S. 2128–2150
- [90] RAMAZZINA, I. ; FOLLI, C. ; SECCHI, A. ; BERNI, R. ; PERCUDANI, R. : Completing the uric acid degradation pathway through phylogenetic comparison of whole genomes. In: *Nature Chemical Biology* 3 (2006), Nr. 2, S. 144–148. – ISSN 1552–4450
- [91] RIEGLER, H. ; GESERICK, C. ; ZRENNER, R. : Arabidopsis thaliana nucleosidase mutants provide new insights into nucleoside degradation. In: *New Phytologist* 191 (2011), Nr. 2, S. 349–359. – ISSN 0028646X
- [92] ROBERTS, E. L. ; NEWTON, R. P.: Estimation of guanine deaminase using guanosine as a “prosubstrate”. In: *Analytical Biochemistry* 324 (2004), Nr. 2, S. 250–257
- [93] SAINT-MARC, C. ; DAIGNAN-FORNIER, B. : GUD1 (YDL238c) encodes Saccharomyces cerevisiae guanine deaminase, an enzyme expressed during post-diauxic growth. In: *Yeast* 21 (2004), Nr. 16, S. 1359–1363. – ISSN 0749–503X
- [94] SCHLUEPMANN, H. ; DIJKEN, A. van ; AGHDASI, M. ; WOBBS, B. ; PAUL, M. ; SREEKENS, S. : Trehalose Mediated Growth Inhibition of Arabidopsis Seedlings Is Due to Trehalose-6-Phosphate Accumulation. In: *Plant Physiology* 135 (2004), Nr. 2, S. 879–890. – ISSN 0032–0889
- [95] SCHUBERT, K. R.: Products of Biological Nitrogen Fixation in Higher Plants: Synthesis, Transport, and Metabolism. In: *Annual Reviews of Plant Physiology* (1986), Nr. 37, S. 539–574

- [96] SEIBERT, C. ; RAUSHEL, F. : Structural and Catalytic Diversity within the Amidohydrolase Superfamily. In: *Biochemistry* (2005), Nr. 44, S. 6383–6391. – ISSN 0006–2960
- [97] SERVENTI, F. ; RAMAZZINA, I. ; LAMBERTO, I. ; PUGGIONI, V. ; GATTI, R. ; PERCUDANI, R. : Chemical Basis of Nitrogen Recovery through the Ureide Pathway: Formation and Hydrolysis of S -Ureidoglycine in Plants and Bacteria. In: *ACS Chemical Biology* 5 (2010), Nr. 2, S. 203–214. – ISSN 1554–8929
- [98] SESSIONS, A. ; BURKE, E. ; PRESTING, G. ; AUX, G. ; MCELVER, J. ; PATTON, D. ; DIETRICH, B. ; HO, P. ; BACWADEN, J. ; KO, C. ; CLARKE, J. ; COTTON, D. ; BULLIS, D. ; SNELL, J. ; MIGUEL, T. ; HUTCHISON, D. ; KIMMERLY, B. ; MITZEL, T. ; KATAGIRI, F. ; GLAZEBROOK, J. ; LAW, M. ; GOFF, S. : A High-Throughput Arabidopsis Reverse Genetics System. In: *The Plant Cell* 14 (2002), Nr. 12, S. 2985–2994
- [99] SEVERIN, A. J. ; WOODY, J. L. ; BOLON, Y.-T. ; JOSEPH, B. ; DIERS, B. W. ; FARMER, A. D. ; MUEHLBAUER, G. J. ; NELSON, R. T. ; GRANT, D. ; SPECHT, J. E. ; GRAHAM, M. A. ; CANNON, S. B. ; MAY, G. D. ; VANCE, C. P. ; SHOEMAKER, R. C.: RNA-Seq Atlas of *Glycine max*: a guide to the soybean transcriptome. In: *BMC plant biology* 10 (2010), S. 160. – ISSN 1471–2229
- [100] STASOLLA, C. ; KATAHIRA, R. ; THORPE, T. A. ; ASHIHARA, H. : Purine and pyrimidine nucleotide metabolism in higher plants. In: *Journal of Plant Physiology* 160 (2003), Nr. 11, S. 1271–1295. – ISSN 01761617
- [101] SUKRONG, S. ; YUN, K.-Y. ; STADLER, P. ; KUMAR, C. ; FACCIUOLO, T. ; MOFFATT, B. A. ; FALCONE, D. L.: Improved Growth and Stress Tolerance in the Arabidopsis *oxl1* Mutant Triggered by Altered Adenine Metabolism. In: *Molecular Plant* 5 (2012), Nr. 6, S. 1310–1332. – ISSN 1674–2052
- [102] SUZUKI, T. ; ASHIHARA, H. ; WALLER GEORGE, W. R.: Purine and purine alkaloids metabolism in *Camellia* and *Coffea* plant. In: *Phytochemistry* 31 (1992), Nr. 8, S. 2575–2584
- [103] SUZUKI, T. u. T. E.: Caffeine Biosynthesis in *Camellia Sinensis*. In: *Phytochemistry* (1976), Nr. 15, S. 1235–1239
- [104] SZUWART, M. ; STARZYŃSKA, E. ; PIETROWSKA-BOREK, M. ; GURANOWSKI, A. : Calcium-stimulated guanosine–inosine nucleosidase from yellow lupin (*Lupinus luteus*). In: *Phytochemistry* 67 (2006), Nr. 14, S. 1476–1485
- [105] THE ARABIDOPSIS GENOME INITIATIVE: Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. In: *Nature* (2000), Nr. 408, S. 796–815

- [106] THIMM, O. ; BLÄSING, O. ; GIBON, Y. ; NAGEL, A. ; MEYER, S. ; KRÜGER, P. ; SELBIG, J. ; MÜLLER, L. A. ; RHEE, S. Y. ; STITT, M. : Mapman: a user-driven tool to display genomics data sets onto diagrams of metabolic pathways and other biological processes. In: *The Plant Journal* (2004), Nr. 37, S. 914–939
- [107] TISSIER, A. ; MARILLONNET, S. ; KLIMYUK, V. ; PATEL, K. ; TORRES, M. ; MURPHY, G. ; JONES, J. : Multiple Independent Defective Suppressor-mutator Transposon Insertions in Arabidopsis: A Tool for Functional Genomics. In: *The Plant Cell* (1999), Nr. 11, S. 1841–1852
- [108] TSAI, A. Y.-L. ; GAZZARRINI, S. : AKIN10 and FUSCA3 interact to control lateral organ development and phase transitions in Arabidopsis. In: *The Plant Journal* 69 (2012), Nr. 5, S. 809–821
- [109] USADEL, B. ; BLÄSING, O. E. ; GIBON, Y. ; RETZLAFF, K. ; HOHNE, M. ; GUNTHER, M. ; STITT, M. : Global Transcript Levels Respond to Small Changes of the Carbon Status during Progressive Exhaustion of Carbohydrates in Arabidopsis Rosettes. In: *Plant Physiology* 146 (2008), Nr. 4, S. 1834–1861. – ISSN 0032–0889
- [110] VOINNET, O. ; RIVAS, S. ; MESTRE, P. ; BAULCOMBE, D. : An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. In: *The Plant Journal* (2003), Nr. 33, S. 949–956
- [111] WAHL, V. ; PONNU, J. ; SCHLERETH, A. ; ARRIVault, S. ; LANGENECKER, T. ; FRANKE, A. ; FEIL, R. ; LUNN, J. E. ; STITT, M. ; SCHMID, M. : Regulation of Flowering by Trehalose-6-Phosphate Signaling in Arabidopsis thaliana. In: *Science* 339 (2013), Nr. 6120, S. 704–707
- [112] WALSH, T. ; GREEN, S. ; LARRINUA, I. ; SCHMITZER, P. : Characterization of Plant b-Ureidopropionase and Functional Overexpression in Escherichia coli. In: *Plant Physiology* (2001), Nr. 125, S. 1001–1011. – ISSN 0032–0889
- [113] WANG, M. ; WEISS, M. ; SIMONOVIC, M. ; HAERTINGER, G. ; SCHRIMPF, S. P. ; HENGARTNER, M. O. ; MERING, C. v.: PaxDb, a Database of Protein Abundance Averages Across All Three Domains of Life. In: *Molecular & Cellular Proteomics* 11 (2012), Nr. 8, S. 492–500. – ISSN 1535–9476
- [114] WATANABE, M. ; BALAZADEH, S. ; TOHGE, T. ; ERBAN, A. ; GIAVALISCO, P. ; KOPKA, J. ; MUELLER-ROEBER, B. ; FERNIE, A. R. ; HOEFGEN, R. : Comprehensive Dissection of Spatiotemporal Metabolic Shifts in Primary, Secondary, and Lipid Metabolism during Developmental Senescence in Arabidopsis. In: *Plant Physiology* 162 (2013), Nr. 3, S. 1290–1310. – ISSN 0032–0889

- [115] WATANABE, S. ; NAKAGAWA, A. ; IZUMI, S. ; SHIMADA, H. ; SAKAMOTO, A. : RNA interference-mediated suppression of xanthine dehydrogenase reveals the role of purine metabolism in drought tolerance in Arabidopsis. In: *FEBS Letters* 584 (2010), Nr. 6, S. 1181–1186. – ISSN 00145793
- [116] WERNER, A. K. ; SPARKES, I. A. ; ROMEIS, T. ; WITTE, C.-P. : Identification, Biochemical Characterization, and Subcellular Localization of Allantoate Amidohydrolases from Arabidopsis and Soybean. In: *Plant Physiology* 146 (2007), Nr. 2, S. 418–430. – ISSN 0032–0889
- [117] WERNER, A. K. ; ROMEIS, T. ; WITTE, C.-P. : Ureide catabolism in Arabidopsis thaliana and Escherichia coli. In: *Nature Chemical Biology* 6 (2010), Nr. 1, S. 19–21. – ISSN 1552–4450
- [118] WERNER, A. K. ; WITTE, C.-P. : The biochemistry of nitrogen mobilization: purine ring catabolism. In: *Trends in Plant Science* 16 (2011), Nr. 7, S. 381–387
- [119] WILLIAMS, W. ; TURNER, C. : Guanine and Guanosine Deaminase Activity of Rat Mammary Gland Homogenates Through Pregnancy and Lactation. In: *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* (1957), Nr. 95, S. 51–53
- [120] WITTE, C.-P. ; NOEL, L. ; GIELBER, J. ; PARKER, J. E. ; ROMEIS, T. : Rapid one-step protein purification from plant material using the eight-amino acid StrepII epitope. In: *Plant Molecular Biology* (2004), Nr. 55, S. 135–147
- [121] WITTE, C.-P. ; MEDINA-ESCOBAR, N. : In-Gel Detection of Urease with Nitroblue Tetrazolium and Quantification of the Enzyme from Different Crop Plants Using the Indophenol Reaction. In: *Analytical Biochemistry* 290 (2001), Nr. 1, S. 102–107
- [122] WU, F.-H. ; SHEN, S.-C. ; LEE, L.-Y. ; LEE, S.-H. ; CHAN, M.-T. ; LIN, C.-S. : Tape-Arabidopsis Sandwich - a simpler Arabidopsis protoplast isolation method. In: *Plant Methods* 5 (2009), Nr. 1, S. 16. – ISSN 1746–4811
- [123] XU, J. ; ZHANG, H. ; XIE, C. ; XUE, H. ; DIJKHUIS, P. ; LIU, C. : Embryonic factor 1 encodes anAMPdeaminase and is essential for zygote to embryo transition in Arabidopsis. In: *The Plant Journal* (2005), Nr. 42, S. 743–758
- [124] XU, Y.-F. ; LÉTISSE, F. ; ABSALAN, F. ; LU, W. ; KUZNETSOVA, E. ; BROWN, G. ; CAUDY, A. A. ; YAKUNIN, A. F. ; BROACH, J. R. ; RABINOWITZ, J. D.: Nucleotide degradation and ribose salvage in yeast. In: *Molecular Systems Biology* 9 (2013). – ISSN 1744–4292
- [125] YAO, L. ; CUKIER, R. I. ; YAN, H. : Catalytic Mechanism of Guanine Deaminase: An ONIOM and Molecular Dynamics Study. In: *The Journal of Physical Chemistry B* 111 (2007), Nr. 16, S. 4200–4210

- [126] YE, C. ; UN, Y. ; ZHOU, H. ; CHENG, F. ; LI, X. : Isolation and analysis of purine alkaloids from *Camellia ptilophylla*. In: *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* (1997), Nr. 36, S. 30–33
- [127] YUAN, G. ; BIN C. JAMES ; MCKAY, D. J. ; SNYDER, F. F.: Cloning and Characterization of Human Guanine Deaminase. In: *The Journal of Biological Chemistry* 274 (1999), Nr. 12, S. 8175–8180
- [128] ZHANG, Y. ; PRIMAVESI, L. F. ; JHURREEA, D. ; ANDRALOJC, P. J. ; MITCHELL, R. A. ; POWERS, S. J. ; SCHLUEPMANN, H. ; DELATTE, T. ; WINGLER, A. ; PAUL, M. J.: Inhibition of SNF1-Related Protein Kinase1 Activity and Regulation of Metabolic Pathways by Trehalose-6-Phosphate. In: *Plant Physiology* 149 (2009), Nr. 4, S. 1860–1871. – ISSN 0032–0889
- [129] ZRENNER, R. ; STITT, M. ; SONNEWALD, U. ; BOLDT, R. : Pyrimidine and Purine Biosynthesis and Degradation in Plants. In: *Annual Reviews of Plant Physiology* (2006), Nr. 57, S. 805–836

# Lebenslauf

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

# Publikationen und Kongresse

## Publikationen

**Dahncke, K.; Witte, C.-P.** (2013) Plant purine nucleoside catabolism employs a guanosine deaminase required for the generation of xanthosine in Arabidopsis. *Plant Cell* 25, 4101-4109.

Diese Publikation basiert auf Daten der vorliegenden Dissertation.

**Cao, F. Q.; Werner, A.-K.; Dahncke, K.; Romeis, T.; Liu, L. H.; Witte C.-P.** (2010) Identification and characterisation of proteins involved in rice urea and arginine catabolism. *Plant Physiology* 154, 98-108.

**Hyyryläinen, H.; Marciniak, B. C.; Dahncke, K.; Pietiäinen, M.; Courtin, P.; Vitikainen, M.; Seppala, R.; Otto, A.; Becher, D.; Chapot-Chartier, M.-P.; Kuipers, O. P.; Kontinen V. P.** (2010) Penicillin-binding protein folding is dependent on the PrsA peptidyl-prolyl cis – trans isomerase in *Bacillus subtilis*. *Molecular Microbiology* 77 (1), 108–127

## Kongresse

- |      |   |
|------|---|
| 2010 | DAAD Symposium „Modern Application of Biotechnology“ in Peking; Vortrag   |
| 2011 | Tagung „Molekularbiologie der Pflanzen“ in Dabringhausen; Posterpräsentation Botanikertagung in Berlin; Posterpräsentation (Gewinn des Posterpreises) |
| 2012 | Havel-Spree-Colloquium in Potsdam-Golm; Vortrag<br>DAAD Symposium „Modern Application of Biotechnology“ in Dresden; Vortrag                           |



# Danksagung

Als erstes möchte ich mich bei PD Dr. Claus-Peter Witte für die Betreuung meiner Doktorarbeit. Als sich zeigte, dass mein anfängliches Nebenprojekt immer mehr Raum einnimmt, war ich zunächst noch etwas skeptisch. Rückblickend bin ich aber sehr froh, dass alles genauso gekommen ist und stolz auf dass, was wir gemeinsam mit diesem Projekt erreicht haben. Dass ich das Vertrauen und die Freiheit hatte, mit der HPLC „zu spielen“, freut mich wirklich sehr und dafür möchte ich mich auch bedanken.

Frau Prof. Dr. Romeis danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens meiner Doktorarbeit und für die vielen motivierenden Gespräche, die im Laufe der Zeit immer wieder stattfanden.

Meinen Doktorandenkollegen der AG Witte und der AG Romeis danke ich für den wissenschaftlichen Austausch aber vor allem auch dafür, dass es eine Gemeinschaft gibt, die den Alltag im Labor am Laufen hält. Daran haben und hatten auch Britta, Silke, Renate, Ruth und Karla einen wichtigen Anteil, danke dafür.

Bei Nieves möchte ich mich dafür bedanken, dass sie die Funktion des „Lab-Managers“ der AG Witte übernommen und so uns Doktoranden das Arbeiten im Labor noch etwas angenehmer gemacht hat. Ein spezieller Dank gilt Andrea, die mich seit dem ersten Tag mit ihrem Organisationstalent beeindruckt hat, aber vor allem weil sie, wann immer es nötig war, die „Weisheit der erfahrenen Doktorandin“ mit mir teilte.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei allen Teilnehmern des Mittwochkochens, des Laborkinos und des „1. FC Arabidopsis“ für das lustige Miteinander abseits der Laborbank. Ebenso danke ich Karla dafür, dass sie uns immer wieder in ihrem Garten willkommen geheißen hat und wir sehr schöne Nachmittage dort verbringen durften.

Abschließend möchte ich meiner Familie, insbesondere meinen Eltern, danken. Es ist schön zu wissen, dass da immer jemand ist, der mich unterstützt.

# Anhang A

## Abbildungen

### *E. coli* Guanindeaminase

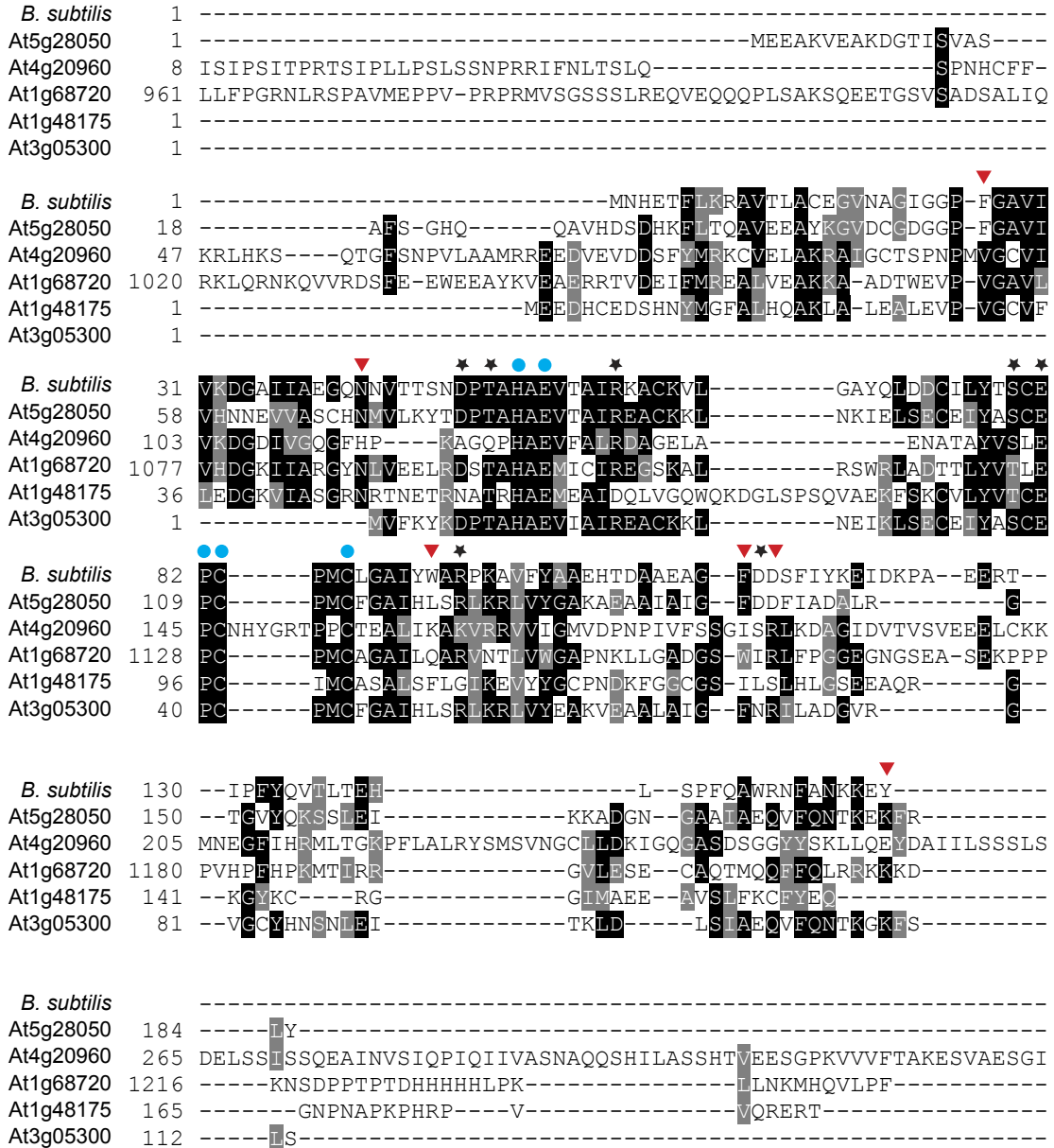
MMSGEHTLKAVRGSFIDVTRTIDNPEEIASALRFIEDGLLLIKQGKVEWFGEWENGKHQIPDTIRVRDYR  
GKLIVPGFVDTHIHYPQSEMVGAYGEQLEWLNKHTFP TERRYEDLEYAREMSAFFIKQLLRNGTTTALV  
FGTVHPQSVDALFEAASHINMRMIAGKVMMDRNPADYLLDTAESSYHQSKELIERWHKNGRLLYAITPRF  
APTSSPEQMAMAQRLKEEYPDTWVHHLNENKDEIAWVKSLYPDHDGYLDVYHQYGLTGKNCVFAHCVHL  
EEKEWDRLSEKSSIAFCPTSNLYLGSGLFNLKAWQKKVKVGMGTDIGAGTTFNMLQTLNEAYKVLQLQ  
GYRLSAYEAFYLATLGGAKSLGLDDLIGNFLPGKEADFVMEPTATPLQQLRYDNSVSLVDKLFVMMTLG  
DDRSIYRTYVDGRLVYERN

### *B. subtilis* Guanindeaminase

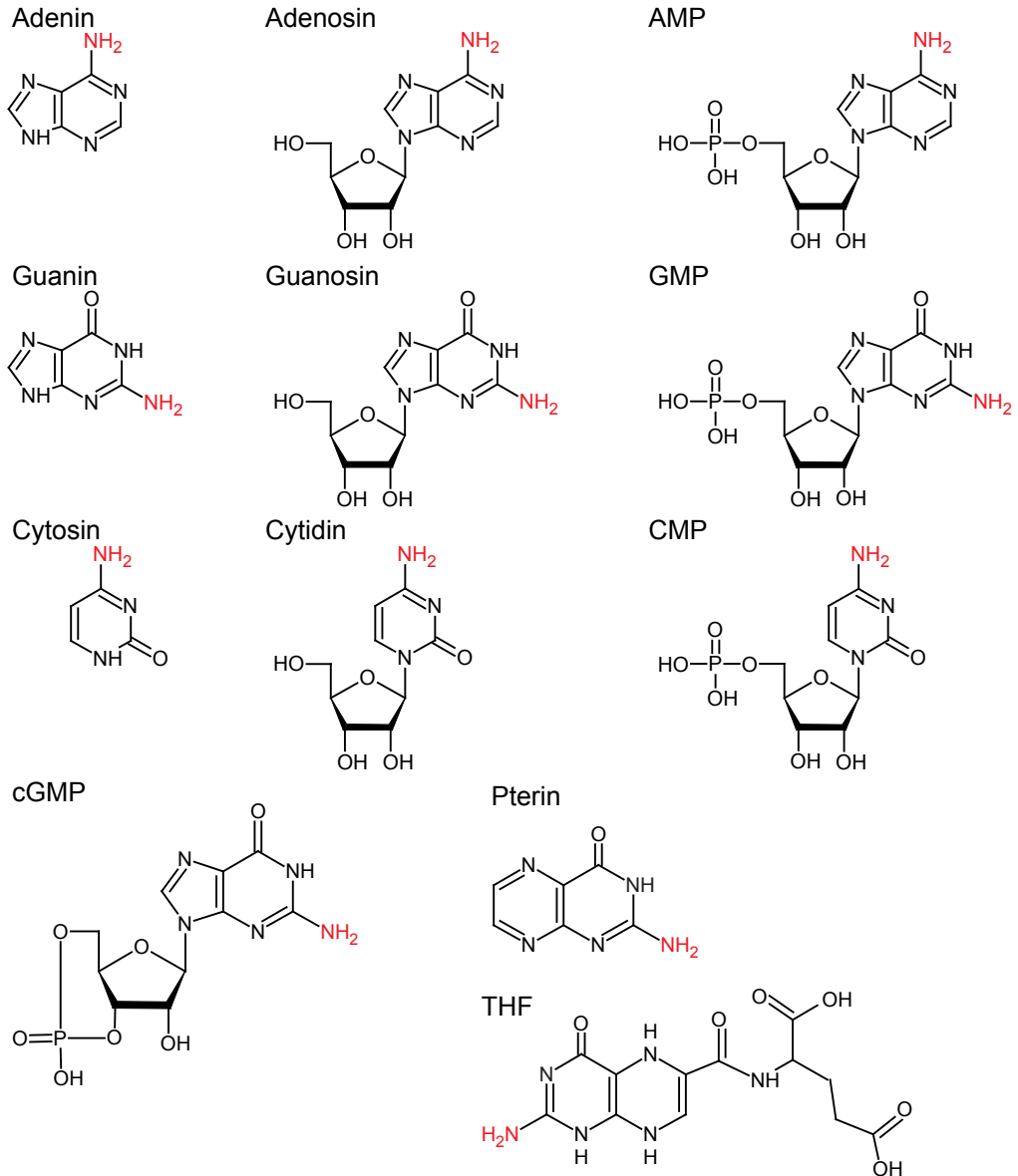
MNHETFLKRAVTLACEGVNAGIGGPF GAVIVKDGAIIEGQNNVTTSNDPTAHAEVTAIRKACKVLGAYQ  
LDDCILYTSCEPCPMCLGAIYWARPKAVFYAAEHTDAAEAGFDDSFYIYKEIDKPAEERTIPFYQVTLTEH  
LSPFQAWRN FANKKEY

**Abbildung A.1 – Aminosäuresequenzen der bakteriellen Guanindeaminasen.** Dargestellt sind die Aminosäuresequenzen der Guanindeaminasen von *E. coli* (UniProt-Nr. P76641) und *B. subtilis* (UniProt-Nr. O34598). Beide wurden für Sequenzvergleiche mit dem Arabidopsisproteom genutzt.

ANHANG A. ABBILDUNGEN



**Abbildung A.2 – Proteinsequenzvergleich zwischen der Guanidase von *B. subtilis* und möglichen Orthologen aus *A. thaliana*.** Identische Aminosäuren sind schwarz unterlegt. Grau unterlegte Aminosäuren sind nicht identisch besitzen aber ähnliche Eigenschaften. Zusätzlich wurden Aminosäuren denen laut der Kristallstrukturanalyse der Deaminase aus *B. subtilis* eine Funktion zugeordnet wurde wie folgt markiert: Blaue Kreise = Aminosäuren, die in der Cytidin-/ Deoxycytidylat-Deaminase Superfamilie konserviert und an der Deaminierung beteiligt sind. Rote Dreiecke = Aminosäuren die an der Bindung von Guanin beteiligt sind. Schwarze Sterne = Aminosäuren, die an der Ausbildung strukturell wichtiger Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind. Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalO hergestellt und mit Boxshade eingefärbt. Die Sequenzen von At4g20960 und At1g68720 sind nur teilweise dargestellt.



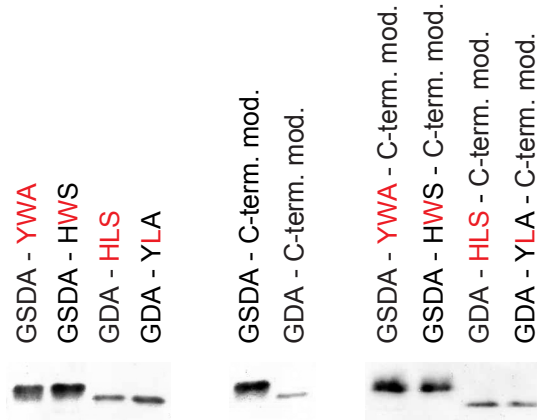
**Abbildung A.3 – Strukturformeln der zur Aktivitätsbestimmung eingesetzten potentiellen Substrate.** Dargestellt sind die Strukturformeln der Verbindungen die als mögliche Substrate der putativen Guanindeaminase getestet wurden. Die zur Deaminierung zur Verfügung stehenden Aminogruppen sind rot markiert. AMP: Adenosinmonophosphat; GMP: Guanosinmonophosphat; CMP: Cytidinmonophosphat; cGMP: cyclisches Guanosinmonophosphat; THF: Tetrahydrofolsäure.



**Abbildung A.4** – Vorhergehende Seite: **Proteinsequenzvergleich pflanzlicher Guanosindeaminasen.** Die Proteinsequenz der GSDA aus *A. thaliana* wurde genutzt um in der Phytozome-Datenbank Orthologe in *Medicago truncatula*, *Glycine max*, *Phaseolus vulgaris*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*, *Oryza sativa*, *Panicum virgatum*, *Theobroma cacao*, *Solanum lycopersicum*, *Fragaria vesca*, *Populus trichocarpa*, *Gossypium raimondii*, *Solanum tuberosum*, *Aquilegia coerulea*, *Brachypodium distachyon*, *Physcomitrella patens* zu identifizieren. Aminosäuren sind schwarz unterlegt, wenn sie in allen Sequenzen identisch sind. Grau unterlegte Aminosäuren sind nicht identisch, besitzen aber ähnliche Eigenschaften. Zusätzlich wurden Aminosäuren denen laut der Kristallstrukturanalyse der Deaminase aus *B. subtilis* eine Funktion zugeordnet wurde wie folgt markiert: Blaue Kreise = Aminosäuren, die in der Cytidin-/ Deoxycytidylat-Deaminase Superfamilie konserviert und an der Deaminierung beteiligt sind. Rote Dreiecke = Aminosäuren die an der Bindung von Guanin beteiligt sind. Schwarze Sterne = Aminosäuren, die an der Ausbildung strukturell wichtiger Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind. Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalO hergestellt und mit Boxshade eingefärbt.

**Abbildung A.5** – Nächste Seite: **Proteinsequenzvergleich zwischen GDAs und GSDAs.** Die Sequenzen verschiedener bakterieller GDAs wurden für einen Vergleich mit den Sequenzen der GSDAs, der in [Abbildung A.4](#) aufgeführten Pflanzen genutzt. Die GDAs folgender Bakterien wurden einbezogen: *Bacillus subtilis*, *Sulfurimonas denitrificans*, *Clostridium botulinum*, *Nitrococcus mobilis*, *Microscilla marina*, *Polaribacter irgensii*, *Bacillus licheniformis*, *Bacillus clausii*, *Bacillus pumilus*, *Arthrobacter aurescens*, *Deltaproteobacterium MLMS-1* und *Saccharopolyspora erythraea* Aminosäuren sind schwarz unterlegt, wenn sie in allen Sequenzen identisch sind. Grau unterlegte Aminosäuren sind nicht identisch, besitzen aber ähnliche Eigenschaften. Zusätzlich wurden Aminosäuren denen laut der Kristallstrukturanalyse der Deaminase aus *B. subtilis* eine Funktion zugeordnet wurde wie folgt markiert: Blaue Kreise = Aminosäuren, die in der Cytidin/ Deoxycytidylat Deaminase Superfamilie konserviert und an der Deaminierung beteiligt sind. Rote Dreiecke = Aminosäuren die an der Bindung von Guanin beteiligt sind. Schwarze Sterne = Aminosäuren, die an der Ausbildung strukturell wichtiger Wasserstoffbrückenbindungen beteiligt sind. Die Position an der sich das Motiv „HLS“ bzw. „YWA“ befindet, ist mit einem roten Balken markiert. Der Sequenzvergleich wurde mit ClustalO hergestellt und mit Boxshade eingefärbt.





**Abbildung A.6 – Affinitätschromatographische Aufreinigung veränderter Varianten der GSDA aus *A. thaliana* sowie der GDA aus *B. subtilis* nach transienter Expression in *N. benthamiana*.** Verschiedene Enzymvarianten der GSDA sowie der GDA wurden Strep-markiert in *N. benthamiana* exprimiert und anschließend affinitätschromatographisch aufgereinigt. Gezeigt sind hier die Elutionsfraktionen aller Enzymvarianten. Exprimiert und aufgereinigt wurden zum einen Proteinvarianten die Mutationen im aktiven Zentrum tragen (links). Hierbei wurde in der pflanzlichen GSDA das Aminosäuremotiv HLS (Position 118 bis 120) zu YWA bzw. HWS verändert. In der bakteriellen GDA hingegen wurde das Motiv YWA (Position 91 bis 93) zu HLS bzw. YLA verändert (von der Wildtypsequenz abweichende Aminosäuren sind rot markiert). Darüber hinaus wurden Varianten bei denen die C-Termini beider Proteine (pflanzlich und bakteriell) ausgetauscht wurden (Mitte) exprimiert und aufgereinigt, sowie Varianten die Kombinationen aus Mutationen im aktiven Zentrum und am C-Terminus aufweisen (rechts). C-term. mod., C-terminal-modifiziert.



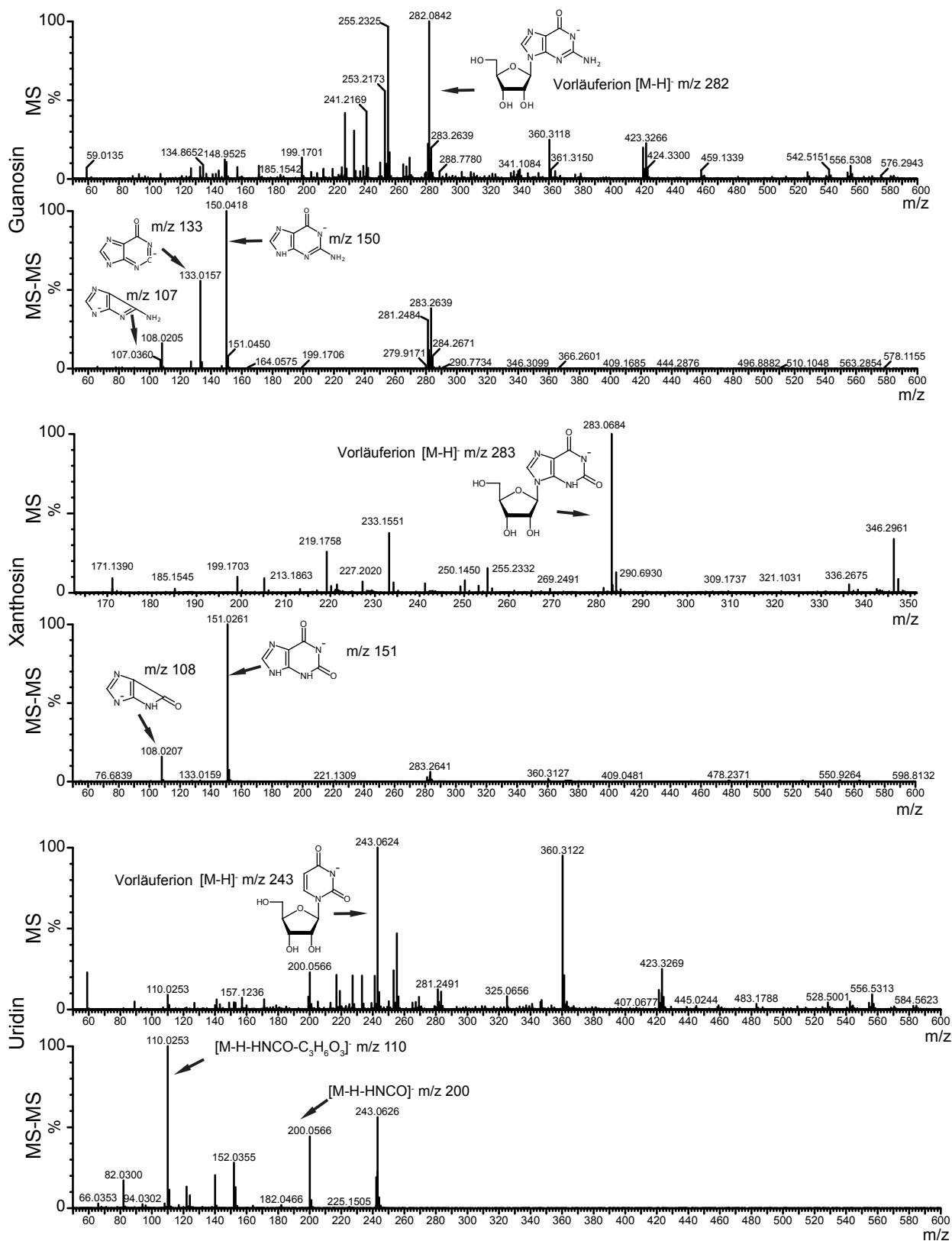
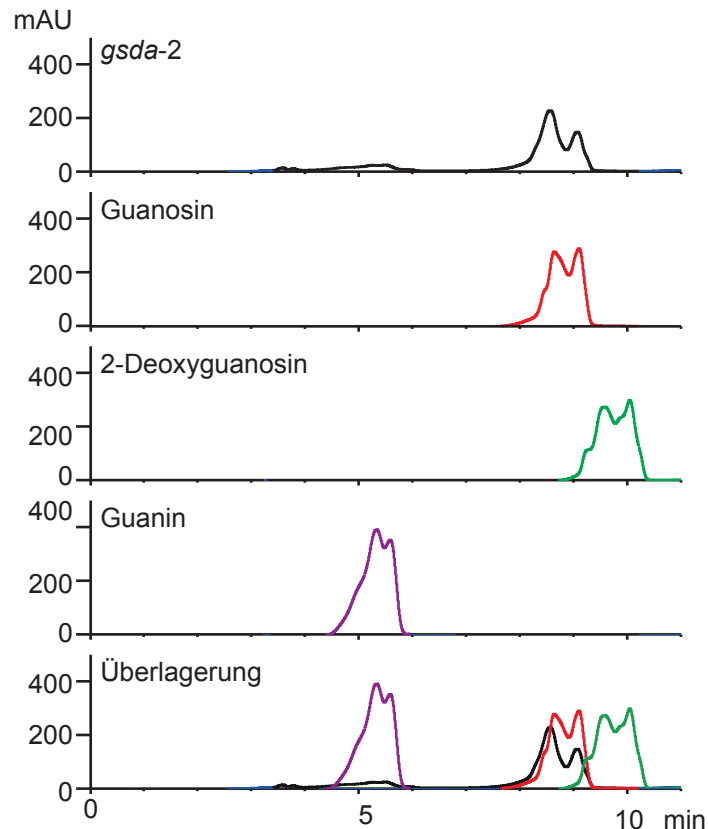
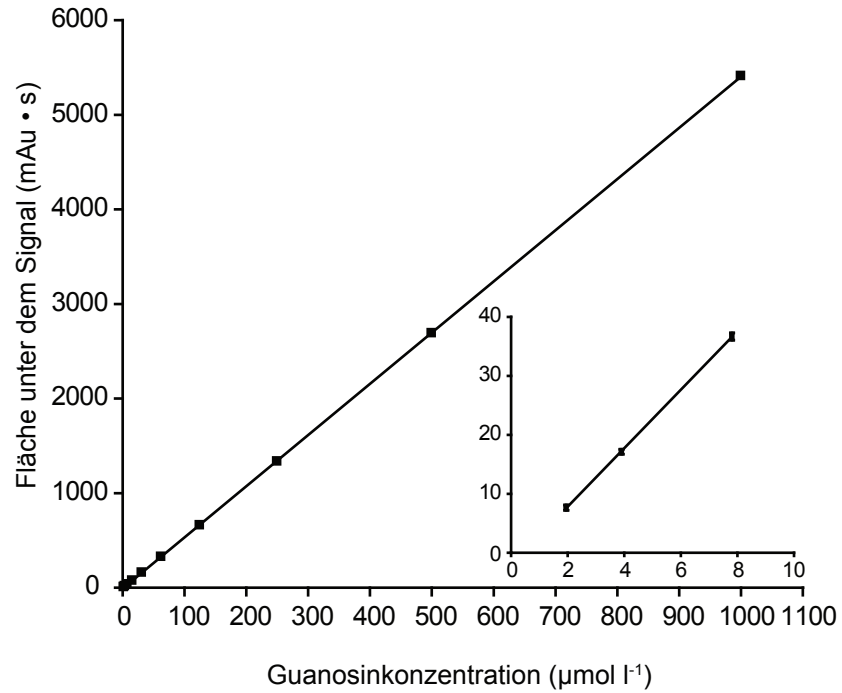


Abbildung A.7 – Bildunterschrift auf der folgenden Seite.

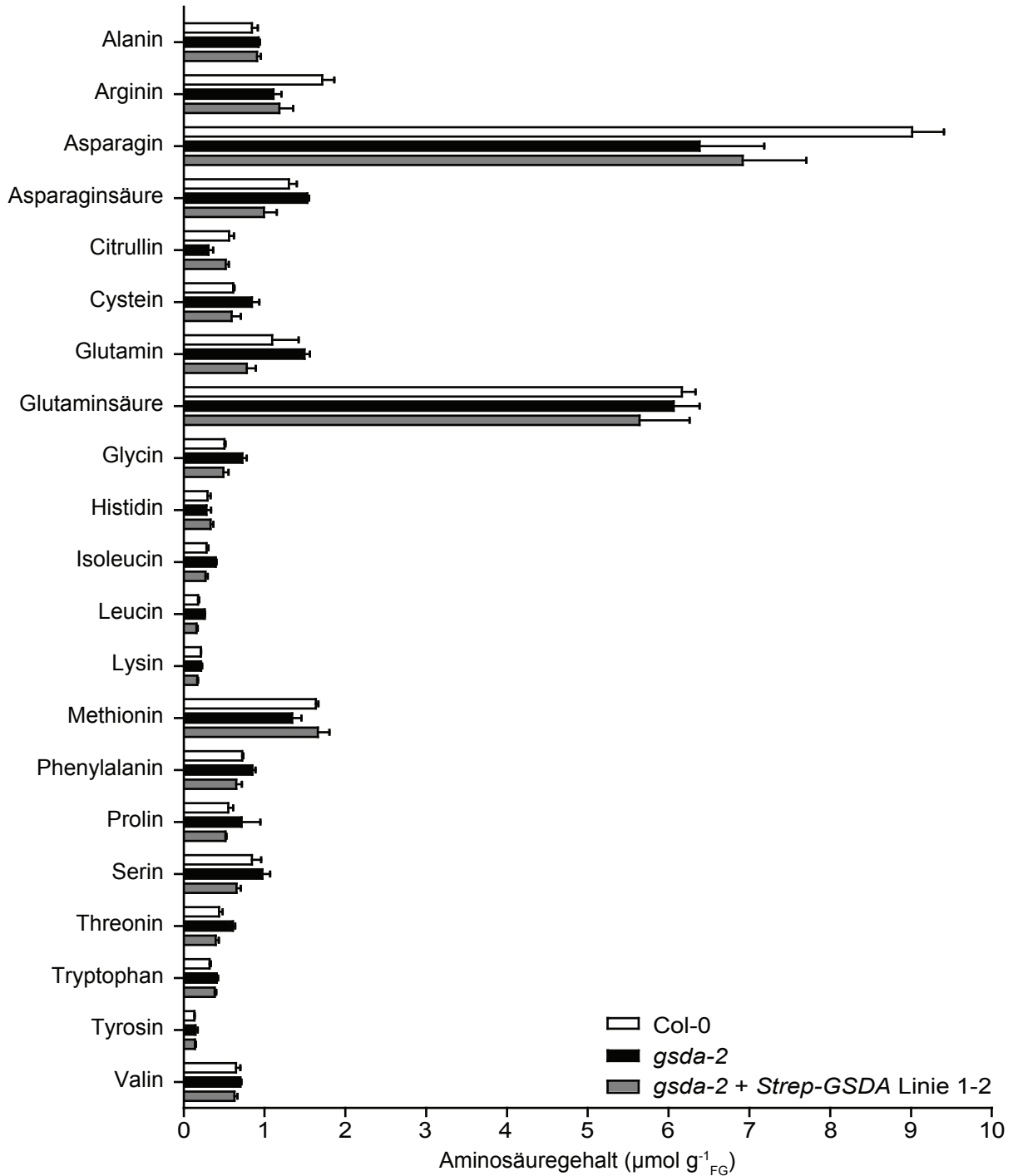
**Abbildung A.7** – Vorhergehende Seite: **Verifizierung von UV-Signalen aus den chromatographischen Läufen mithilfe von Massenspektrometrie.** Guanosin-, Xanthosin- und Uridinfraktionen aus Metabolit-extrakten trockener Samen wurden jeweils während einer chromatographischen Analyse gesammelt und in einem externen Elektrospray-Tandemmassenspektrometer überprüft. Für jeden Metaboliten sind die Übersichtsspektren (MS) sowie die Fragmentspektren (MS-MS) im negativen Modus abgebildet. Während die Übersichtsspektren die Signale der deprotonierten Molekülonen zeigen, sind in den Fragmentspektren die Signale der zugehörigen Fragmentationen dargestellt. Die Zuordnung der Signale zu den entsprechenden Ionen erfolgte nach Liu *et al.*, 2008 und Liu *et al.*, 2009. %: relative Intensität in Prozent; m/z: Masse-zu-Ladung-Verhältnis



**Abbildung A.8** – **Metabolitanalyse nach Extraktion mit 80% Methanol.** Trockene Samen der Linie *gsda-2* sowie reine Lösungen von Guanin, Guanosin und 2'-Deoxyguanosin wurden mit 80 % Methanol extrahiert, mit Ionenpaar-Umkehrphasenchromatographie aufgetrennt und die UV-Signale bei 260 nm detektiert.



**Abbildung A.9 – Analyse der Detektionsgrenze von Guanosin.** Eine Verdünnungsreihe einer reinen Guanosinlösung wurde hergestellt und anschließend dem Perchlorsäure-Extraktionsprotokoll unterzogen. Die Flächen unter den jeweiligen Signalen wurden über den zugehörigen Guanosinkonzentrationen aufgetragen. Der Einschub zeigt den Bereich der Detektionsgrenze.



**Abbildung A.10 – Aminosäureprofil in Samen.** Ethanolische Extrakte von Samen der Linien *gsda-2*, *gsda-2* + *Strep-GSDA* 1-2 und des Wildtyps wurden hergestellt, derivatisiert und mit Umkehrphasenchromatographie aufgetrennt. Die Detektion der Fluoreszenz der Aminosäurederivate sowie die gleichzeitige Nutzung von Standardlösungen aller Aminosäuren erlaubten eine anschließende Quantifizierung. Von jeder Linie wurden drei Samenliquots unabhängig voneinander prozessiert und für die Quantifizierung genutzt. Dargestellt sind jeweils die Mittelwerte dieser Quantifizierungen und ihre Standardabweichungen (n = 3). FG, Frischgewicht.

# **Anhang B**

# **Tabellen**

**Tabelle B.1 – Aminosäuregehalt in Wildtypblättern während des Dunkelzeitkurses.** Angegeben sind die Mittelwerte der Konzentrationen in  $\mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$  und ihre Standardabweichung von Tag 0 bis Tag 6.

	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
Alanin	0.40 ± 0.03	0.52 ± 0.02	0.77 ± 0.06	0.66 ± 0.00	0.78 ± 0.04	0.52 ± 0.02	0.46 ± 0.01
Arginin	0.49 ± 0.05	0.57 ± 0.08	0.92 ± 0.01	1.46 ± 0.05	2.01 ± 0.06	2.75 ± 0.18	3.11 ± 0.12
Asparagin	1.75 ± 0.20	2.17 ± 0.32	5.84 ± 0.21	9.97 ± 0.16	12.49 ± 0.26	14.31 ± 0.09	14.35 ± 1.23
Asparaginsäure	1.90 ± 0.28	1.38 ± 0.17	1.28 ± 0.05	1.10 ± 0.04	1.12 ± 0.01	0.74 ± 0.04	0.66 ± 0.02
Glutamin	1.87 ± 0.07	2.12 ± 0.19	1.33 ± 0.02	2.07 ± 0.50	2.73 ± 0.59	2.70 ± 0.11	3.55 ± 0.11
Glutaminsäure	5.00 ± 0.58	3.18 ± 0.74	3.03 ± 0.19	2.90 ± 0.00	3.35 ± 0.00	4.07 ± 0.02	4.06 ± 0.09
Glycin	0.07 ± 0.02	0.09 ± 0.03	0.11 ± 0.00	0.12 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.25 ± 0.03	0.23 ± 0.00
Histidin	0.10 ± 0.00	0.18 ± 0.04	0.29 ± 0.00	0.47 ± 0.02	0.59 ± 0.03	0.98 ± 0.03	1.10 ± 0.02
Isoleucin	0.15 ± 0.01	0.27 ± 0.04	0.57 ± 0.03	0.71 ± 0.01	0.82 ± 0.01	0.83 ± 0.04	0.70 ± 0.01
Leucin	0.16 ± 0.00	0.33 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.45 ± 0.01	0.52 ± 0.01	0.45 ± 0.04	0.32 ± 0.00
Lysin	0.23 ± 0.00	0.35 ± 0.02	0.49 ± 0.05	0.46 ± 0.04	0.49 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.46 ± 0.10
Methionin	0.44 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.33 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.38 ± 0.03	0.40 ± 0.04	0.43 ± 0.01
Phenylalanin	0.10 ± 0.01	0.27 ± 0.09	0.50 ± 0.01	0.91 ± 0.02	1.22 ± 0.03	2.22 ± 0.06	2.46 ± 0.02
Serin	0.98 ± 0.11	0.69 ± 0.13	1.13 ± 0.07	1.38 ± 0.01	1.83 ± 0.04	2.44 ± 0.07	2.35 ± 0.05
Threonin	0.58 ± 0.06	0.61 ± 0.05	0.58 ± 0.03	0.54 ± 0.02	0.66 ± 0.01	0.52 ± 0.02	0.49 ± 0.00
Tryptophan	0.05 ± 0.00	0.12 ± 0.04	0.20 ± 0.01	0.32 ± 0.03	0.42 ± 0.03	0.71 ± 0.03	0.82 ± 0.00
Tyrosin	0.03 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.22 ± 0.00	0.26 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.31 ± 0.01
Valin	0.27 ± 0.01	0.54 ± 0.08	0.88 ± 0.03	1.16 ± 0.03	1.41 ± 0.01	1.84 ± 0.07	1.77 ± 0.00

**Tabelle B.2 – Aminosäuregehalt in *gsda*-Blättern während des Dunkelzeitkurses.** Angegeben sind die Mittelwerte der Konzentrationen in  $\mu\text{mol g}_{\text{FG}}^{-1}$  und ihre Standardabweichung von Tag 0 bis Tag 6.

	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3	Tag 4	Tag 5	Tag 6
Alanin	0.40 ± 0.03	0.52 ± 0.02	0.77 ± 0.06	0.66 ± 0.00	0.78 ± 0.04	0.52 ± 0.02	0.46 ± 0.01
Arginin	0.49 ± 0.05	0.57 ± 0.08	0.92 ± 0.01	1.46 ± 0.05	2.01 ± 0.06	2.75 ± 0.18	3.11 ± 0.12
Asparagin	1.75 ± 0.20	2.17 ± 0.32	5.84 ± 0.21	9.97 ± 0.16	12.49 ± 0.26	14.31 ± 0.09	14.35 ± 1.23
Asparaginsäure	1.90 ± 0.28	1.38 ± 0.17	1.28 ± 0.05	1.10 ± 0.04	1.12 ± 0.01	0.74 ± 0.04	0.66 ± 0.02
Glutamin	1.87 ± 0.07	2.12 ± 0.19	1.33 ± 0.02	2.07 ± 0.50	2.73 ± 0.59	2.70 ± 0.11	3.55 ± 0.11
Glutaminsäure	5.00 ± 0.58	3.18 ± 0.74	3.03 ± 0.19	2.90 ± 0.00	3.35 ± 0.00	4.07 ± 0.02	4.06 ± 0.09
Glycin	0.07 ± 0.02	0.09 ± 0.03	0.11 ± 0.00	0.12 ± 0.01	0.16 ± 0.01	0.25 ± 0.03	0.23 ± 0.00
Histidin	0.10 ± 0.00	0.18 ± 0.04	0.29 ± 0.00	0.47 ± 0.02	0.59 ± 0.03	0.98 ± 0.03	1.10 ± 0.02
Isoleucin	0.15 ± 0.01	0.27 ± 0.04	0.57 ± 0.03	0.71 ± 0.01	0.82 ± 0.01	0.83 ± 0.04	0.70 ± 0.01
Leucin	0.16 ± 0.00	0.33 ± 0.02	0.42 ± 0.02	0.45 ± 0.01	0.52 ± 0.01	0.45 ± 0.04	0.32 ± 0.00
Lysin	0.23 ± 0.00	0.35 ± 0.02	0.49 ± 0.05	0.46 ± 0.04	0.49 ± 0.02	0.44 ± 0.02	0.46 ± 0.10
Methionin	0.44 ± 0.03	0.31 ± 0.03	0.33 ± 0.02	0.37 ± 0.02	0.38 ± 0.03	0.40 ± 0.04	0.43 ± 0.01
Phenylalanin	0.10 ± 0.01	0.27 ± 0.09	0.50 ± 0.01	0.91 ± 0.02	1.22 ± 0.03	2.22 ± 0.06	2.46 ± 0.02
Serin	0.98 ± 0.11	0.69 ± 0.13	1.13 ± 0.07	1.38 ± 0.01	1.83 ± 0.04	2.44 ± 0.07	2.35 ± 0.05
Threonin	0.58 ± 0.06	0.61 ± 0.05	0.58 ± 0.03	0.54 ± 0.02	0.66 ± 0.01	0.52 ± 0.02	0.49 ± 0.00
Tryptophan	0.05 ± 0.00	0.12 ± 0.04	0.20 ± 0.01	0.32 ± 0.03	0.42 ± 0.03	0.71 ± 0.03	0.82 ± 0.00
Tyrosin	0.03 ± 0.01	0.09 ± 0.01	0.22 ± 0.00	0.26 ± 0.01	0.31 ± 0.02	0.28 ± 0.03	0.31 ± 0.01
Valin	0.27 ± 0.01	0.54 ± 0.08	0.88 ± 0.03	1.16 ± 0.03	1.41 ± 0.01	1.84 ± 0.07	1.77 ± 0.00