

Evolution der Homospermidin-Synthese in den Convolvulaceae und Apocynaceae

D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung des Doktorgrades
(Dr. rer. nat.)
an der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
von Elisabeth Kaltenegger

Kiel, 2009

1. Referent: Prof. Dr. Dietrich Ober
2. Referent: Prof. Dr. Günther B. Hartl
eingereicht am: 15.09.2009
mündliche Prüfung (Disputation) am: 30.10.2009
2009

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit „Evolution der Homospermidin-Synthese in den Convolvulaceae und Apocynaceae“, abgesehen von der Beratung durch den Betreuer, selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Die Arbeit entstand unter Einhaltung der Regeln guter wissenschaftlicher Praxis der Deutschen Forschungsgemeinschaft. Die Dissertation wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der mathematisch-naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch den Mentor der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Kaltenegger, E. und Ober, D. (2006). Pyrrolizidine alkaloid evolution - convergence or homology? 17th International Symposium **Biodiversity and Evolutionary Biology** of the German Botanical Society, September 24-28, Bonn, Germany.

Kaltenegger, E. und Ober, D. (2007). Gene duplication and its role in secondary metabolite evolution. Phytochemical Society of Europe, **50TH Anniversary Conference**, 11-14 April 2007, Churchill College, Cambridge, UK.

Kaltenegger, E. und Ober, D. (2008). Pyrrolizidine Alkaloid Evolution in the Convolvulaceae. PSE Young Scientists' Meeting. Future Trends in Phytochemistry. Compounds - Enzymes - Genes., Bad Herrenalb, Germany.

Publikationen

Ober, D. und Kaltenegger, E. (2009). "Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolution of a pathway in plant secondary metabolism." Phytochemistry.
[doi:10.1016/j.phytochem.2009.05.017](https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.05.017)

Kiel, den 19.2.2010

Elisabeth Kaltenegger

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich ganz herzlich bei allen bedanken, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben. Mein besonderer Dank gebührt:

Herrn Prof. Dietrich Ober für die anregenden Diskussionen, die vielen Ideen und vor allem für die ansteckende Begeisterung für das spannende Thema.

Der österreichischen Akademie der Wissenschaften für die Vergabe eines DOC-fFORTE Stipendiums.

Frau Brigitte Schemmerling für Ihre Hilfe bei den praktischen Dingen im Labor und vor allem für die tolle Teamarbeit, die mir eine freie Zeiteinteilung erlaubte!

Frau Margret Doose, meiner lieben Bürokollegin, für unser schönes Büroklima, das weit über das Berufliche hinaus zu einer schönen Freundschaft führte. Wobei natürlich nicht „unser“ Bürohund Fritz zu vergessen ist, der bei jedem Wind und Wetter Anlass zu einer kleinen Runde in der frischen Luft gab, und die wilden Vierbeiner in Groß Buchwald: Buschi, Orietta, Pasco, Ladybird, Luise und ihre Fohlen – sie haben leider viel zu selten zu der manchmal nötigen Entspannung an den Wochenende beigetragen. Vielen Dank dafür Margret!

Frau Daniela Gonde gilt mein herzlicher Dank dafür, dass sie mir in meinen ersten Wochen und Monaten die molekularbiologischen Methoden mit all den wichtigen Tips und Tricks beibrachte und immer mit Rat und Tat beiseite stand.

Frau Dorothee Langel, mit der ich zwar nie näher zusammenarbeitete, aber die mir immer eine geduldige ZuhörerIn und Ratgeberin bei Abteilungsbelangen war.

Insgesamt möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemische Ökologie und molekulare Evolution für die gute Zusammenarbeit und das nette und entspannte Arbeitsklima danken.

Dass diese Doktorarbeit entstand, verdanke ich allerdings auch zu einem großen Anteil meiner Mutter und Maria in Aspang und meinem lieben Freundeskreis und WGs hier in Kiel und auch in Braunschweig. Den herzlichsten Dank möchte diesen Menschen übermitteln: Lena, Inki, Liz, Marthe, Thurid, Tanja, Hedi, Vinca, Kristina.

Nicht zu vergessen ist der wunderbare Ausgleich, den mir das Klavierspielen bei Frau Rzesut und das Klettern mit den tollen Kieler Kletterern und Kletterinnen brachte, allen voran Thorsten, Olav, Frank, Daniel, Kristina, Johanna. Ohne diese Abwechslung wäre die Arbeit vielleicht schneller entstanden, aber bestimmt nicht mit soviel Freude. Am Ende möchte ich mich noch an meinen liebsten Kletterpartner und guten Freund erinnern, Jens Horstkotte, der leider viel zu früh von uns ging. In so manch langer Stunde vor dem Schreibtisch wanderten die Gedanken zu ihm und das Schreiben fiel schwer.....

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung.....	1
1.1. Pyrrolizidin-Alkaloide.....	3
1.2. Biosynthese der Pyrrolizidin-Alkaloide.....	5
1.3. Evolution der Homospermidin-Synthase (HSS).....	6
1.4. Thema dieser Arbeit.....	9
1.4.1. Pyrrolizidin-Alkaloide in den Convolvulaceae.....	9
1.4.2. Pyrrolizidin-Alkaloide in den Apocynaceae.....	13
2. Material und Methoden.....	14
2.1. Pflanzenmaterial.....	14
2.2. Molekularbiologische Techniken.....	15
2.2.1. Stammlösungen - Laborverbrauchsmaterialien - Enzyme.....	15
2.2.2. Bakterienkultur.....	15
2.2.2.1. Medien.....	15
2.2.2.2. Verwendete <i>E. coli</i> -Zelllinien.....	16
2.2.2.3. Herstellen kompetenter Zellen.....	16
2.2.2.4. Herstellen von Dauerkulturen.....	17
2.2.3. RNA-Isolierung	17
2.2.4. Quantifizierung der Nukleinsäuren.....	18
2.2.5. Agarose-Gelelektrophorese	18
2.2.6. cDNA-Synthese.....	19
2.2.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	20
2.2.8. Polymerase-Kettenreaktion mit degenerierten Primern (DOP-PCR).....	21
2.2.9. Klonierung und Transformation.....	22
2.2.10. Isolierung von Plasmid-DNA und Identifizierung der gewünschten Klone.....	23
2.2.11. Amplifizierung der 3'- und 5'-Enden von cDNAs.....	24
2.2.12. Amplifizierung des offenen Leserahmens für die heterologe Expression in <i>E. coli</i>	27
2.2.13. Heterologe Expression der rekombinanten Proteine in <i>E. coli</i>	29
2.2.14. Isolierung genomischer DNA.....	30
2.2.15. Amplifikation genomischer DNA.....	30
2.2.16. Inverse PCR	31

2.2.17. DOP-PCR mit genomischer DNA aus PA-freien Convolvulaceae Arten.....	32
2.2.18. Semiquantitative reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	33
2.2.19. DNA-Sequenzierung.....	34
2.2.20. Oligonukleotide.....	34
2.2.21. DNA-Sequenzanalysen und phylogenetische Analysen.....	34
2.3. Proteinchemische Methoden.....	38
2.3.1. Reinigung rekombinanter Proteine über Affinitätschromatographie.....	38
2.3.2. Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page).....	40
2.3.3. Proteinfärbungen.....	41
2.3.3.1. Coomassie Färbung.....	41
2.3.3.2. Indian-Ink Färbung.....	42
2.3.4. Quantifizierung von Proteinen.....	43
2.3.5. Biochemische Charakterisierung der rekombinanten Proteine.....	44
2.4. Immunologische und mikroskopische Techniken.....	47
2.4.1. Immunisierung.....	47
2.4.2. Affinitätsreinigung der polyklonalen Antikörper.....	48
2.4.3. Isolierung von Proteinen aus pflanzlichen Geweben und Western-Blot.....	51
2.4.4. <i>in situ</i> – Immunolokalisation.....	54
2.4.4.1. Gewebefixierung und Einbettung.....	54
2.4.4.2. Immundetektion.....	55
3. Ergebnisse.....	57
3.1. Identifizierung HSS- und DHS-kodierender cDNAs mit Hilfe der DOP-PCR.....	57
3.2. Amplifizierung der 3'- und 5'-Enden der HSS- und DHS-kodierenden cDNAs.....	60
3.2.1. <i>Ipomoea neei</i>	61
3.2.2. <i>Merremia quinquefolia</i>	63
3.2.3. <i>Parsonsia laevigata</i>	63
3.3. Amplifizierung des gesamten kodierenden Bereichs der putativen HSS- und DHS-kodierenden cDNAs und deren heterologe Expression in <i>E. coli</i>	65
3.4. Reinigung der heterolog exprimierten Proteine über Affinitätschromatographie	69

3.5. Biochemische Charakterisierung der gereinigten rekombinanten Proteine.....	70
3.6. Amplifizierung homologer Sequenzen in weiteren <i>Ipomoea</i> Arten	72
3.7. Expressionsanalysen der HSS und DHS.....	75
3.7.1. Semiquantitative RT-PCR.....	75
3.7.2. Expressionsanalysen der HSS und DHS mit Hilfe immunologischer Methoden.....	81
3.7.2.1. Produktion, Reinigung und Spezifitätsanalyse der gereinigten polyklonalen Antikörper.....	82
3.7.2.2. Pflanzenorganspezifische Expression der HSS.....	84
3.7.2.3. Zell- und gewebespezifische Expression der HSS.....	87
3.7.3. Genomische Struktur der <i>hss</i> - und <i>dhs</i> -Gene.....	89
3.8. Evolution der HSS-kodierenden Sequenzen innerhalb der Angiospermen.....	92
3.9. <i>dhs</i> - und <i>hss</i> - Gene in nicht PA-produzierenden Convolvulaceen Arten.....	97
3.10. Charakterisierung der putativen HSS und DHS aus <i>Ipomoea alba</i>	104
3.10.1. RT-PCR	104
3.10.2. Heterologe Expression.....	105
3.10.3. Biochemische Charakterisierung.....	105
3.11. Genduplikation und evolutives Schicksal der Tochtergene in den Convolvulaceae.....	106
3.12. Positive Selektion.....	114
4. Diskussion.....	119
4.1. Genduplikation als molekularer Mechanismus der Evolution	121
4.2. Evolutives Schicksal der Tochtergene nach der Duplikation in den Convolvulaceae.....	124
4.3. Fixierung duplizierter Gene im Genom und Einfluss positiver Selektion.....	125
4.4. Differenzierung der Expression als Mechanismus zur Fixierung duplizierter Gene im Genom.....	132
4.5. Evolution weiterer Schlüsselenzyme des PA-Biosyntheseweges.....	134
5. Zusammenfassung.....	138
6. Summary.....	140
7. Literatur.....	141
8. Anhang.....	148

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	1-Hydroxymethylpyrrolizidin, die Necinbase als Grundbaustein der PAs	3
Abb. 1.2	Postulierte Biosynthese der Necinbase aus den Diaminen Putrescin und Spermidin nach Hartmann (1995; 2000)	6
Abb. 1.3	Vergleich der Reaktionsmechanismen von Homospermidin-Synthase (HSS, EC 2.5.1.45) und Desoxyhypusin-Synthase (DHS, EC 2.5.1.46)	8
Abb. 1.4	Pyrrolizidin-Alkaloide in den Convolvulaceae	11
Abb. 2.1.	Prinzip der „Rapid Amplification of cDNA Ends“ Technik	32
Abb. 2.3	Blotaufbau des Semi-Dry-Blots	53
Abb. 3.1	Agarose Gelelektrophorese einer Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA aus transformierten <i>E. coli</i> TOP10 Zellen	59
Abb. 3.2	Heterologe Expression von <i>ipomnei_2</i> und <i>parslaev_2</i> in <i>E. coli</i> BL21-Kulturen	69
Abb. 3.3	Reinigung der rekombinanten DHS (A) und HSS (B) aus <i>M. quinquefolia</i>	70
Abb. 3.4	Schematische Darstellung der DHS- und HSS-Aktivität	71
Abb. 3.5	Semiquantitative RT-PCR von <i>I. neei</i> (A) und <i>P. laevigata</i> (B)	77
Abb. 3.6	Semiquantitative RT-PCR von <i>I. neei</i>	79
Abb. 3.7	Semiquantitative RT-PCR von <i>I. hederifolia</i>	81
Abb. 3.8	Spezifitätsanalyse der affinitätsgereinigten HSS-Antikörper gegen HSS und DHS aus <i>I. neei</i> (A) und <i>P. laevigata</i> (B)	84
Abb. 3.9	Western-Blot verschiedener Pflanzenorgane aus <i>I. neei</i>	85
Abb. 3.10	<i>in situ</i> -Immunolokalisation junger Wurzeln von <i>I. neei</i> im Bereich der Wurzelhaarzone	88
Abb. 3.11	Ungewurzelter Maximum Parsimony-Baum, basierend auf 28 HSS- und DHS-kodierenden cDNA-Sequenzen aus verschiedenen Angiospermen	94
Abb. 3.12	Ungewurzelter Maximum Likelihood-Baum, basierend auf 28 HSS- und DHS- kodierenden cDNA-Sequenzen aus verschiedenen Angiospermen	95
Abb. 3.13	Indolizidin-Alkaloide aus <i>Ipomoea alba</i>	98

Abb. 3.14	Schematische Darstellung des dhs- und hss-Gens aus <i>I. neei</i>	98
Abb. 3.15	Genomische Organisation der Sequenzen <i>carv-1</i> (2894 bp), <i>carv-2</i> (1639 bp) und <i>carv-3</i> (6688 bp) aus <i>C. arvensis</i>	101
Abb. 3.16	Ungewurzelter Maximum Parsimony-Baum, basierend auf 16 HSS- und DHS-kodierenden cDNA-Sequenzen aus der Familie der Convolvulaceae sowie den DHS-Sequenzen aus <i>N. tabacum</i> und <i>L. esculentum</i> als Außengruppe	109
Abb. 3.17	Ungewurzelter Maximum Likelihood-Baum, basierend auf 16 HSS- und DHS- kodierenden cDNA-Sequenzen aus der Familie der Convolvulaceae sowie den DHS-Sequenzen aus <i>N. tabacum</i> und <i>L. esculentum</i> als Außengruppe	110
Abb. 3.18	ML-Phylogramme der 16 HSS- und DHS-kodierenden cDNA- Sequenzen aus der Familie der Convolvulaceae sowie den DHS- Sequenzen aus <i>N. tabacum</i> und <i>L. esculentum</i> als Außengruppe	111
Abb. 3.19	ML-Stammbaum der HSS- und DHS-Sequenzen aus Convolvulaceae, der den Berechnungen zur positiven Selektion als Grundlage diente	116
Abb. 4.1	Aminosäure-Alignment (Einbuchstabencode) der DHS- und HSS-kodierenden Sequenzen aus den Convolvulaceae sowie der DHS-kodierenden Sequenzen aus <i>Solanum lycopersicum</i> , <i>Nicotiana tabacum</i> und <i>Homo sapiens</i> und die putative HSS-kodierende Sequenz aus <i>I. alba</i>	130
Abb. 4.2	Stereochemie der Necinbasen	136

Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Artenliste der verwendeten Pflanzen mit Angabe der Herkunft des Saatgutes.....	14
Tab. 2.2	Branch-site Modell A nach Zhang et al. (2005).....	37
Tab. 2.3	Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel bei der SDS-PAGE.....	41
Tab. 3.1	DOP-PCR	60
Tab. 3.2	3'-RACE	64
Tab. 3.3	5'-RACE	64
Tab. 3.4	Ergebnisse der RACE-Technik und Charakteristika der vervollständigten cDNA-Sequenzen.....	65
Tab. 3.5	Klonierungsstrategie des ORF der HSS- und DHS-kodierenden cDNAs	68
Tab. 3.6	Spezifische Aktivität der gereinigten, rekombinanten Proteine, deren cDNA-Sequenzen aus <i>I. neei</i> , <i>M. quinquefolia</i> , <i>P. laevigata</i> identifiziert wurden	72
Tab. 3.7	Klonierungsstrategie der ORFs vermutlicher HSS- und DHS-kodierender cDNAs aus <i>I. meyeri</i> und <i>I. hederifolia</i>	74
Tab. 3.8	Spezifische Aktivität der gereinigten, rekombinanten Proteine, deren cDNA-Sequenzen aus <i>I. meyeri</i> und <i>I. hederifolia</i> identifiziert wurden	75
Tab. 3.9	PCR-Amplifizierung der <i>hss</i> - und <i>dhs</i> -Gene aus <i>P. laevigata</i> und <i>I. neei</i> und des <i>hss</i> -Gens aus <i>I. hederifolia</i>	91
Tab. 3.10	HSS- und DHS-kodierende cDNA-Sequenzen, die für phylogenetische herangezogen wurden	93
Tab. 3.11	Statistische Unterstützung für die Zweige a – u in den ML- und MP-Stammbäumen	96
Tab. 3.12	PCR-Amplifizierung der <i>hss</i> und <i>dhs</i> Gene aus <i>I. alba</i> , <i>I. purpurea</i> , <i>C. arvensis</i> und <i>C. tricolor</i>	100
Tab. 3.13	Genomische Organisation der <i>hss</i> - und <i>dhs</i> -Gene	103
Tab. 3.14	Amplifizierung des ORF vermutlicher HSS- und DHS-kodierender cDNAs aus <i>I. alba</i>	104

Tab. 3.15	Spezifische Aktivität der gereinigten, rekombinanten Proteine, kodiert durch die identifizierten cDNA-Sequenzen ipomalba_1 und ipomalba_2 aus <i>I. alba</i>	106
Tab. 3.16	HSS- und DHS-kodierende cDNA Sequenzen sowie homologe Sequenzen aus den Convolvulaceae, die für phylogenetische Analysen herangezogen wurden	107
Tab. 3.17	Statistische Unterstützung der Zweige a – m zu den Abbildungen Abb. 3.16, Abb. 3.17 und Abb. 3.18	112
Tab. 3.18	Parameter und Ergebnisse der Berechnungen zur positiven Selektion	116
Tab. 3.19	LRT-Statistik ($2 \Delta \ln L$) und kritische Werte (P-Werte) für die Berechnung der positiven Selektion	118
Tab. 6.1	Medium und Lösungen für die Pflanzensterilkultur	146
Tab. 6.2	Sequenzen, Schmelztemperatur und Grad der Degeneriertheit der verwendeten Primer	147

Abkürzungsverzeichnis

Annealing-Temp.	Annealing-Temperatur
APS	Ammoniumpersulfat
BEB-Analyse	„Bayes Empirical Bayes“ Analyse
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
CPM	Counts pro Minute
<i>C. arvensis</i>	<i>Convolvulus arvensis</i>
<i>C. tricolor</i>	<i>Convolvulus tricolor</i>
dATP	desoxy-Adenosintriphosphat
dCTP	desoxy-Cytosintriphosphat
df	degree of freedom
DHS	Desoxyhypusin-Synthase
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	desoxy-Nukleosidtriphosphat
DOC	Desoxycholat
DOP-PCR	degenerated oligonucleotid primed PCR
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiaminotetraacetat
eIF5A	eukaryotic initiation factor 5A
EtOH	Ethanol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
GCG	Wisconsin Package of Genetics Computer Group
H ₂ SO ₄	Schwefelsäure
His	Histidin
HSS	Homospermidin-Synthase
<i>H. sapien</i>	<i>Homo sapiens</i>
IgG	Immunglobulin G
IgM	Immunglobulin M
IMAC	Immobilisierte Metall-Ionen Affinitätschromatographie
IPTG	Isopropyl-b-D-thiogalactopyranosid
<i>I. alba</i>	<i>Ipomoea alba</i>
<i>I. hederifolia</i>	<i>Ipomoea hederifolia</i>
<i>I. meyeri</i>	<i>Ipomoea meyeri</i>
<i>I. neei</i>	<i>Ipomoea neei</i>
<i>I. purpurea</i>	<i>Ipomoea purpurea</i>
kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
LB	"lysogeny broth"

MeOH	Methanol
Min	Minuten
mRNA	messenger RNA
MSOH	Murashige und Skoog Medium (MSOH), ohne Hormone
<i>M. quinquefolia</i>	<i>Merremia quinquefolia</i>
Na-Ascorbat	Natrium-Ascorbat
NAD ⁺	Nicotinamidadenindinukleotid (oxidierte Form)
Ni-NTA	Nickel-Nitrilo-Tri-Essigsäure
NaOH	Natriumhydroxid
<i>N. tabacum</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
ORF	open reading frame
PA	Pyrrolizidin-Alkaloid
PAGE	Polyacrylmaid-Gelelektrophorese
PBS	"Phosphate Buffered Saline"
PCR	Polymerase Kettenreaktion
<i>Phalaenopsis</i> sp.	<i>Phalaenopsis</i> species
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Radio-TLC	"Radio-Thin Layer Chromatography"
Rf	Retentionsfaktor
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonukease
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkription – Polymerase-Kettenreaktion
SDS	Natriumdodecylsulfat
ssDNA	"single stranded" DNA
<i>S. lycopersicum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
TBE Puffer	Tris-Borate-EDTA Puffer
TBS Puffer	"Tris Buffered Saline"
TBS-T	"Tris Buffered Saline" mit Tween20
TCA	Trichloressigsäure
TdT	Terminal deoxynucleotidyl Transferase
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris-Base	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCl	10 mM Tris-Puffer, pH 8 durch Zugabe von HCl
tRNA	transfer RNA
UpM	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslated region
VT	Volumsanteil

1. Einleitung

Pflanzen produzieren eine bunte Vielfalt an niedermolekularen Verbindungen als Produkte eines Sekundärstoffwechsels, die so genannten Sekundärstoffe. Klassischerweise wird dieser Sekundärstoffwechsel dem Primärstoffwechsel gegenübergestellt, der essentielle Stoffwechselwege wie z. B. die Atmung und Photosynthese beinhaltet. Der Primärstoffwechsel der Pflanzen wird als universell, uniform und konservativ charakterisiert. Dagegen gilt der Sekundärstoffwechsel als singulär, vielfältig und adaptiv (Richter 1996; Hartmann 2007). Lange Zeit wurden Sekundärstoffe als ein „Spiel der Natur“, als „Abfallprodukte eines überschäumenden Stoffwechsels“ oder auch als Entgiftungsprodukte angesehen (Mothes 1955; Wink 2003; Hartmann 2007). Dieses Bild hat sich stark gewandelt und heute ist die essentielle Bedeutung der Sekundärstoffe für das Überleben der Pflanze in ihrer Umwelt weitgehend akzeptiert (Wink 2003; Hartmann 2007). Sekundäre Inhaltsstoffe tragen vielfältige ökologische Funktionen. Die Farbstoffe, die den Blüten die prachtvollen Farben verleihen, sind ebenso Sekundärstoffe wie zum Beispiel Aconitin, ein Alkaloid aus dem Blauen Eisenhut, *Aconitum napellus* L. (Ranunculaceae). Während die Farbstoffe zur Anlockung der Bestäuber dienen, macht die Akkumulation von Aconitin den Eisenhut zu einer der giftigsten Pflanzen der nördlichen Hemisphäre. Im Fall des Eisenhutes übernimmt der sekundäre Inhaltsstoff eine Schutzfunktion gegenüber Herbivoren. Man spricht auch von chemischer Verteidigung. Weitere ökologische Funktionen sind z. B. der Schutz vor pathogenen Organismen und UV-Strahlung, die Anlockung von Bestäubern durch Duftstoffe und auch die Allelopathie – der Kampf zwischen den Pflanzen (Harborne 1993; Pichersky und Gang 2000; Wink 2003; Jenett-Siems et al. 2005). Der Schutz vor Fraßfeinden stellt nach Harborne (1993) allerdings einen Hauptaspekt der ökologischen Rolle der Sekundärstoffe dar. Für den Menschen liegt der Reiz dieser Stoffe zum einen in der Nutzbarmachung als Insektizide, zum anderen gelten Pflanzen seit langem in der Volksmedizin als wichtige Arzneimittel zur Behandlung verschiedenster Krankheiten. In der modernen medizinischen Forschung liefern Pflanzeninhaltsstoffe wichtige Grundgerüste, die mögliche neue Leitsubstanzen gegen Krebs, Infektionskrankheiten sowie weitere Krankheiten darstellen. So birgt die Vielfalt des Sekundärstoffwechsels einen Pool an neuen chemischen Strukturen für die Entwicklung diverser Anwendungen. Das darauf begründete große Interesse der Naturstoffche-

miker führte in den letzten Jahrzehnten zur Identifizierung von geschätzten 200.000 Strukturen des sekundären Metabolismus aus höheren Pflanzen (Ober 2005; Hartmann 2007).

Von zentralem Interesse ist die Frage nach der Evolution der großen Vielfalt von Sekundärstoffen. Warum entwickelten sich die unterschiedlichen chemischen Strukturen? Hier liefern die ökologischen Funktionen der sekundären Inhaltsstoffe die Antwort. Die Strukturvielfalt resultiert aus einer andauernden Co-Evolution der Pflanzen und deren biotischen Umwelt. Als sessile Organismen können Pflanzen nicht vor Angriffen von Fraßfeinden flüchten. Dieses Fehlen an Mobilität mussten Pflanzen durch andere Strategien kompensieren, unter anderem auch durch chemische Interaktionen. Besonders hinsichtlich der mannigfaltigen Verteidigungsstoffe ist von Harborne (1993) die Phrase "co-evolutionary arms race" eingeführt worden, die anschaulich die anhaltende Evolution einer neuen Verteidigungsbarriere der Pflanze und die Adaption der Herbivoren widerspiegelt (Harborne 1993). Infolge der Fortschritte in der Molekularbiologie widmet man sich heute vermehrt der Frage nach dem „Wie?": Wie entwickelte die Pflanze diese Vielfalt? An der Biosynthese der verschiedenen chemischen Strukturen ist eine Vielzahl an spezialisierten Enzymen beteiligt. Bei der Expression dieser Enzyme wiederum sind entsprechende regulatorische Elemente involviert (Ober 2005). Diese molekularen Grundlagen des Sekundärstoffwechsels aufzuklären, stellt einen interessanten Aspekt der gegenwärtigen Forschung dar. Viele wichtige Stoffwechselwege zur Bildung von Sekundärstoffen sind bis heute auf enzymatischer Ebene charakterisiert worden (Hartmann 2007), wie z. B. die Biosynthese der Phenylpropanoide, sowie der verwandten Flavonoide (Hahlbrock 1981) und Lignine (Grisebach 1981). Die Gene einiger Schlüsselenzyme wurden aufgeklärt, wie z.B. Terpen-Synthasen der Terpenbiosynthese (Cseke et al. 1998) oder die Chalcon-Synthasen der Flavonoidbiosynthese (Durbin et al. 2003). Auch auf dem Gebiet der Alkaloidbiosynthese wurden bereits mehrere Gene charakterisiert (De Luca und Laflamme 2001), wie z.B. einige an der Biosynthese von Tropanalkaloiden beteiligte Gene (Facchini und St-Pierre 2005). Diese Fortschritte eröffnen neue Perspektiven. Sie liefern die Basis für Untersuchungen der molekularen Mechanismen, die zur Evolution dieser Enzyme führten (Pichersky und Gang 2000). Für tiefere Einblicke ist die weitere Identifizierung von Schlüsselgenen des Sekundärmetabolismus ein wichtiger Schritt. Bei bisherigen Untersuchungen erwiesen sich die Pyrrolizidin-Alkaloide (PAs) als ein spannendes und geeignetes Modellsystem.

1.1. Pyrrolizidin-Alkaloide

Die chemische Struktur der PAs ist durch 1-Hydroxymethylpyrrolizidin, die Necinbase, als Grundbaustein charakterisiert. Diese ist mit einer oder mehreren Necinsäuren – kurzkettingen, aliphatischen aber auch aromatischen Säuren – an C7, C9 oder beiden Positionen verestert (s. Abb. 1.1). Dadurch entstehen offenkettige Mono- und Diester sowie makrocyclische Di- und Triester. Chemische Modifikationen sowohl an der Necinbase als auch an den Necinsäuren führen zu einer großen Vielfalt an Strukturen. Bis heute wurden mehr als 350 verschiedene Derivate beschrieben (Hartmann und Ober 2000; Reimann et al. 2004). In der Pflanze liegt die überwiegende Mehrheit der PAs in Form von N-Oxiden vor. Diese polaren, salzähnlichen Oxide eignen sich besser für den selektiven Transport sowie die sichere Lagerung in der Vakuole als die freie, tertiäre Base. In der unprotonierten Form ist die freie Base aufgrund ihrer Lipophilität in der Lage, Zellmembranen zu durchdringen (Hartmann und Witte 1995).

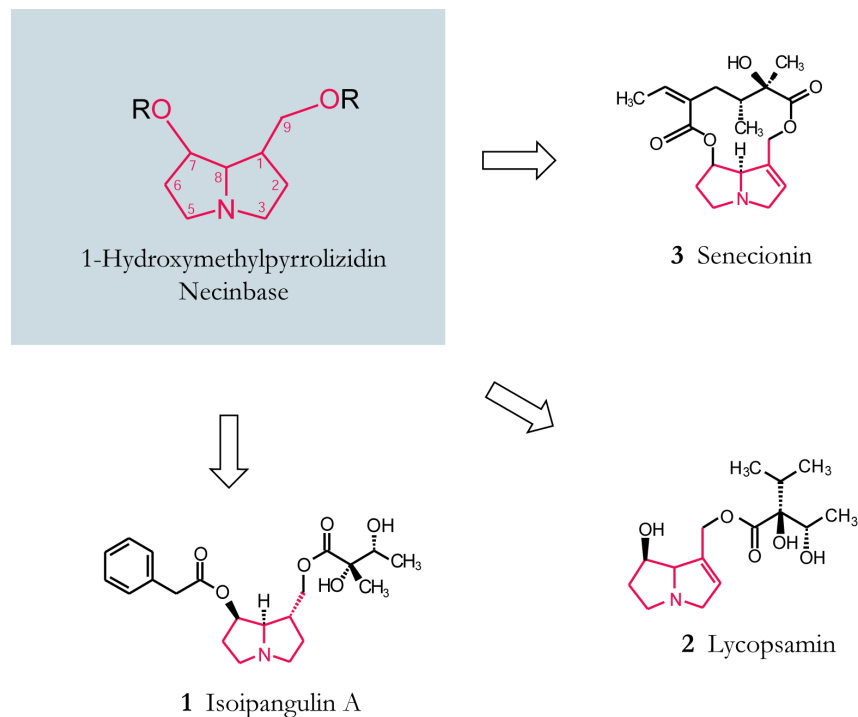


Abb. 1.1 1-Hydroxymethylpyrrolizidin, die Necinbase als Grundbaustein der PAs. Beispielhaft für die Vielfalt der PAs sind Isoipangulin A (1), Lycopsamin (2) und Senecionin (3) dargestellt: Mono- und Diester der Necinbase mit aromatischen (1) sowie aliphatischen (2) Necinsäuren sowie ein Makrozyklischer Diester (3). Die Necinbase ist in Rot hervorgehoben.

Als typische Sekundärstoffe dienen PAs vermutlich zur Verteidigung gegen Herbivoren, Insekten sowie Säugetieren (Hartmann und Witte 1995). Die Mehrheit der PAs – genauer der 1,2-Dehydropyrrolizidine – verursachen bei oraler Aufnahme ernsthafte Erkrankungen bei Nutztieren und Menschen. Sie besitzen eine hepatotoxische Wirkung. Dabei sind die 1,2-ungesättigten PAs nicht direkt toxisch für Säugetiere, allerdings entstehen vermutlich durch die Aktivität von Cytochrom P-450 Monooxygenasen toxische Pyrrol-Derivate nach der Ingestion. Diese instabilen PA-Pyrrole sind hoch aktive und alkylierende Strukturen. Ihre Toxizität beruht vermutlich auf der kovalenten Bindung an essentiellen biologischen Nukleophilen, wie z.B. Proteinen oder Nukleinsäuren, wodurch Zellfunktionen bis hin zur Bildung von Krebszellen verändert werden können (Fu et al. 2004). Die für Säugetiere hepatotoxischen PAs zeigen in Nicht-Säuger-Systemen wie etwa *Drosophila melanogaster* (Drosophilidae) eine starke mutagene Wirkung (Frei et al. 1992). Auch dieser cytotoxischen Aktivität liegt vermutlich die Transformation der 1,2-ungesättigten Form zu den aktiven Pyrrol-Derivaten zugrunde (Hartmann und Witte 1995). Für die Rolle zum Pflanzenschutz mag diese Giftwirkung eher von indirekter Bedeutung sein, da diese erst nach einer längeren Zeitperiode eintritt (bis zu 18 Monaten). In erster Linie scheinen die PAs jedoch fraßabschreckend zu wirken – auf Vertebraten, Säuger, sowie auf Insekten. Hier zeigten in Fraßversuchen mit Raupen des Fichtentriebwicklers, *Choristoneura fumiferana* (Tortricidae), PA-Derivate mit einer 1,2-ungesättigten Necinbase die höchste Aktivität (Hartmann und Witte 1995). Es gibt jedoch keine direkten experimentellen Hinweise auf den Effekt der PAs für den Schutz der Pflanze gegenüber Herbivoren. Einen Beleg für die ökologische Bedeutung der PAs liefern allerdings an PAs angepasste Insekten. Eine Reihe von Vertretern aus so unterschiedlichen Ordnungen wie den Lepidoptera, Coleoptera, Orthoptera und Homoptera nutzen PAs aus Pflanzen für ihre eigenen Abwehrmechanismen. Oft zeigen diese Insekten eine typische, aposematische Warnfarbe (Hartmann und Witte 1995). PAs stellen damit auch ein eindrucksvolles Beispiel für den zuvor erwähnten Begriff des „co-evolutionary arms race“ dar – den ständigen Kampf der Pflanze gegen ihre Fraßfeinde und deren Adaptionen.

Das Vorkommen der PAs ist auf wenige, phylogenetisch von einander entfernt stehenden Familien innerhalb der Angiospermen beschränkt. Ungefähr 95 % der mehr als 400 bekannten Strukturen kommen in den folgenden vier Familien vor: den Asteraceae (Tribus *Senecioneae* und *Eupatorieae*), Boraginaceae (in vielen Gattungen wie etwa *Heliothropium*,

Cynoglossum, *Symphytum*), Fabaceae (hauptsächlich in der Gattung *Crotolaria*) und den Orchidaceae (neun Gattungen, z.B. *Phalaenopsis*). Weitere Vorkommen sind für die Familien der Apocynaceae, Convolvulaceae, Celastraceae, Ranunculaceae, Rhizophoraceae, Santalaceae, Sapotaceae (Ober und Hartmann 1999b; Hartmann und Ober 2008) und der Poaceae (Koulman et al. 2008) beschrieben. Angesichts dieses zerstreuten Vorkommens stellt sich die Frage nach dem evolutiven Ursprung dieser Sekundärstoffe. Sind PAs in diesen Taxa unabhängig von einander und mehrfach entstanden, handelt es sich also um einen polyphyletischen Ursprung und Konvergenz? Oder ist die Fähigkeit, PAs zu produzieren, sehr früh in der Evolution der Angiospermen entstanden und haben bis heute viele der rezenten Familien diese Fähigkeit sekundär verloren? Die Aufklärung der Biosynthese, die Identifizierung der beteiligten Enzyme und der kodierenden Gene kann Antworten auf diese Fragen geben: die Phylogenie der Biosynthese-Gene spiegelt die Phylogenie der PAs wieder.

1.2. Biosynthese der Pyrrolizidin-Alkaloide

Die Biosynthese der PAs ist eng mit dem Aminosäure- und Polyaminstoffwechsel verbunden. Bezüglich der aliphatischen Necinsäuren vermutet man eine Biosynthese ausgehend von den verzweigt-kettigen Aminosäuren Valin, Isoleucin, Leucin und ihre Vorstufen. Hingegen wird die Biosynthese der Necinbase aus den Diaminen Putrescin und Spermidin abgeleitet, wie in Abb. 1.2 dargestellt. Aus dem entstehenden Homospermidin kann durch anschließende Oxidation und Zyklisierung der Grundkörper der Necinbase, 1-Formylpyrrolizidin, hergeleitet werden. Auf der Basis dieser postulierten Necinbase-Biosynthese konnte ein wichtiges Schlüsselenzym identifiziert werden: die Homospermidin-Synthase, HSS, EC 2.5.1.45 (Böttcher et al. 1993; Ober und Hartmann 1999b). Mit der Bildung von Homospermidin katalysiert die HSS den ersten spezifischen Schritt in der PA-Biosynthese. Die Identifizierung und Charakterisierung der HSS lieferte die Basis für die Untersuchung der Evolution der HSS, wodurch auch Rückschlüsse auf die Evolution der PAs gewonnen werden konnten.

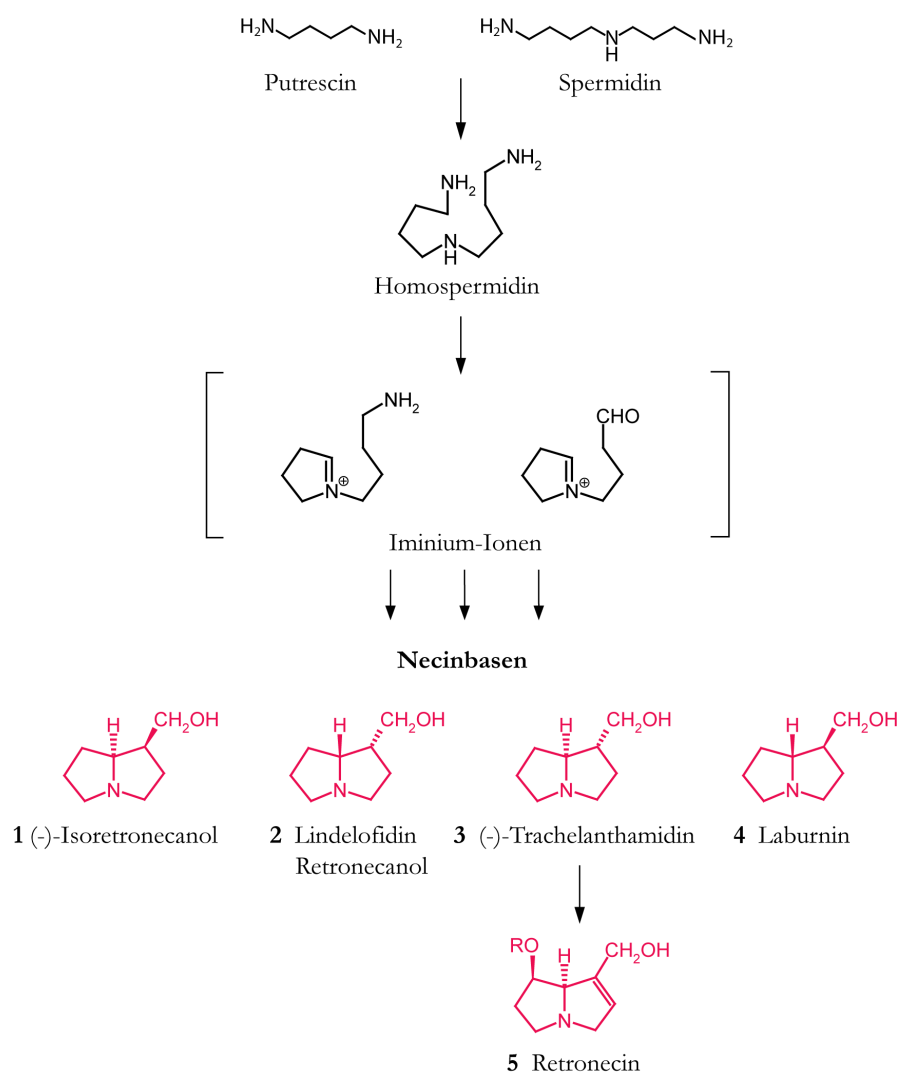


Abb. 1.2 Postulierte Biosynthese der Necinbase aus den Diaminen Putrescin und Spermidin nach Hartmann (1995; 2000). Zyklisierung von Homospermidin führt zur Bildung von vier isomeren 1-Hydroxymethyl-pyrrolizidinen (1-4). Diese stellen die Grundkörper der 1,2-gesättigten PAs dar. Modifikationen führen unter anderem zu den bekannten 1,2-ungesättigten PAs mit einer weiteren Hydroxylgruppe an C7 (5) wie z.B. Retronecin.

1.3. Evolution der Homospermidin-Synthase (HSS)

In Sequenzvergleichen zeigte die HSS eine hohe Ähnlichkeit zur Desoxyhypusin-Synthase (DHS, EC 2.5.1.46). Die DHS stellt dabei ein wichtiges Enzym des Primärstoffwechsels dar, das an der posttranslationalen Aktivierung des eukaryontischen Initiationsfaktors 5A (eIF5A) beteiligt ist (Ober und Hartmann 1999a). Dabei ist die Funktion und die Klassifizierung als Initiationsfaktor dieses 18 kDa großen regulatorischen Proteins derzeit noch in Diskussion. Gesichert ist das ubiquitäre Vorkommen in Eukaryoten und Archaeobakterien.

Zudem ist bekannt, dass der aktivierte eIF5A für Zellwachstum und Teilung essentiell ist (Chen und Liu 1997; Park et al. 1997).

Neben einer hohen Sequenzähnlichkeit besitzen die Gene beider Enzyme eine identische genomische Organisation (Ober et al. 2003b). Zudem weisen HSS und DHS einen identischen Reaktionsmechanismus auf. In einer NAD⁺-abhängigen Reaktion wird ein Aminobutylrest von Spermidin auf das bevorzugte Substrat übertragen (s. Abb. 1.3). Während die HSS ausschließlich das Diamin Putrescin als Aminobutyl-Akzeptor nutzt und damit die Bildung von Homospermidin katalysiert, akzeptiert die DHS zwei Substrate: den eIF5A, wobei der Aminobutylrest auf einen spezifischen Lysin-Rest am Initiationsfaktor übertragen wird, und ebenfalls Putrescin, wobei wiederum Homospermidin gebildet wird. Obwohl die Aktivierung des eIF5A eindeutig die primäre Funktion der DHS darstellt, werden in Pflanzen als Ergebnis der Nebenreaktion mit Putrescin als Substrat auch geringe Mengen an Homospermidin gebildet. Dadurch erklärt sich das Vorkommen geringer Mengen an Homospermidin in einer Vielzahl von untersuchten Pflanzenarten (Ober et al. 2003a). Die HSS jedoch ist nicht fähig, den eIF5A als Substrat zu verwenden (Ober et al. 2003b).

Diese Ähnlichkeiten bezüglich der Sequenz und des Reaktionsmechanismus legen einen evolutive Ursprung der HSS aus der DHS nahe. Als zugrundeliegender Mechanismus wird eine Genduplikation und anschließende Subfunktionalisierung angenommen (Ober und Hartmann 1999b). Das Tochtergen, die HSS, verlor die ursprüngliche Fähigkeit der Aktivierung des eIF5A und die ehemalige Nebenreaktion wurde zur Hauptfunktion des neuen Gens. Damit gilt die Evolution der HSS als eindrucksvolles Beispiel der Theorie, dass Gene des Primärmetabolismus als Pool für die Entstehung neuer Gene des Sekundärstoffwechsels dienen können (Pichersky und Gang 2000). Tatsächlich scheint solch eine Rekrutierung von Genen aus dem Primärstoffwechsel nach einem Duplikationsereignis immer wieder, unabhängig und mehrmalig in nicht verwandten Pflanzenlinien stattzufinden. Ein Prozess, der im Englischen als „repeated evolution“ bezeichnet wird (Cseke et al. 1998; Pichersky und Gang 2000; Zhang 2003; Ober 2005). Durch diesen Mechanismus könnte auch das zerstreute und isolierte Vorkommen vieler sekundärer Inhaltsstoffe in nicht verwandten Taxa erklärt werden. Im Falle der PAs wurden bisher vier unabhängige Rekrutierungen der HSS beschrieben: einmal innerhalb der Monokotylen (Orchidaceae, *Phalaenopsis* sp.), einmal innerhalb der Boraginaceae und zweimal innerhalb der Asteraceae – den Triben Senecioneae und Eupatorieae (Reimann et al. 2004).

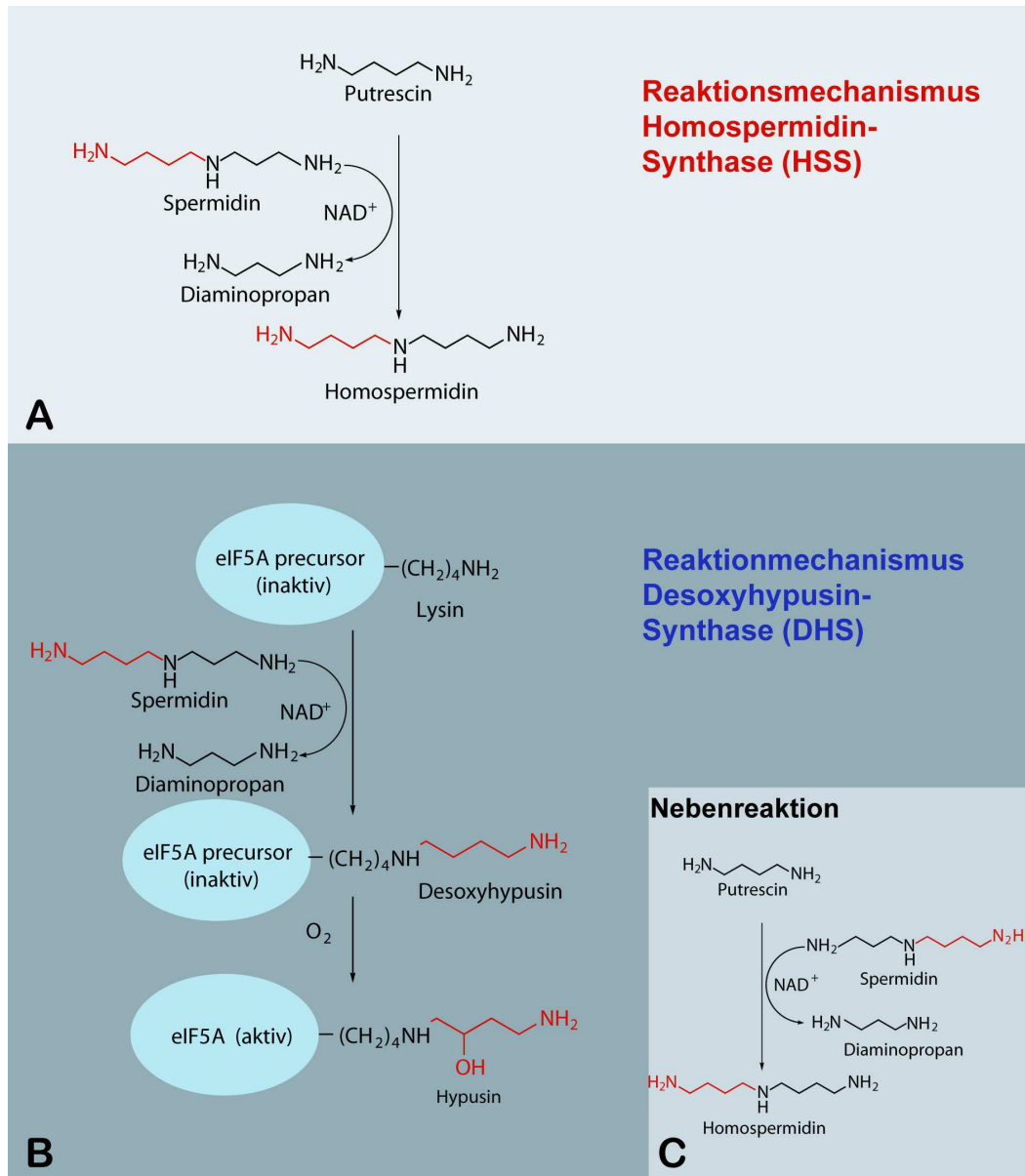


Abb. 1.3 Vergleich der Reaktionsmechanismen von Homospermidin-Synthase (HSS, EC 2.5.1.45) und Desoxyhypusin-Synthase (DHS, EC 2.5.1.46). Beide Enzyme übertragen in einer NAD^+ -abhängigen Reaktion einen Aminobutylrest von Spermidin auf ihr bevorzugtes Substrat. **A.** Die HSS überträgt einen Aminobutylrest auf Putrescin wobei Homospermidin entsteht. **B.** Die DHS überträgt einen Aminobutylrest auf einen spezifischen Lysin-Rest am eukaryontischen Initiationsfaktor (eIF5A), wobei Desoxyhypusin entsteht. Diese Reaktion ist der erste Schritt zur Aktivierung des inaktiven eIF5A precursors. In einer zweiten Reaktion wird das entstandene Desoxyhypusin zu Hypusin hydroxyliert und somit der eIF5A aktiviert. **C.** Die DHS kann allerdings auch Putrescin als Aminobutyl-Akzeptor verwenden. Durch diese Nebenreaktion erklärt sich das geringe Vorkommen von Homospermidin in einer Vielzahl untersuchter Pflanzenarten.

Diese wiederholten Zyklen von Genduplikationen wurden besonders für große Genfamilien wie die Terpen-Synthase-Familie postuliert und bereits beschrieben (Cseke et al. 1998). Da die DHS aber als single-copy Gen in allen vollständig sequenzierten eukaryontischen Geno-

men vorliegt, inklusive dem von *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Brassicaceae), sind diese unabhängigen Ursprünge besonders erstaunlich (Reimann et al. 2004).

Zusammenfassend konnte für das Modellsystem der PAs das verstreute Vorkommen in einigen Familien auf konvergenter Evolution zurückgeführt werden. Der zugrunde liegende molekulare Mechanismus ist die sogenannte „repeated evolution“ durch Genduplikation und anschließende Subfunktionalisierung. Generell kann ein weiterer molekulare Hintergrund eines zerstreuten Vorkommens jedoch auch eine unterschiedliche Genexpression sein – die Gene der Biosynthese sind vorhanden, aber nicht exprimiert. Denkbar wäre auch ein Szenario, in dem viele der rezenten Arten einen bestimmten Biosynthesewege sekundär verloren haben, deren Vorfahren jedoch diese Fähigkeit entwickelt hatten (Wink 2003; Zufall und Rausher 2004; Ober 2005).

1.4. Thema dieser Arbeit

Diese Arbeit hat das Ziel, den Einfluss der zuvor beschriebenen Szenarien auf das Vorkommen der PAs am Beispiel der HSS zu untersuchen und insgesamt das Bild über die Evolution der PAs zu vertiefen. Dabei erwies sich die Familie der Convolvulaceae als geeignetes Untersuchungsobjekt. Darüber hinaus bot sich die Gelegenheit, die HSS in der Familie der Apocynaceae zu charakterisieren.

1.4.1. Pyrrolizidin-Alkaloide in den Convolvulaceae

Die Convolvulaceae zeichnen sich durch ein verstreutes Vorkommen der PAs innerhalb der Familie aus. In den bisher untersuchten, PA-akkumulierenden Pflanzenfamilien der Asteraceae und Boraginaceae sind PAs in vielen Arten vertreten und charakteristisch für ganze Untergruppen, wie etwa das Vorkommen von PAs in den Senecioneae (Asteraceae). Innerhalb der Convolvulaceae besitzen jedoch nur wenige Arten PAs. In einem Screening von 150 Arten aus 23 Convolvulaceen-Gattungen wurden nur in den Vertretern der Gattungen *Ipomoea* sp., *Merremia* sp. und *Argyreia* sp. PAs nachgewiesen (Eich 2007). Innerhalb der genannten Gattung *Ipomoea*, die über 600 Arten beinhaltet, akkumulieren wiederum nur wenige Arten der Untergattung *Quamoclit*, *Sectio Mina* (Jenett-Siems et al. 1998; Jenett-Siems et al. 2005), sowie die Art *I. meyeri* (SPRENG.) G.DON, Untergattung *Ipomoea*, *Sectio Pharbitis* (Tofern 1999) PAs. Zudem kommen auch strukturell unterschiedliche PAs in den

Convolvulaceae vor. Nach Hartmann werden die PAs anhand ihrer Struktur und ihrer Bedeutung in der Phylogenie in 6 Grund-Typen unterteilt (Hartmann und Witte 1995; Hartmann und Ober 2008). Innerhalb einer Familie kommt meistens bevorzugt einer dieser Typen vor. So findet man z.B. innerhalb der Boraginaceae, der Asteraceae - Tribus Eupatorieae, und den Apocynaceae hauptsächlich Alkaloide des Lycopsamin-Typs. Verwendet man diese Klassifizierung der PAs, kommen innerhalb der Convolvulaceae jedoch vier biogenetisch verschiedene Typen vor. In Abb. 1.4 sind diese zusammengefasst dargestellt. Bei Vertretern der Sectio Mina, wie z.B. *I. neei* (SPRENG.) O'DONNELL. und *I. lobata* (CERV.) THELL., kommen die sogenannten Ipanguline und Minalobine vor (Jenett-Siems et al. 1998; Jenett-Siems et al. 2005). Diese bilden nach der Klassifikation nach Hartmann und Ober (2008) eine eigenständige Gruppe, den Ipangulin-Typ der PAs. Charakterisiert wird diese Gruppe durch das Vorkommen von aromatischen Necinsäuren. In *I. meyeri* – der einzigen Art außerhalb der Sectio Mina – kommen Turneforcidin-Derivate vor, wie etwa (-)-9-Tigloyltruneforcidin, welches bereits aus *Senecio racemosus* DC. (Asteraceae) unter der Bezeichnung Racemozin isoliert wurde (Tofern 1999). Nach der Einteilung von Hartmann zählt dieses Alkaloid zur Triangulin-Gruppe. Für *Merremia quinquefolia* (L.) HALL. f. wurde der dritte Typ beschrieben, die Alkaloide des Lycopsamin-Typs (Mann 1997). Letztlich wurde mit den Lolin-Derivaten aus *Argyreia mollis* (BURM. f.) CHOISY (Tofern et al. 1999) ein vierter Typ identifiziert. Dieser ist durch eine Etherbrücke vom C-Atom C2 zu C7 sowie dem Fehlen des C9 charakterisiert, wobei letzteres gegen eine Biosynthese mit Homospermidin als Vorstufe spricht (Hartmann und Witte 1995).

Betrachtet man die Necinbasen der in den Convolvulaceae vorkommenden Alkaloide (s. Abb. 1.4) so kommen in erster Linie Derivate mit gesättigter Base vor. Diese unterscheiden sich bezüglich Stereochemie und Substitution. In der Mina-Gruppe kommen Ester von Platynecin und Trachelanthamidin vor. *I. meyeri* akkumuliert Ester von Turneforcidin, Platynecin, Trachelanthamidin und Isoretronecanol. Einzig in *M. quinquefolia* wurden Derivate der Base Retronecin, mit der sonst für die PAs charakteristischen 1,2-Doppelbindung, nachgewiesen. Die in dieser Familie dominierenden 1,2-gesättigten PAs gelten als nicht-toxisch, zumindest bezüglich der P-450-abhängigen Bioaktivierung zu aktiven Pyrrol-Derivaten. Diese klassische Giftwirkung der PAs als Fraßschutz scheint eine untergeordnete Rolle zu spielen. Für einige Ester von Trachelanthamidin wurde jedoch eine fraßhemmende Aktivität gegenüber Insekten beobachtet (Reina et al. 1997).

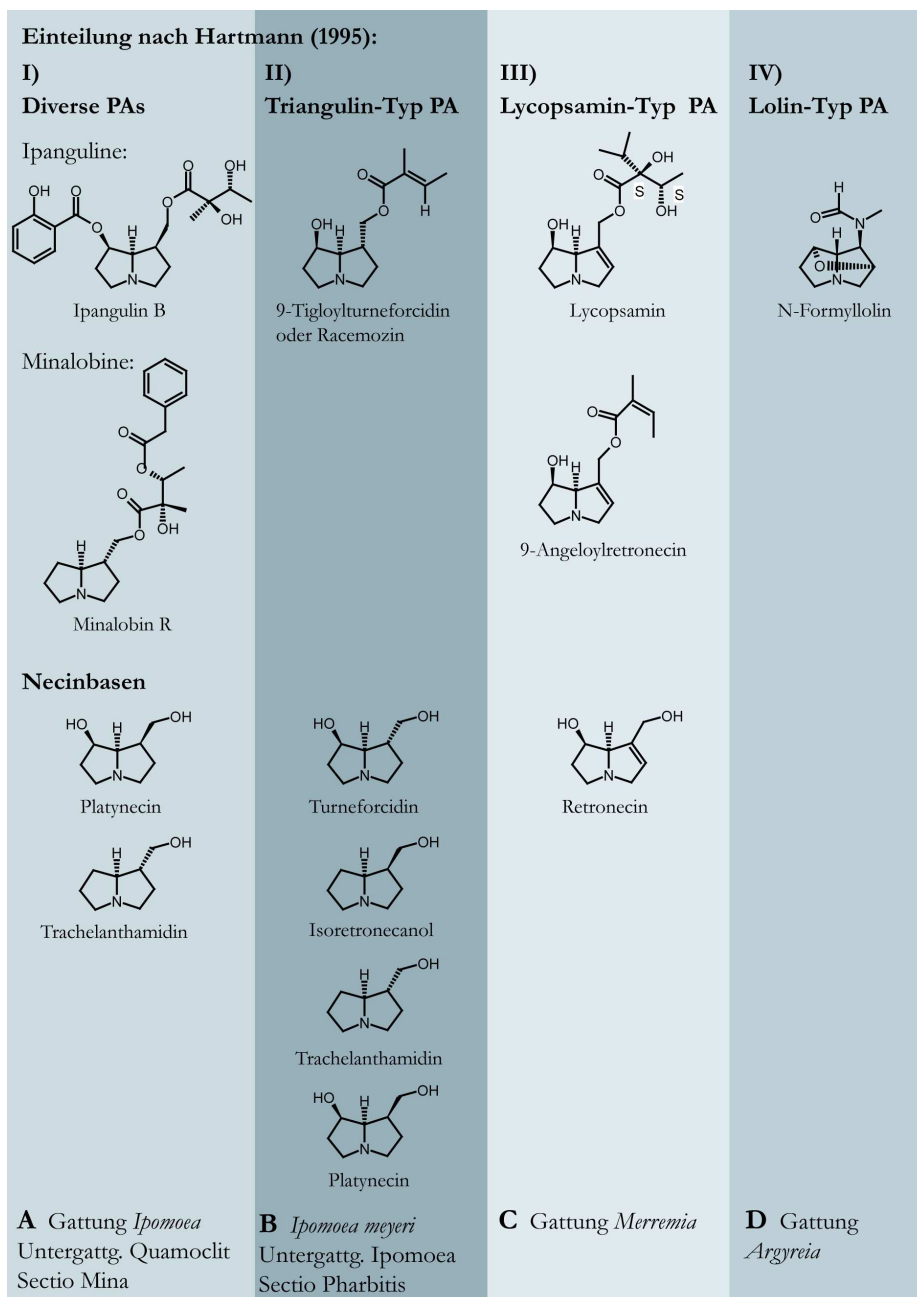


Abb. 1.4 Pyrrolizidin-Alkaloide in den Convolvulaceae. Nach der Einteilung nach Hartmann kommen vier biogenetisch verschiedene Strukturtypen (I – IV) vor. **A.** In der Gattung *Ipomoea*, Sectio Mina wurden die sogenannten Minalobine und Ipanguline nachgewiesen. Diese zeichnen sich durch Phenyl- und Salicylreste als aromatische Necinsäuren aus, die bisher nur in den Convolvulaceae nachgewiesen wurden. Als Necinbasen kommen 2 Isomere von 1-Hydroxy-methylpyrrolizidin vor. **B.** In *I. meyeri* wurden nach der Einteilung nach Hartmann PAs des Triangulin-Types nachgewiesen. Als Necinbase kommen 4 Isomere von 1-Hydroxymethylpyrrolizidin vor. **C.** Innerhalb der Gattung *Merremia* wurden Lycopsamin-Typ PAs nachgewiesen sowie weitere Retronecin-Derivate. Retronecin bezeichnet hier die 1,2-ungesättigten Necinbase. **D.** Vertreter der Gattung *Argyrea* akkumulieren PAs des Lolin-Typs mit einer charakteristischen Etherbrücke von C2 zu C7.

Eine weitere Aktivität umfasst die Inhibierung der Bindung anticholinergischer Drogen am muskarinischen M3-Rezeptor (Ikeda et al. 2005). Die biologische Aktivität der 1,2-

gesättigten PAs ist allerdings weitgehend unbekannt. Das diese Derivate für die Pflanze von ökologischer Bedeutung sind, beweisen indirekt jedoch angepasste Motten (Arctiidae) (Frölich et al. 2006). So werden z. B. von Larven verschiedener Arctiiden-Arten nicht nur 1,2-ungesättigte Alkaloide, sondern auch gesättigte Derivate aufgenommen und auch zur eigenen Verteidigung abgesondert (Hartmann et al. 2005). Außerdem wurden in *Phalaenopsis* sp. ebenfalls gesättigte Derivate, die Phalaenopsine, nachgewiesen. Die höchste Konzentration an Phalaenopsinen wurden in jungen und wachsenden Geweben sowie Organen zur Reproduktion (Blüten und Blütenknospen) gefunden (Frölich et al. 2006). Diese Akkumulation in Pflanzenteilen, die für das Überleben und Wachstum von besonderer Bedeutung sind, entspricht exakt einer Verteilung, die man von Verteidigungsstoffen erwartet (Anke et al. 2008).

Durch dieses isolierte Vorkommen von biogenetisch verschiedenen und in ihrer Toxizität unterschiedlich wirkenden PAs in wenigen Arten eigneten sich die Convolvulaceae besonders für die Untersuchung der Evolution. Ist dieses zerstreute Vorkommen Resultat konvergenter Evolution, wie etwa in den Asteraceae? Hier wurden zwei unabhängige Duplikationsereignisse der DHS nachgewiesen (Reimann et al. 2004). Oder kommen hier die beiden anderen, bereits erwähnten Mechanismen zum tragen:

- i) die Gene des PA-Biosyntheseweges sind vorhanden und werden in vielen Convolvulaceen-Arten nicht exprimiert?
- ii) die Gene des PA-Biosyntheseweges wurden nachträglich wieder verloren?

Die Aufklärung der Evolution der HSS als stellvertretendes Enzym der PA-Biosynthese sollte Rückschlüsse auf diese Fragen ermöglichen.

Zusätzlich können am Modell DHS/HSS grundsätzliche Mechanismen der molekularen Evolution beleuchtet werden. In wie weit trägt etwa positive Selektion zur Entwicklung einer neuen Funktion nach Genduplikation bei? Mit Hilfe von Sequenzanalysen sollte der Einfluss positiver Selektion am konkreten Beispiel DHS/HSS in der Familie der Convolvulaceae untersucht werden.

Prinzipiell wurde ein molekularbiologischer Ansatz gewählt. Erster Schritt war die Identifikation von DHS- und HSS-kodierenden Sequenzen in Vertretern der Convolvulaceae. Diese stellten die Basis für phylogenetische Analysen dar. Dabei war bereits aus der Art

Ipomoea hederifolia L. eine DHS-kodierende cDNA bekannt (Reimann et al. 2004). Aus den Untersuchungen ausgeklammert wurde die Gattung *Argyreia*. Die in dieser Gattung vorkommenden PAs des Lolin-Typs sind biochemisch nicht mit den PAs im engeren Sinne verwandt. Wie bereits erwähnt, spricht das Fehlen des C9 gegen eine Biosynthese über Homospermidin (Hartmann und Witte 1995).

Einen weiteren Aspekt stellten vergleichende Expressionsstudien von HSS und DHS dar. Vor dem Hintergrund, dass sowohl Primär- als auch Sekundärstoffwechsel einer strengen Regulation unterliegen, fällt der Expression eines duplizierten Gens besondere Bedeutung zu.

1.4.2. Pyrrolizidin-Alkaloide in den Apocynaceae

Im Rahmen der Arbeit bot sich die Möglichkeit, die PA-Biosynthese in der Familie der Apocynaceae zu untersuchen. Einige Vertreter dieser Familie akkumulieren PAs des Lycopsamin-Typs – jenes Typs, der auch in *M. quinquefolia* nachgewiesen wurde (Abe et al. 1991; Hartmann und Witte 1995). Analog zu den Convolvulaceae sollten mit Hilfe der Identifizierung der HSS und DHS Rückschlüsse auf die Evolution der PAs in dieser Familie gezogen werden. Prinzipiell wurde eine zu den Convolvulaceen ähnliche Versuchsstrategie verfolgt. Mit Hilfe einer PCR mit degenerierten Primern sollten homologe Sequenzen identifiziert werden. Neben einer Charakterisierung dieser Sequenzen und der kodierten Proteine für phylogenetische Analysen stellten auch hier Expressionsstudien der identifizierten Sequenzen Gegenstand dieser Arbeit dar.

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial

Alle untersuchten Arten (s. Tab. 2.1), mit Ausnahme der beiden *Convolvulus*-Arten *C. arvensis* und *C. tricolor* sowie *I. alba*, wurden in Sterilkultur unter kontrollierten Bedingungen bei einer Raumtemperatur von 25°C kultiviert. Die Kultivierung der oberirdischen Pflanzenteile erfolgte bei einem Tagesrhythmus von 16 Stunden Licht und 8 Stunden Dunkelheit auf MS-Medium (Murashige und Skoog 1962) mit 9 g Agar pro 1 Liter Medium (s. Anhang). Die Wurzeln wurden dagegen unter permanenter Dunkelheit und Schütteln (100 Upm) in MSOH-Flüssigmedium (ohne Agar) gezogen. Zur Etablierung der Sterilkulturen wurden die Samen der Versuchspflanzen zuerst für 1-2 Minuten in 70 % Ethanol und anschließend für 1-5 Minuten in 35 %igen Wasserstoffperoxid (Roth) oberflächensterilisiert. Diese sterilisierten Samen wurden über Nacht in autoklaviertem Wasser vorgequellert und danach unter sterilen Bedingungen auf MSOH-Agarplatten zum Keimen gebracht. Die Keimpflanzen wurden wie oben beschrieben kultiviert und in einem Einmonatszyklus auf neues Medium transferiert. Zusätzlich zu den Sterilkulturen wurden die Arten bei einer Temperatur von 19-22°C angezogen im Gewächshaus des Botanischen Gartens in Kiel,.

Tab. 2.1 Artenliste der verwendeten Pflanzen mit Angabe der Herkunft des Saatgutes.

<i>Art</i>	<i>Herkunft des Saatgutes</i>
Apocynaceae	
<i>Parsonsia laevigata</i> Alston	Japan, Ritsuo Nishida;
Convolvulaceae	
<i>Ipomoea hederifolia</i> L.	Thailand, 1993, Panama 2000 ^{a)}
<i>Ipomoea neei</i> (Spreng.) O'Donell	Panama 1995 ^{a)}
<i>Ipomoea meyeri</i> (Spreng.) G. DON	Panama, 1997 ^{a)}
<i>Ipomoea alba</i> L.	Panama, 1997 ^{a)}
<i>Ipomoea purpurea</i> L.	Madagaskar, 1990 ^{a)}
<i>Merremia quinquefolia</i> (L.) H. HALL	Panama, 1997 ^{a)}
<i>Convolvulus arvensis</i> L.	Botanischer Garten der CAU zu Kiel
<i>Convolvulus tricolor</i> L.	Botanischer Garten der CAU zu Kiel

^{a)} gesammelt und dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt von Prof. E. Eich, Freie Universität Berlin

2.2. Molekularbiologische Techniken

2.2.1. Stammlösungen - Laborverbrauchsmaterialien - Enzyme

Alle wässrigen Lösungen und Puffer wurden mit entionisiertem Wasser (Milli-Q System, Millipore) angesetzt. Wenn nötig, wurden diese mittels Rotilabo®-Spritzenfilter mit einer PVDF Membran (0,22 µm Porengröße), Ø 33 mm, sterilisiert. Alternativ dazu erfolgte eine Sterilisierung der Lösungen durch Autoklavieren (121°C, 1,1 bar, 20 Minuten).

Stammlösungen von folgenden Chemikalien wurden angesetzt:

Ampicillin 50: 50 mg/ml H₂O, sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C

Kanamycin 30: mg/ml H₂O, sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C

0,5 M IPTG: 0,6 g/5 ml H₂O, sterilfiltriert, Lagerung bei -20°C

X-Gal: 40 mg/ml in Dimethylformamid, Lagerung bei -20°C

Laborverbrauchsmaterialien aus Kunststoff stammten von Sarstedt. Alle verwendeten Grundchemikalien wurden von den Firmen Merck, Roth und Fluka bezogen. Die Lagerung erfolgte nach Angaben der Hersteller.

Enzyme für das molekularbiologische Arbeiten wie z.B. Polymerasen und Restriktionsenzyme sowie weitere Standardmaterialien wie dNTPs wurden von Fermentas und Invitrogen bezogen. Die Verwendung erfolgte nach Angaben der Hersteller. Auf Abweichungen wird im Text hingewiesen. Die detaillierten Bezugsquellen der einzelnen verwendeten Kits, Enzyme, DNA- und Proteinleitern sowie Materialien für die Mikroskopie und die immunologischen Techniken sind an entsprechender Stelle im Text angegeben.

2.2.2. Bakterienkultur

2.2.2.1. Medien

Als Nährmedium für die Anzucht der verschiedenen *Escherichia coli*-Kulturen wurde das von Bertani (1951) formuliert LB-Medium verwendet, jedoch ohne Glucose. Die Abkürzung LB stammt dabei von der Bezeichnung „lysogeny broth“ (Bertani 2004).

Die Zusammensetzung lautet wie folgt:

LB-Medium

Trypton	10,0 g
Hefeextrakt	5,0 g
NaCl	10,0 g
Wasser	ad 1000,0 ml
	pH 7,5

Zur Herstellung von LB-Agarplatten wurden 16 g Agar pro 1 l Flüssigmedium zugesetzt. Das für Dauerkulturen benötigte LB-Glycerin wurde analog dem Flüssigmedium in einem Gemisch aus 6 Teilen Glycerin und 4 Teilen Wasser angesetzt. Sämtliche Medien wurden durch Autoklavieren sterilisiert.

Das für die Regeneration der Zellen nach der Transformation benötigte SOC-Medium setzt sich wie folgt zusammen:

SOC-Medium

Trypton	4,0 g
Hefeextrakt	1,0 g
NaCl	116,90 mg
KCl	37,28 mg
50% (m/v) Glukose-Lsg	1,6 ml
Wasser	ad 200,0 ml
	pH 7,5

Der autoklavierten Lösung wurde anschließend 1 ml sterilfiltrierte $MgCl_2$ -Lösung (1 M) und 1 ml sterilfiltrierte $MgSO_4$ -Lösung (1 M) zugesetzt. Zur Sterilfiltration wurden Rotilabo®-Spritzenfilter (s. Kap. 2.2.1) verwendet.

2.2.2.2. *Verwendete E. coli-Zelllinien*

Top10 (Invitrogen) - Genotyp: *E. Coli* F- *mcrA* $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ *galU* *nupG* $\Phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ *recA1* *araD139* $\Delta(araleu)7697$ *endA1* *galK* *rpsL* (Str^R)

BL21(DE3) (Novagen) – Genotyp: *E. coli* B F⁻ *dcm* *ompT* *hsdS*(r_B⁻ m_B⁻) *gal* λ (DE3)

2.2.2.3. *Herstellen kompetenter Zellen*

Bakterienkulturen der gewünschten *E. coli*-Zelllinie wurden in flüssigem LB-Medium bis zu einer optischen Dichte bei 600 nm (OD₆₀₀) von 0,6 angezogen. Anschließend wurden

die Zellen durch Zentrifugation geerntet und mit Hilfe der Calciumchlorid-Methode chemisch kompetent gemacht. Dazu erfolgte eine Inkubation mit 0,1 M CaCl_2 -Lösung, die 15% (m/v) Glycerin enthielt. Bei einer Inkubationsdauer von 12-24 Stunden wurde eine optimale Transformationseffizienz erreicht. Aliquots der chemisch kompetenten Zellen (100 bis 200 μl) wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Verwendung bei -80°C gelagert.

2.2.2.4. *Herstellen von Dauerkulturen*

Von ausgewählten Klonen wurden Dauerkulturen hergestellt und bis zur Wiederverwendung bei -80°C gelagert. Dazu wurden 750 μl der Bakterienkulturen mit 250 μl LB-Glycerin (s. Kap. 2.2.2.1) versetzt und die Probenröhrchen anschließend tiefgefroren. Im Falle einer Wiederholung der Plasmid-DNA-Isolierung oder der Expression konnten die entsprechenden Dauerkulturen zum Animpfen und Anziehen neuer Kulturen verwendet werden.

2.2.3. **RNA-Isolierung**

Das Pflanzenmaterial (Blätter, Sprossachse, Sprossspitze und Wurzeln) wurde unmittelbar nach dem Sammeln in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. Zur RNA-Isolierung wurden zwei unterschiedliche Kits bzw. Methoden verwendet: das RNeasy Plant Minikit (Qiagen) und das TRIzol reagent (Invitrogen). In beiden Fällen musste das Pflanzenmaterial mit Mörser und Pistill unter flüssigem Stickstoff homogenisiert werden. Die weiteren Schritte erfolgten nach den Angaben der Hersteller. Die Überprüfung und Quantifizierung der isolierten RNA erfolgte UV-photometrisch (s. Kap. 2.2.4). Die Qualität der RNA wurde zusätzlich mittels Gelelektrophorese überprüft. Dabei wurde routinemäßig eine gewöhnliches Agarose-Gel (s. Kap. 2.2.5) ohne Formaldehyd verwendet. Bei einer intakten RNA sollten keine RNA-Degradationsprodukte als niedermolekularer Schmier nachweisbar sein und die 25S rRNA- und 18S rRNA-Banden sollten als eindeutige, distinkte Banden in einem ungefähren Intensitätsverhältnis von 2:1 zu erkennen sein. Bei Verwendung der 100 bp DNA Leiter von Invitrogen lagen die entsprechenden Banden auf Höhe von 1000 bp und 700 bp. Eventuelle Verunreinigungen mit genomischer DNA ergaben Banden im Bereich weit über 2000 kb.

2.2.4. Quantifizierung der Nukleinsäuren

Die Gehaltsbestimmung der Nukleinsäure erfolgte UV-photometrisch am Ultrospec 2100pro Spektrometer von Amersham Biosciences. Die 1:100 verdünnten Proben wurden bei 260, 280 und 230 nm vermessen. Grundsätzlich basiert die UV-photometrische Methode zur Quantifizierung auf den spezifischen Absorptionseigenschaften von Nukleinsäuren. Bei einer Wellenlänge von 260 nm besitzen Nukleinsäuren ein lokales Maximum in der Absorption. Eine Absorption von 1 bei 260 nm entspricht bei RNA einer Konzentration von 40 µg/ml. Für DNA entspricht diese Absorption einer Konzentration von 50 µg/ml, für ssDNA, wie z.B. cDNA, 33 µg/ml. Einen Hinweis auf mögliche Proteinkontaminationen der Nukleinsäuren gibt das Verhältnis der $OD_{260\text{ nm}}$ zu $OD_{280\text{ nm}}$. Saubere DNA- und RNA-Proben sollten einen Quotienten von ≥ 1.8 aufweisen. Abweichungen von diesen Werten weisen auf eine Verunreinigung mit Proteinen hin. Eine erhöhte Absorption bei 230 nm gibt ebenso Hinweise auf Proteinverunreinigungen, denn in diesem Wellenlängenbereich liegt das Absorptionsmaximum von Peptidbindungen. Darüber hinaus werden aber auch Kontaminationen mit Pufferbestandteilen in diesem Wellenlängenbereich angezeigt, da Tris, EDTA und andere Puffersalze ebenfalls bei einer Wellenlänge von 230 nm absorbieren. Der Quotient aus $OD_{260\text{ nm}}/OD_{230\text{ nm}}$ sollte bei RNA Proben $> 1,0$ sein. Ein niedrigerer Wert könnte neben einer Kontamination mit Proteinen und Puffer auch auf eine Verunreinigung mit Guanidiniisothiocyanat hindeuten. Guanidiniisothiocyanat ist ein häufig in der RNA-Reinigung verwendetes Reagens, das über den Bereich von 230 – 260 nm absorbiert. Zu beachten sind hierbei nachteilige Effekte auf nachfolgende enzymatische Reaktionen, wie z. B. die reverse Transkription, den Guanidin ausüben kann.

Alternativ zum Ultrospec 2100pro Spektrometer wurde auch das NanoDrop® ND-1000 Spektrometer (PqLab) verwendet. Der Vorteil dieses Gerätes lag an dem geringen benötigten Probenvolumen: Pro Messung wurde nur 1 µl der Probe eingesetzt.

2.2.5. Agarose-Gelelektrophorese

Routinemäßig wurden 1%ige Agarose-Gele (Roti®garose, Roth) mit 0,5 µg Ethidiumbromid/ml Gel (Ethidiumbromidlösung 1%, Roth) für die Qualitäts- und Quantitätskontrolle von DNA und RNA sowie zur PCR-Kontrolle verwendet. Als Leitern zur Größeneinschätzung der zu analysierenden DNA und RNA Moleküle kamen die 100 bp und die 1 kb DNA

ladder (Invitrogen) zum Einsatz. Aufgetragen wurden die DNA- und RNA-Proben mit Probenpuffer im Verhältnis 2:1. Als Elektrophoresepuffer wurde der Tris-Borate-EDTA-Puffer (TBE) verwendet. Die Trennung wurde standardmäßig bei 80 mV durchgeführt, Laufzeit 30 Minuten, in Elektrophoresekammern der Firma Biorad (Mini Sub Cell GT). Die Detektierung erfolgte mit UV-Licht durch die Interkalation des fluoreszierenden Ethidiumbromids mit den Nukleinsäuren im Multiimage Light Cabinet (Biozym). Die Dokumentation erfolgte mit der Alphaimager Software (Version 4.1.0).

Der DNA Probenpuffer und TBE-Puffer setzten sich wie folgt zusammen:

<i>10x TBE-Puffer</i>		<i>DNA-Probenpuffer</i>	
Tris-Base (89 mM)	108,0 g	Xylencyanol	0,25 g
Borsäure (89 mM)	55,0 g	Bromphenolblau	0,25 g
EDTA (20 mM)	7,3 g	Ficoll 400	25,0 g
Wasser	ad 1000,0 ml	EDTA (50 mM)	1,46 g
1:10 Verdünnung ergibt die Gebrauchslösung von 1xTBE.		Wasser	ad 100,0 ml

2.2.6. cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde 1 µg Gesamt-RNA als Vorlage und ein oligo(dT)₁₇-Primer (0,1 µM, 5'-dGTCGACTCGAGAATTC(T)₁₇-3') verwendet, der sich an den Poly(A)-Schwanz der mRNA anlagert. Als reverse Transkriptase kamen die RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas), Superscript™ II und III Reverse Transcriptase (Invitrogen) zum Einsatz. Die Reaktionen erfolgten in einem Gesamtvolumen von 20 µl nach den Angaben der jeweiligen Hersteller. Hervorzuheben ist die Superscript™ III Transkriptase. Sie ermöglicht eine cDNA-Synthese bei 55°C. Bei dieser Temperatur werden die Sekundärstrukturen der RNA deutlich besser aufgebrochen als bei 42°C, dem Temperatur-optimum vieler reverser Transkriptasen. Das führte in manchen Fällen zur einer verlängerten cDNA Strang-Synthese und damit zu vollständigen 5'-Enden.

Die cDNA konnte direkt als Vorlage in PCR-Reaktionen eingesetzt werden. Bei größeren PCR-Produkten (> 1 kb) wird jedoch vom Hersteller eine Entfernung der zur cDNA komplementären RNA empfohlen. Dazu wurden 1 – 2 units *E. coli* RNase H (Invitrogen) zu dem Reaktionsansatz pipettiert und für 20 Minuten bei 37°C inkubiert.

2.2.7. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Standardmäßig wurde die *Taq* DNA-Polymerase (Invitrogen) für die PCR-Vervielfältigung verwendet. Zusätzlich kamen die „proof-reading“ DNA-Polymerasen *Pfu* (Promega), Platinum *Pfx* (Invitrogen) oder AccuTaq™LA (Sigma) zum Einsatz. PCR-Puffer, dNTPs, Salze (MgCl₂) sowie Primer wurden nach Angaben des Herstellers verwendet. Die PCR-Reaktionen erfolgten standardmäßig in einem Gesamtvolumen von 25 µl.

Generell wurde als Temperaturprogramm das sogenannte „Basic PCR Protocol/Hot-start“ verwendet. Hierbei werden cDNA und Primer vorerst erhitzt und erst nach einer initialen Denaturierungsphase von 3 Minuten bei 95°C wird die Polymerase-Kettenreaktion durch die Zugabe von Enzym und Puffer gestartet. Dadurch sollte das unspezifische Anlagern der Primer und somit die Artefaktbildung verringert werden. Darüber hinaus sollte auch eine vollständige Denaturierung der Vorlage-DNA sichergestellt werden. In manchen Fällen kam das sogenannte „touch-down“ Protokoll (Don et al. 1991) zum Einsatz. Hier wurde die Annealing-Temperatur pro Zyklus reduziert, standardmäßig um 0,5°C pro Zyklus, beginnend von einer Annealing-Temperatur, die über oder nahe der Schmelztemperatur der Primer liegt. Standardmäßig wurden 20 Zyklen mit abnehmender Annealing-Temperatur gewählt, entsprechend einer Temperaturdifferenz von 10°C. Daran anschließend erfolgten noch 15 bis 20 Zyklen der PCR-Amplifikation bei konstanter Annealing-Temperatur, und zwar bei jener Temperatur, die im letzten touch-down Zyklus erreicht wurde. In einigen Fällen konnte durch dieses touch-down Protokoll die Produktspezifität erhöht werden.

Das Standardtemperaturprogramm für die PCR, in 35 bis 40 Zyklen angewandt, lautet wie folgt:

	<i>Hot-start PCR</i>			<i>touch-down PCR</i>		
Initiale Denaturierung	95°C	3 min		95°C	3 min	
Denaturierung	95°C	45 s		95°C	45 s	
Annealing	x°C	1 min		x°C	1 min	
				-0,5°C/Zyklus		
Elongation	72°C	3 min	35 - 40 Zyklen	72°C	3 min	20 Zyklen
Elongation	72°C	10 min		95°C	45 s	
				x°C	1 min	
				72°C	3 min	15 - 20 Zyklen
				72°C	10 min	

Diese Standardprogramme wurden für die jeweiligen Proben, besonders bezüglich der Annealing-Temperatur (im Standardtemperaturprogramm mit x °C angegeben), optimiert. Je nach eingesetzter DNA-Polymerase erfolgte die Elongationsphase bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur von 72°C (*Taq* und *Pfu* DNA-Polymerase) oder 68°C (Platinum *Pfx* und AccuTaqTMLA DNA-Polymerase). Die Zeitspanne der Elongation wurde bei langen PCR-Produkten vergrößert. Die abschließende 10-minütige Elongationsphase diente der Verlängerung jener PCR-Produkte, die in den Zyklen davor nur unvollständig amplifiziert worden waren.

Hervorzuheben ist die besondere Eignung der Platinum *Pfx* DNA-Polymerase für die „Hot-start“ PCR. Das aktive Zentrum ist bei niedrigen Temperaturen durch einen Antikörper geschützt, wodurch die Enzymaktivität inhibiert wird. Durch eine 3- bis 5-minütige initiale Denaturierungsphase wird die Bindung des Antikörpers gelöst und die Polymerase aktiviert.

Für die PCR wurden folgende Geräte verwendet:

GeneAmp[®] PCR System 2400 und 9700 von AB (Applied Biosystems)
Mastercycler Modell „personal“ und „gradient“ von Eppendorf.

Der „gradient“ Cycler ermöglichte es, bis zu 12 verschiedene Annealing-Temperaturen gleichzeitig innerhalb eines PCR-Laufes einzustellen. Dadurch konnte zeitsparend eine möglichst optimale Annealing-Temperatur für die PCR-Amplifizierung ermittelt werden.

2.2.8. Polymerase-Kettenreaktion mit degenerierten Primern (DOP-PCR)

Zur Identifizierung homologer Sequenzen von HSS und DHS wurde die Polymerase-Kettenreaktion mit degenerierten Primern verwendet. Die degenerierten Primer wurden auf der Basis eines Alignments von HSS- und DHS-Sequenzen aus verschiedenen Organismen entworfen. Die Primer-Bindungsstelle wurden dabei in besonders hoch konservierte Bereiche gelegt. In der PCR wurden verschiedene Kombinationen an degenerierten Primern und cDNA unterschiedlicher Pflanzenorgane der Versuchspflanzen eingesetzt. Standardmäßig erfolgte die Amplifizierung mit der rekombinanten *Taq* DNA-Polymerase (Invitrogen) in einem Gesamtvolumen von 25 µl wie unter 2.2.7 beschrieben. Es wurden 1,0 bis 2,0 µl cDNA und Primer in einer Konzentration von 0,8 µM eingesetzt. Zur Klonierung wurden

die PCR-Produkte elektrophoretisch gereinigt. Dabei kam das QIAEX II Kit (Qiagen) oder das NucleoSpin® Extract II (Macherey-Nagel) zum Einsatz.

2.2.9. Klonierung und Transformation

Für die standardmäßige Klonierung von PCR-Produkten bis zu einer Größe von 2 kb und anschließendes Sequenzieren wurde der pGEM-T® Easy Vector (Promega) verwendet. Dieser Vektor nutzt die sogenannte TA-Klonierung. Er besitzt einen einzelnen 3'-T Überhang an der Insertionsstelle. Dadurch ist eine verbesserte Ligationseffizienz gewährleistet, da sich der Vektor nicht wieder re-ligieren kann. Darüber hinaus wird dadurch ein kompatibles Ende für PCR-Produkte generiert. Bestimmte DNA-Polymerasen, darunter die *Taq* und AccuTaq™ LA DNA-Polymerase, besitzen eine terminale Transferase-Aktivität, die Vorlage-unabhängig ein einzelnes Desoxyadenosin an das 3'-Ende der PCR-Produkte knüpfen. Bei Verwendung der *Pfu* und Platinum *Pfx* DNA-Polymerase ohne terminaler Transferase-Aktivität konnten an die PCR-Produkte nachträglich ein A-Tail geknüpft werden. Dazu wurden die PCR-Produkte mit *Taq* DNA-Polymerase, Reaktions-Puffer, MgCl₂ und dATP (Endkonzentration 0,2 mM) für 15-30 Minuten bei 72°C inkubiert.

Die Ligation wurde nach Angaben des Herstellers bei einer Inkubation über Nacht bei 4°C durchgeführt. Die Transformation erfolgte in chemisch kompetente *E. coli*-TOP10-Zellen durch das Hitzeschock-Verfahren. Dazu wurden die Zellen für 45-60 Sekunden in einem Wasserbad bei 42°C inkubiert. Nachdem die Zellen in SOC-Medium (s. Kap. 2.2.2.1) bei 37°C unter Schütteln (230 Upm) für die Dauer einer Stunde regeneriert wurden, erfolgte die Ausplattierung der Zellen auf LB-Platten mit Ampicillin (Roth), 100 µg/ml LB zur Selektion positiver Klone. Das im pGEM-T® Easy Vector kodierte Lac-Operon ermöglichte zusätzlich ein blau/weiß Screening. Dazu wurden die LB-Platten mit 0,5 mM IPTG (Roth) und X-Gal (Roth) 80 µg/ml LB versetzt. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht (16-24 Stunden) bei 37°C.

Für die Klonierung besonders großer PCR-Produkte wurde der pCR®-XL-TOPO® Vector verwendet. Ähnlich zum pGEM-T® Easy Vector kommt auch beim pCR®-XL-TOPO® Vector die TA-Klonierung zum Einsatz. Der linearisierte pCR®-XL-TOPO® Vector besitzt ein 3'-Desoxythymidin Überhang. Zusätzlich fördert eine an den Vektor gebundene Topoisomerase I die Ligation (Shuman 1994). Im Gegensatz zum pGEM-T® Easy Vector ermög-

licht dieser Vektor allerdings kein „blau/weiß-screening“, sondern die Selektion positiver Klone beruht auf der Zerstörung des letalen *E. coli*-Gen *ccdB* (Bernard et al. 1994) bei einer erfolgreicher Ligation. Zellen, die einen Vektor ohne Fremd-DNA tragen, können nach dem Plattieren auf einer LB-Platte nicht überleben. Darüber hinaus enthält der Vektor Kanamycin als selektiven Marker. Die Ligation erfolgte nach Angaben des Herstellers. Die Transformation erfolgte ebenfalls in chemisch kompetente *E. coli*-TOP10-Zellen durch das Hitzechock-Verfahren. Transformierte Zellen wurden auf LB-Platten mit 50 µg Kanamycin (Roth)/ml LB zur Selektion ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht (16-24 Stunden) bei 37°C.

2.2.10. Isolierung von Plasmid-DNA und Identifizierung der gewünschten Klone

Für eine Isolierung der Plasmid-DNA wurden positive Klone in 7 ml LB Medium (flüssig) mit entsprechendem Selektionsmarker über Nacht bei 37°C unter Schütteln (230 Upm) kultiviert. Standardmäßig wurde für ein erstes Screening der Klone bezüglich der gewünschten Insertion die von Holmes und Quigley (1981) beschriebene „rapid boiling method“ verwendet. Hierbei wurden Bakterien von 3-4 ml Flüssigkultur durch Zentrifugation geerntet und in STET-Puffer resuspendiert. Durch Zugabe von Lysozym (Roth) wurden die Zellen aufgeschlossen und anschließend für 90 Sekunden bei 95°C gekocht. Danach wurden die unlösliche genomische DNA und die Zellfragmente durch Zentrifugation entfernt, die Plasmid-DNA durch Isopropanol-Fällung gewonnen und in Tris-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8) resuspendiert.

Die verwendeten Puffer und Lösungen setzen sich wie folgt zusammen:

<i>STET-Puffer</i>		<i>Lysozym-Lösung</i>	
Tris-HCl (10 mM, pH 8,0)	242 mg	Lysozym in Tris-HCl (10 mM,	10 mg/ml
Na-EDTA (50 mM)	3,7 g	pH 8,0)	
8 % (w/v) Saccharose	16 g		
0,5 % (v/v) Triton X-100	1 ml	<i>Ammoniumacetat</i> (7,5 M)	5,8 g
Wasser	ad 200 ml	Wasser	ad 100 ml

Mit Hilfe von Restriktionsanalysen der Plasmid-DNA konnten positive Klone identifiziert werden. Je nach Fragestellung mussten hierzu geeignete Enzyme ausgewählt werden. Bei der Auswahl der Enzyme waren im Internet verfügbare Programme, die eine Vorher-

sage der Restriktionsschnittstellen in einer bekannten Sequenz erstellen, hilfreich. Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Internetseiten verwendet:

http://wacut.uwaterloo.ca/wacut/wacut/template.php?act=restriction_new

oder <http://www.arabidopsis.org/cgi-bin/patmatch/RestrictionMapper.pl>

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von Fermentas bezogen und nach Herstellerprotokoll verwendet. Es wurden 3,0 µl Plasmid-DNA sowie das Restriktionsenzym, der geeignete Puffer und autoklaviertes Wasser bis zu dem Gesamtvolumen von 5,0 µl eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden für 1 Stunde bei der für das jeweilige Enzym optimalen Temperatur inkubiert. Durch anschließende Agarose-Gelelektrophorese wurde die Restriktion analysiert. Von positiven Klonen wurde eine Dauerkultur (s. dazu Kap. 2.2.2.4) angelegt und bei -80°C aufbewahrt.

Bei einem Screening nach einem Fremd-DNA-tragenden Klon bei einer Klonierung in pGEM-T® Easy oder pCR®-XL-TOPO® Vektor kam standardmäßig das Restriktionsenzym *EcoRI* zum Einsatz. In beiden Vektoren befindet sich zu beiden Seiten der Insertionsstelle Restriktionsschnittstellen für *EcoRI*. Durch einen Restriktionsverdau der Plasmid-DNA *EcoRI* wurde die einligierte Fremd-DNA aus dem Vektor geschnitten.

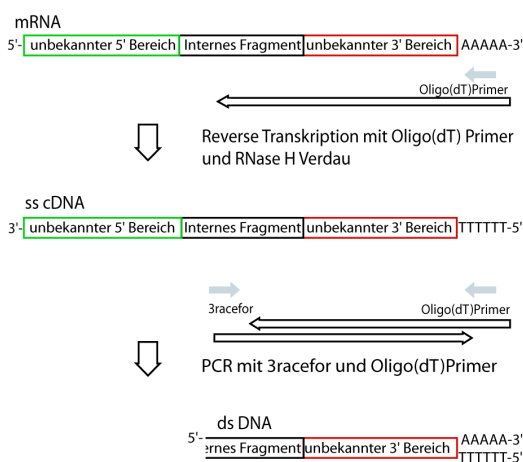
Für Sequenzanalysen positiver Klone reichte die Reinheit der durch die rapid-boiling Methode isolierten Plasmid-DNA nicht aus. Für diesen Zweck erfolgte die Isolierung der Plasmid-DNA mit Hilfe des Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) nach Angaben des Herstellers.

2.2.11. Amplifizierung der 3'- und 5'-Enden von cDNAs

Auf der Basis der aus DOP-PCR resultierten internen cDNA-Fragmente konnte die gesamte kodierende Sequenz mit Hilfe der sogenannte Rapid Amplification of cDNA Ends Technik (RACE-Technik, Life Technologies) identifiziert werden. In Abb. 2.1 sind die Schritte der 3'- sowie der 5'-RACE-Technik schematisch dargestellt. Die 3'-RACE-Technik nutzt den Poly(A)-Schwanz am 3'-Ende jeder mRNA. Sie basiert im Prinzip auf einer PCR mit einem genspezifischen, vorwärtsgerichteten Primer (3racefor) sowie einem rückwärtsgerichteten Oligo(dT)₁₇ Primer, komplementär zu dem erwähnten Poly(A)-Schwanz der mRNA. Vorwärts- und rückwärtsgerichtete Primer werden im Folgenden mit der englischen

Bezeichnung forward und reverse abgekürzt. Den ersten Schritt der 3'-RACE stellte die reverse Transkription der mRNA mit dem Oligo(dT)₁₇ Primer dar. Danach wurde die mRNA durch RNaseH degradiert und die verbleibende Einzelstrang-cDNA (engl. single stranded cDNA, ss cDNA) konnte in einer PCR als Vorlage eingesetzt werden. Durch den 3'acefor-Primer, der sich an der internen, bereits bekannten Sequenz anlagert, und den Oligo(dT)₁₇ reverse-Primer wurde der 3'-Bereich des Transkriptes, inklusive der 3'-Untranslatierten-Region (UTR), amplifiziert. Die 5'-RACE-Technik ist etwas komplexer, da im 5'-Bereich der mRNA kein bekanntes Sequenzmotiv liegt. Die reverse Transkription der mRNA erfolgte bereits mit einem genspezifischen Primer (5'ace1rev). Nach Reinigung der ss cDNA wurde durch die Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT, Invitrogen) an das 5' Ende ein oligo(dC)-Schwanz angeknüpft. Diese so modifizierte cDNA wurde anschließend als Vorlage in einer PCR mit einem genspezifischen reverse-Primer (5'ace2rev) und einem forward-Primer komplementär zum Oligo(C)-Schwanz verwendet, dem so genannten „anchor Primer“ (Abridged Anchor Primer, AAP). Dabei ist zu beachten, dass die Bindungsstelle des 5'ace2-Primers oberhalb bzw. weiter 5'wärts des 5'acerev1-Primer liegt (s. Abb. 2.1). Eine zweite Runde der PCR erhöhte die Spezifität und Ausbeute. Dabei wurde die sogenannte „semi-nested“ PCR verwendet. Hier dient das Produkt einer ersten PCR-Vervielfachung als Vorlage für eine zweite Amplifikation, wobei der zweite reverse Primer gewissermaßen innerhalb des ersten Primers liegt (s. Abb. 2.1). Im Falle der 5'RACE wurde dazu ein dritter genspezifischer Primer (5'ace3rev) eingesetzt sowie ein weiterer reverse-Primer, der sogenannte „adapter Primer“ (Abridged Universal Amplification Primer, AUAP), der sich an die AAP-Sequenz anlagerte. Als Vorlage wurde die 1:10 bis 1:100 verdünnte 1. PCR-Reaktion verwendet. Diese semi-nested PCR ermöglichte es, auch sehr geringe Vorlagemengen nachzuweisen, ohne jedoch unspezifische Produkte zu amplifizieren. Das entstehende PCR-Produkt sollte den 5'-Bereich des Transkriptes mit dem Startcodon des offenen Leserahmens (engl. „Open Reading Frame“, im Folgenden „ORF“ bezeichnet) sowie einen Teil der 5'-UTR enthalten. Dabei hängt die Länge der 5'-UTR vom Erfolg der reversen Transkription ab. Diese wiederum hängt stark von der Qualität der mRNA und der verwendeten reversen Transkriptase ab. Am besten geeignet waren die thermostabile Superscript™ II und III reverse Transcriptase von Invitrogen (s. Kap. 2.2.6).

A) 3'RACE



B) 5'RACE

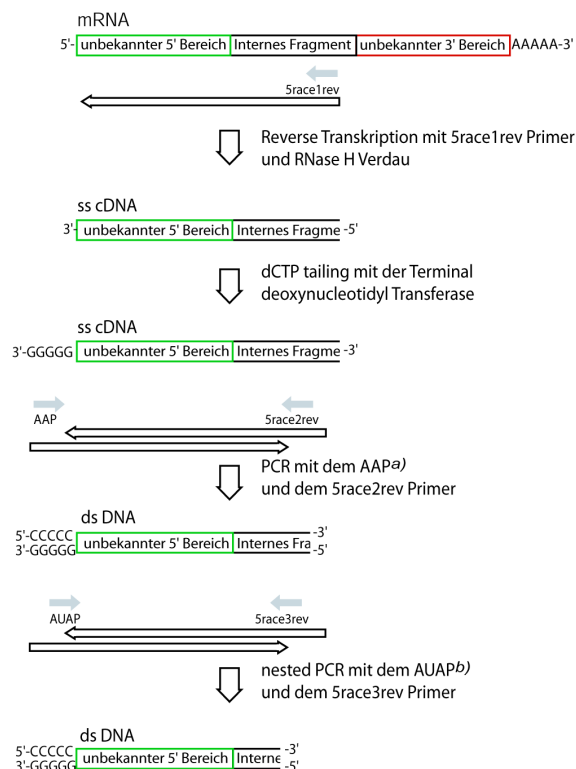


Abb. 2.1. Prinzip der „Rapid Amplification of cDNA Ends“ Technik. A. 3'-RACE B. 5'- Technik, mit den Abkürzungen AAP für Abridged Anchor Primer und AUAP für Abridged Universal Amplification Primer, ss cDNA für einzelsträngige (engl. „single stranded“) cDNA und ds cDNA für doppelsträngige (engl. „double stranded“) cDNA.

Die für die Durchführung der RACE-Technik nötigen genspezifischen RACE-Primer wurden anhand der aus der DOP-PCR (s. Kap. 2.2.8) bekannten internen Fragmente entworfen. Pro Sequenz wurde ein 3'-RACE forward Primer und drei 5'-RACE reverse Primer benötigt.

Generell wurden für die RACE-PCR die *Taq* DNA-Polymerase (Invitrogen), die Platinum *Pfx* (Invitrogen) oder die AccuTaqTMLA (Sigma) verwendet. Die PCR-Reaktionen in einem Gesamtvolumen von 25 μ l enthielten neben den Pufferbestandteilen nach Angaben der jeweiligen Hersteller Primer in einer Endkonzentration von 0,4 bis 0,8 μ M sowie 1,0 bis 2,0 μ l Vorlage. Als Temperaturprogramme kamen die bereits unter Kap. 2.2.7 beschriebenen Hot-start- und touch-down Programme zum Einsatz. Die PCR-Produkte wurden routinemäßig zur Sequenzierung gereinigt (QIAEX II Kit), in pGEM[®]-T Easy Vector (Promega) ligiert und in *E. coli* TOP10-Zellen transformiert (s. 2.2.9). Positive Klone wurden durch Restriktionsanalysen der Plasmid-DNA identifiziert (s. Kap. 2.2.10).

2.2.12. Amplifizierung des offenen Leserahmens für die heterologe Expression in *E. coli*

Durch die DOP-PCR (s. Kap. 2.2.8) sowie die 3'- und 5'-RACE-PCRs (s. Kap. 2.2.11) konnte die Sequenz des gesamten Transkriptes zusammengesetzt werden. Auf der Basis dieser Sequenzen, die auch den 3'- und 5'-UTR beinhalten, wurden Primer für die Amplifizierung des kodierenden Bereiches (engl. open reading frame, ORF) und für eine anschließende Expression in einem geeigneten Expressionssystem entworfen. Dazu enthielten diese genspezifischen Expressionsprimer Restriktionsschnittstellen für die nachfolgende Klonierung der PCR-Produkte in entsprechende Expressionsvektoren.

Als Expressionssystem wurde das pET-System (Novagen) gewählt, das ursprünglich von Studier et al. (1990) entwickelt wurde. Angrenzend an die Insertionsstelle (engl. „multicloning-site“) beinhalten die pET-Vektoren Sequenzen, die verschiedene Peptide (engl. „peptide-tags“) kodieren, welche an das C- oder N-terminale Ende der Fremd-DNA angefügt werden können. Dadurch können den überexprimierten Proteine, kodiert durch die Fremd-DNA, zusätzliche, für nachfolgende Anwendungen erforderliche Eigenschaften hinzugefügt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden das Anfügen eines Histidin-Restes, bestehend aus 6 aufeinander folgenden Histidin-Aminosäuren, ausgewählt. Dieser Histidin-Rest, im Folgenden als 6xHis-tag bezeichnet, ermöglichte die Reinigung der rekombinanten Proteine über Metallchelataffinitätschromatographie, dazu näheres unter Punkt 2.3.1. Benutzt wurden die Vektoren pET28a, ein modifizierter pET28a(mod*Pst*I) Vektor und der pET22b/pET23a Vektor. Letzterer ist ein Mischkonstrukt aus den Plasmiden pET22b und pET23a, wobei die multiple Klonierungsstelle von pET22b in den pET23a-Vektor transferiert wurde. Im Vektor pET28a(mod*Pst*I) wurde eine *Nco*I-Schnittstelle gegen eine *Pst*I-Schnittstelle ausgetauscht. pET22b/pET23a ermöglichte das Einfügen eines C-terminalen 6xHis-tag, wohingegen pET28a sowie pET28a(mod*Pst*I) das Einfügen eines N- oder C-terminalen 6xHis-tags erlaubte. Bei der Herstellung der C-terminalen 6xHis-tag-Konstrukts war auf den korrekten Leserahmen des 5'-Startcodons und der am 3'-Ende codierenden 6xHis-tag Sequenz zu achten. Darüber hinaus durfte das Stoppcodon der einzufügenden cDNA nicht in den Vektor kloniert werden. Bei einem N-terminalen 6xHis-tag Konstrukt dagegen konnte das Stoppcodon des zu klonierenden Fragments in der Sequenz belassen werden, jedoch musste ein Vektor-kodiertes Startcodon für die Initiation der Expression verwendet werden, wobei auch hier auf den korrekten Leserahmen zu achten war.

Die eigentliche Expression erfolgte in *E. coli*-BL21(DE3) (Stratagene) Zellen. Diese Zellen besitzen eine chromosomale Kopie der T7 RNA-Polymerase unter Kontrolle des *lacUV5*. Die Transkription der rekombinanten cDNA auf den pET Expressions-Plasmiden wird durch die Induktion der Expression der T7 RNA-Polymerase durch IPTG im Wirtstamm eingeleitet. Dabei besitzt der pET28a-Vektor einen kombinierten T7/lac-Promoter, wodurch die Expression der rekombinanten cDNA unter doppelter Kontrolle steht. Dadurch wird die Expressionshöhe im nicht induzierten Zustand der Zellen reduziert. Generell ist eine gewisse basale Expression zu beobachten, vor allem bei Vektoren die nur einen einfachen T7-Promotor besitzen, wie etwa pET22b/pET23a. Aufgrund der schlechten Transformationsraten von *E. coli*-BL21-Zellen wurde eine Zwischen-Klonierung in *E. coli*-TOP10-Zellen durchgeführt, die jedoch auch der Vervielfältigung der Plasmid-DNA diene. Generell ist die Plasmid-Stabilität in *E. coli*-TOP10-Zellen höher als in BL21-Zellen. Darüber hinaus besitzen *E. coli*-TOP10-Zellen keine T7 RNA-Polymerase, wodurch es zu keiner Expression der eventuell für die Wirtszellen toxischen rekombinanten Gene kommt. Konnten positive Klone in *E. coli*-TOP10-Zellen etabliert werden, erfolgte die Transformation der aus ihnen isolierte Plasmide in *E. coli*-BL21-Zellen und die heterologe Expression in LB-Flüssigkulturen durch Induktion mit IPTG.

Zur weiteren Vorgehensweise:

Der gesamte ORF der jeweiligen cDNA wurde mit den entsprechenden Primern (jeweils 0.4 µM) und den DNA-Polymerasen *Pfu* (Promega), Platinum *Pfx* (Invitrogen) oder AccuTaqTMLA (Sigma) amplifiziert. Alle drei Polymerasen besitzen eine Korrekturlesefunktion durch eine 3'-5' Exonukleaseaktivität (engl. „*proof-reading*“). Die Fehlerraten dieser Polymerasen sind geringer als bei Enzymen ohne dieser Korrekturlesefunktion, wie etwa der *Taq* DNA-Polymerase. Die fehlerfreie PCR-Amplifikation war besonders für die nachfolgende heterologe Expression Grundvoraussetzung. Polymerase-Puffer, dNTPs und Salze (MgCl₂, MgSO₄) wurden jeweils nach Angaben der Hersteller verwendet. Standardmäßig kam das „Hot-start“ Temperaturprogramm zum Einsatz. Neben einer konstanten Primer-Annealing-Temperatur wurde auch das „touch-down“ Temperaturprogramm verwendet (s. Kap. 2.2.7). Als Vorlage wurde 1,0 µl der mit dem oligo-dT-Primer umgeschriebenen cDNA (s. Kap. 2.2.6) verwendet. Die PCR-Produkte wurden anschließend mit *NdeI-XhoI*- bzw. *PstI-XhoI* verdaut und in den mit *NdeI-XhoI*- oder *PstI-XhoI* linearisierten Vektor mit Hilfe der T4 DNA-Ligase (Invitrogen) ligiert. Nach der Transformation der Konstrukte in

E. coli-TOP10-Zellen wurden die positiven Klone durch Restriktionsanalysen der Plasmid-DNA ermittelt. Für die Überexpression wurde von jeder Probe ein positives Konstrukt gewählt und in die eigentlichen Expressionszellen *E. coli*-BL21(DE3) transformiert. Von den positiven *E. coli*-TOP10-Klonen sowie den *E. coli*-BL21(DE3)-Expressionsklonen wurden Dauerkulturen (s. Kap. 2.2.2.4) angelegt. Eine korrekte Ligation und die Anknüpfung des 6xHis-tags wurde durch Sequenzierung des Konstrukts überwacht. Dazu erfolgte, wie bereits erwähnt (2.2.10), die Isolierung der Plasmid-DNA mit Hilfe des Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System aus den *E. coli*-TOP10-Klonen. Diese Sequenzen, resultierend aus einer PCR-Amplifikation mit proof-reading DNA-Polymerasen, wurden in späteren phylogenetischen Analysen verwendet.

Bei manchen Klonierungen stellte die Ligation in den linearisierten Vektor den schwierigsten Schritt dar. Oft erwiesen sich nach der Transformation die auf den LB-Platten gewachsenen *E. coli* TOP10-Klone als negativ – die Plasmid-DNA enthielt keine Insertion. Das konnte möglicherweise aus einer Selbstligation des Vektors resultieren. Um diesen Schritt zu unterbinden, wurde in manchen Fällen der Vektor nach der Linearisierung dephosphoryliert. Dieser Strategie liegt das Prinzip zugrunde, dass die DNA-Ligase zwei DNA-Stränge über eine Phosphor-Esterbindung verknüpft und dazu eine 5' Phosphat- und 3'-OH-Gruppe benötigt. Wird der Phosphatrest am 5'-Ende des linearisierten Vektors entfernt, steht für die Ligation nur die 5'-Phosphat-Gruppe der Fremd-DNA zur Verfügung und die Selbstligation des Vektors wird verhindert. Für die Dephosphorylierung des Vektors wurde die Calf Intestine Alkaline Phosphatase (CIAP) von Fermentas verwendet. Dieser nach Angaben des Herstellers dephosphorylierte Vektor konnte nach Hitzeinaktivierung des Enzyms direkt für die Ligation eingesetzt werden.

2.2.13. Heterologe Expression der rekombinanten Proteine in *E. coli*

Nach der Transformation der Expressionskonstrukte in die *E. coli* BL21(DE3)-Zellen wurden die transformierten Zellen in flüssigem LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum als Selektionsmarker (Ampicillin bei pET23a, Kanamycin bei pET28a) bei 37°C und schütteln (230 Upm) kultiviert, bis eine optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,4 bis 1,0 erreicht war. An diesem Punkt wurde die Expression des gewünschten Proteins mit 0.5 M Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid IPTG (Endkonzentration 1 mM bei pET28a mit T7/lac Promotor, 0,4 mM bei pET23a mit T7 Promotor) induziert und die Bakterienkulturen für

weitere 4 bis 6 Stunden bei den oben angegebenen Bedingungen kultiviert. Anschließend wurden die Zellen durch Zentrifugation geerntet und bis zur weiteren Aufarbeitung bei -80°C gelagert. (s. Kap. 2.3.1).

2.2.14. Isolierung genomischer DNA

Zur Isolierung genomischer DNA wurden verschiedene Kits gewählt: das DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) im Fall von *I. neei* und *I. hederifolia*, für die Versuchspflanze *P. laevigata* das DNAzol® reagent von Invitrogen und im Fall von *I. alba*, *I. purpurea* und *C. arvensis* das NucleoSpin® Plant II Kit von Macherey-Nagel. Zur Aufschließung der Zellen wurde das Pflanzenmaterial unter flüssigen Stickstoff mit Mörser und Pistill zu einem feinen Pulver zermahlen. Anschließend erfolgte die Isolierung der genomischen DNA nach den Angaben der jeweiligen Hersteller. Quantifiziert wurde die genomische DNA UV-photometrisch wie bereits unter Punkt 2.2.4 beschrieben.

2.2.15. Amplifikation genomischer DNA

Zur Ermittlung der genomischen Organisation der hier untersuchten *hss* und *dhs* Gene wurde eine PCR mit genomischer DNA der Versuchspflanze als Vorlage durchgeführt. Als Primer kamen die für die Expression entworfenen, genspezifischen Primer zum Einsatz (s. Kap. 2.2.12). Für die PCR wurde 200 ng genomische DNA in einer 25 µl Reaktion mit der AccuTaq™ LA DNA-Polymerase (Sigma) amplifiziert. Diese DNA-Polymerase eignet sich besonders für PCR mit genomischer DNA und der Amplifikation langer Produkte.

Die PCR-Parameter waren wie folgt:

	<i>Standard PCR</i>			<i>touch-down PCR</i>		
Initiale Denaturierung	98°C	30 s		98°C	30 s	
Denaturierung	94°C	10 s		94°C	10 s	
Annealing ^{a)}	x°C	30 s		x°C	30 s	
				-0,5°C/Zyklus		
Elongation	68°C	20 min	35 - 40 Zyklen	68°C	20 min	20 Zyklen
Elongation	68°C	20 min		94°C	10 s	
				x°C	30 s	
				68°C	20 min	15 - 20 Zyklen
				68°C	20 min	

^{a)} Die Primer Annealing Temperatur (x°C) wurde je nach Primer angepasst.

Die PCR-Produkte wurden in den pCR[®]-XL-TOPO[®] Vector oder in den pGEM-T[®] Easy Vector kloniert und in chemisch kompetente *E. coli*-TOP10-Zellen transformiert (s. Kap. 2.2.9). Nach der Selektion der Klone auf LB-Platten mit entsprechendem Antibiotikum wurde für Restriktionskontrollen vorerst die Plasmid-DNA mit Hilfe der „rapid boiling“-Methode isoliert (2.2.10). Daran anschließend wurde für die Sequenzierung aus ausgewählten Klonen nochmals die Plasmid-DNA mit Hilfe des Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System isoliert (2.2.10).

2.2.16. Inverse PCR

Die inverse PCR ist eine Methode, mit der man unbekannte Sequenzabschnitte, die im Genom ober- oder unterhalb einer bekannten Sequenz liegen, amplifizieren kann. In Abb. 2.2 ist das Prinzip der inversen PCR schematisch dargestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Methode zur Amplifizierung des 5'-Bereichs des *hss*-Gens aus *I. neei* verwendet. Dazu wurde genomische DNA mit dem Restriktionsenzym *KpnI* verdaut. *KpnI* besitzt eine Schnittstelle innerhalb des bereits bekannten Sequenzabschnittes des *hss*-Gens, 313 bp vom 5' Ende. In diesem Restriktionsverdau wurde 1 µg DNA eingesetzt und für 2 Stunden bei 37°C mit dem Enzym in entsprechenden Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl inkubiert. Nach der Hitzeinaktivierung des Enzymes wurden die dabei entstandenen Fragmente intramolekular mit Hilfe der T4 DNA-Ligase ligiert. Eine niedrige DNA Konzentration im Reaktionsansatz sorgte dafür, dass die Fragmente vorzugsweise mit sich selbst ligierten. Dazu wurde der Restriktionsansatz auf 250 µl verdünnt. Dementsprechend wurden 50 µl 5x T4 DNA Ligase-Puffer und 6 units an Ligase eingesetzt. Dieser Schritt erzeugte ringförmige DNA-Moleküle. Diese wurden durch Ethanol-Fällung mit 125 µl 7,5 M NH₄OAc und 750 µl 100 % EtOH für 20 Minuten bei -20°C gefällt. Die gefällte DNA wurde durch Zentrifugieren abgetrennt und nach einem Waschschrift mit 500 µl 70 % EtOH in 25 µl Tris-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8) gelöst. Nachfolgend wurden diese ringförmigen DNA-Moleküle als Vorlage in einer PCR verwendet. Die Primer für diese PCR wurden so gelegt, dass sie oberhalb der *KpnI* Schnittstelle am 5'-Ende der bekannten Sequenz binden. Diese Primer waren jedoch voneinander weg orientiert (s. dazu Abb. 2.2). Durch PCR mit dem Standard „Hot-start“-Temperaturprogramm (s. Kap. 2.2.7.) und der AccuTaq[™] LA DNA-Polymerase wurde ein Produkt amplifiziert, dessen innere Region die unbekannt Sequenzen enthält. Dieses PCR-Produkt wurde in den pCR[®]-XL-TOPO[®] Vector kloniert

(s. Kap. 2.2.9), die Plasmid-DNA isoliert und durch Restriktionsanalysen (s. Kap. 2.2.10). untersucht.

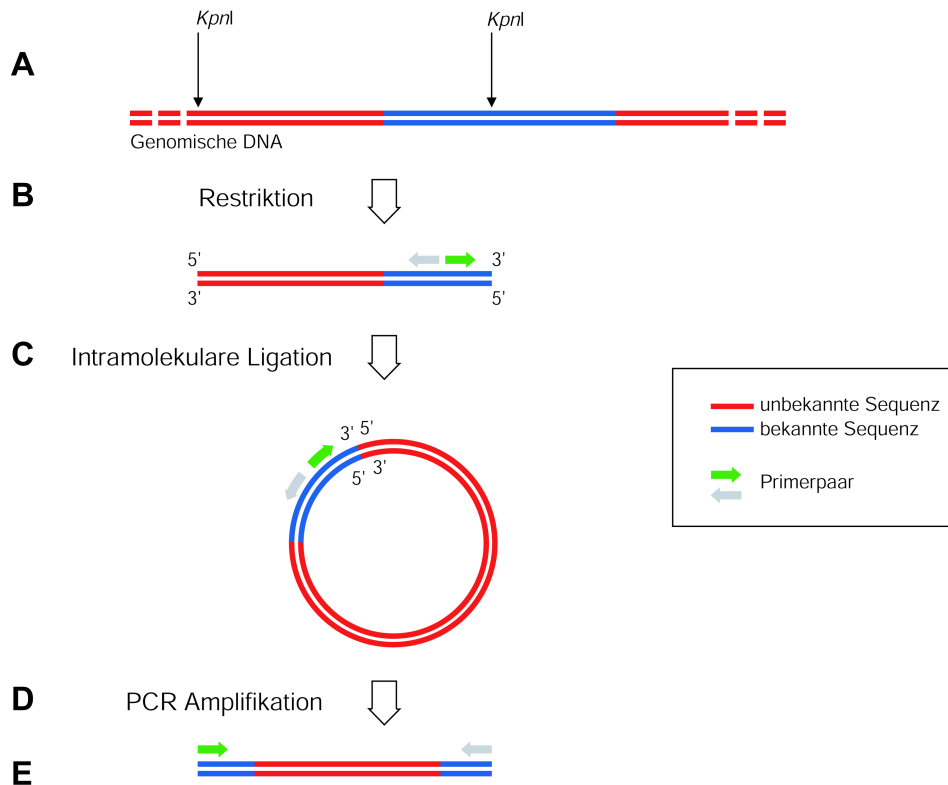


Abb. 2.2. Das Prinzip der inversen PCR. In diesem Schema wird die Amplifizierung einer unbekannt genomischen Sequenz im 5'-Bereich eines bekannten DNA-Abschnittes durch inverse PCR dargestellt, wie sie im Rahmen dieser Arbeit angewendet wurde. **A.** Ausgehend von einer bekannten Sequenz werden geeignete Restriktionsenzyme ausgewählt. Die Schnittstellen sollten nahe des 5'-Endes der bekannten Sequenz liegen. **B.** Die genomische DNA wird einem Restriktionsverdau unterworfen. **C.** Anschließend werden die Restriktionsfragmente intramolekular ligiert. **D.** Die ringförmigen DNA-Moleküle können als Vorlage in einer PCR eingesetzt werden. Die genspezifischen Primer sind jedoch von einander weg orientiert. **E.** Das PCR-Produkt enthält die unbekannte Sequenz flankiert von den bereits bekannten Sequenzabschnitten.

2.2.17. DOP-PCR mit genomischer DNA aus PA-freien Convolvulaceae Arten

Analog zu Kap. 2.2.8 wurden in einem weiteren Ansatz zur Identifizierung möglicher *hss*- und *dhs*-Gene in Convolvulaceen-Arten, die keine PAs produzieren, DOP-PCR angewandt. Allerdings wurden hier anstelle der cDNA, genomische DNA als Vorlage verwendet. In Standard-PCRs mit einem Reaktionsvolumen von 25 µl wurden unterschiedliche Kombinationen degenerierten Primer verwendet. Als DNA-Polymerase wurde die besonders für die Amplifikation langer DNA-Fragmente geeignete AccuTaq™ LA DNA-Polymerase (Sigma) verwendet. Als Vorlage kamen jeweils 200 ng genomischer DNA zum Einsatz. Die verwendeten Temperatur-Programme entsprechen den unter Kap. 2.2.15 angegebenen Pro-

grammen. Die Klonierung der PCR-Produkte erfolgte in pCR[®]-XL-TOPO[®] Vector, wie unter Kap. 2.2.9 beschrieben. Die Analyse der positiven Klone mit Hilfe von Restriktionskontrollen der Plasmid-DNA und die Sequenzierung ausgewählter Klone erfolgte analog zu Kap. 2.2.10.

2.2.18. Semiquantitative reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Mit Hilfe der RT-PCR wurde die Expression der HSS und DHS in verschiedenen Pflanzenorganen auf transkriptioneller Ebene untersucht. Dazu wurde in einem ersten Schritt Gesamt-RNA aus den gewünschten Geweben, wie unter Kap. 2.2.3 beschrieben, isoliert und quantifiziert (s. Kap. 2.2.4). Es folgte ein Verdau mit DNase I (Invitrogen), um eine Kontamination mit genomischer DNA zu vermeiden. Anschließend erfolgte die cDNA Synthese mit dem Oligo(dT)₁₇ Primer (s. Kap. 2.2.6). Als reverse Transkriptasen kamen die RevertAid[™] H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase oder die Superscript[™] II Reverse Transcriptase zum Einsatz. Bei den unterschiedlichen Pflanzenarten erwiesen sich unterschiedliche Reverse Transkriptasen als optimal. Im Anschluss an die cDNA-Synthese erfolgte ein Verdau der mRNA durch RNase H (Invitrogen), da diese die nachfolgende PCR nachteilig beeinflussen kann. Die so behandelte cDNA diente als Vorlage in den nachfolgende PCR-Reaktionen, um die Transkripte mit Hilfe entsprechender gen-spezifischer Primer in den unterschiedlichen Pflanzenorganen nachzuweisen. Als Standard-Temperaturprogramm kam das unter Kap. 2.2.7 genannte Hot-start PCR-Programm zum Einsatz. Dabei wurde eine konstante Annealing-Temperatur von 55°C gewählt. Die Amplifikation erfolgte mit der *Taq* DNA-Polymerase in einem Reaktionsvolumen von 25 µl. Pufferbestandteile, MgCl₂ und dNTPs wurden nach Angaben des Herstellers eingesetzt. Als Vorlage wurde routinemäßig 1,0 µl cDNA verwendet, in detaillierten Experimenten wurden cDNA allerdings mit Hilfe des NanoDrop[®] ND-1000 Spektrometer quantifiziert (s. Kap. 2.2.4) und eine definierte Menge von 50 ng cDNA als Vorlage verwendet. Primer wurden in einer Endkonzentration von 0,8 µM eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden in einem 1,5% igen Agarose-Gel aufgetrennt und analysiert (s. Kap. 2.2.5).

2.2.19. DNA-Sequenzierung

Von ausgewählten Klonen wurde 1 µg der mittels dem Wizard® *Plus* SV Minipreps DNA Purification System (Promega) gereinigten Plasmid-DNA bei MWG Biotech AG, Sequencing Service (D-82152 Martinsried, Germany) sequenziert. Standardmäßig wurden für die Sequenzierung Primer verwendet, die an Sequenzen, welche die multiple Klonierungsstelle der jeweiligen Vektoren flankieren, binden. Dies bedeutet, für pET-Vektoren wurden die T7-Promotor- und T7-Terminator-Primer verwendet, für den pGEM-T® Easy Vector und pCR®-XL-TOPO® Vector die M13-forward und M13-reverse Primer. Bei langen zu sequenzierenden DNA-Fragmenten (>1,2 kb) konnte aufgrund der begrenzten Leseweise der Sequenzierreaktion (700-800 bp) die Sequenz nicht vollständig aufgeklärt werden. In diesem Falle wurden sequenzspezifische interne Primer für die Sequenzierreaktion verwendet. Diese Primer wurden direkt bei MWG synthetisiert und bei der Sequenzierung eingesetzt. Die Primer wiesen, bei einer Berechnung von +2°C für die Basen Adenosin und Thyminid und +4°C für Guanosin und Cytosin, eine Schmelztemperatur von 52-56 C auf.

2.2.20. Oligonukleotide

Sämtliche in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden bei MWG Biotech AG, Sequencing Service (D-82152 Martinsried, Germany) hergestellt. Gelagert wurden Stammlösungen der Oligonukleotide in einer Konzentration 100 pmol/µl (100 µM) in Tris-Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 8) bei -20°C. Für die PCR und cDNA-Synthese wurden 1:10-Verdünnungen verwendet (10 µM), welche bei 4°C gelagert wurden. Die Sequenzen der verwendeten Primer sind in der Tabelle 1 im Anhang aufgelistet. Hervorzuheben ist die Verwendung von Inosin bei manchen degenerierten Primern. Inosin ermöglicht eine Basenpaarung zu allen vier Nukleotiden Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin. Dadurch kann eine stark variierende Position mit Inosin besetzt werden. Die Degeneriertheit des Primers wird dadurch gering gehalten.

2.2.21. DNA-Sequenzanalysen und phylogenetische Analysen

Sequenzchromatogramme wurden mit dem Programm Chromas 2.3 (Copyright 1998-2004 Technelysium Pty Ltd) bearbeitet. Als Software zur generellen Analyse der Sequenz-

daten kam das Wisconsin Package of Genetics Computer Group (GCG Version 11.1, Accelrys Inc., San Diego, CA) zum Einsatz.

Alignments der HSS- und DHS-kodierenden cDNA Sequenzen wurden auf der Basis ihrer Nukleinsäuren und der abgeleiteten Aminosäuren nach dem Clustal X (Thompson et al. 1997) Algorithmus und mit Hilfe des Programms Bioedit 7.0.5.3 (Hall 1999) erstellt. Bei der Einfügung von Lücken wurden die Alignments hinsichtlich der Korrektheit des Leserahmens korrigiert. Die Alignments bildeten einerseits die Grundlage für den Entwurf degenerierter Primer, andererseits stellten sie die Basis für phylogenetische Untersuchungen dar.

Die phylogenetischen Analysen wurden mit PAUP* (Phylogenetic Analysis Using Parsimony) Version 4.0b10 (Swofford 1999) durchgeführt. „Maximum Parsimony“ (MP) Bäume sowie „Maximum Likelihood“ (ML) Bäume wurden mit Hilfe einer heuristischen Suche berechnet. Dabei wurde die Option „Tree Bisection-Reconnection“ (TBR) mit 1000 Wiederholungen und zufällig hinzugefügten Taxa (addseq=random) verwendet. Alle „characters“ wurden als „nicht gewichtet“ bewertet. Lücken (engl. „gaps“) wurden als nicht vorhandene Charakter (missing data) gewertet. Um die optimalen Parametereinstellungen und das Substitutionsmodell für die ML-Berechnung auszuwählen, wurde das Programm Modeltest (Posada und Crandall 1998) verwendet, welches in der Software PaupUp, Version 1.0.3.1. (Calendini und J.-F 2005), implementiert ist (Knoop und Müller 2006).

Um die „robustness“ der Bäume abzuschätzen, wurden bootstrap-Werte für 10.000 Wiederholungen durch eine weitere heuristische Suche mit der Option TBR berechnet, wobei hier die Taxa mit dem so genannten „simple“ Algorithmus addiert wurden. Gemeint ist hierbei der „Stepwise-addition-Algorithmus“, der die Reihenfolge steuert, in der die Taxa addiert werden. Durch die langen Rechenzeiten bei ML-Analysen wurden als Alternative zu den bootstrap-Werten die Methode des „Quartett puzzling“ (Strimmer und von Haeseler 1996) angewandt, um die robustness der Zweige zu ermitteln. Dazu wurde das Programm Tree-Puzzle 5.2. (Schmidt et al. 2002) verwendet (Knoop und Müller 2006).

Die Analysen hinsichtlich einer möglichen positiven Selektion wurden mit der PAML (Phylogenetic Analysis by Maximum Likelihood) Software, Version 4.1 (Yang 2007) durchgeführt. Angewendet wurde die CODEML Funktion der Software. Der Berechnung zugrunde liegt ein Vergleich der synonymen (stillen) und nicht-synonymen Substitutionsraten in proteinkodierenden Sequenzen. Synonyme Substitutionen sind für die natürlich Selektion

tion sozusagen nicht sichtbar. Hingegen befinden sich nicht-synonyme Substitutionen, die mit einem Aminosäureaustausch einhergehen, unter starkem Selektionsdruck. Durch Vergleiche der Häufigkeit beider Substitutions-Typen kann der Effekt der natürlichen Selektion auf die molekulare Sequenzevolution ermittelt werden.

Berechnet wird die „nonsynonymous/synonymous rate ratio“ ω mit:

$$\omega = d_N/d_S.$$

Dabei gilt: d_N Anzahl der nicht-synonymen Substitutionen pro nicht-synonymer Position (engl. „site“)

d_S Anzahl der synonymen Substitutionen pro synonymer Position

Der d_N/d_S -Wert bzw. ω -Wert gilt demnach als Indikator für den Selektionsdruck auf eine proteinkodierende Sequenz. Ein ω -Wert gleich 1 spricht für neutrale Mutationen, $\omega < 1$ für stabilisierende Selektion (engl. „purifying selection“) bzw. starkem Selektionsdruck. Positive Selektion wird durch $\omega > 1$ detektiert (Yang et al. 2000; Yang und Nielsen 2002).

Die Berechnung der ω -Werte erfolgte im Rahmen dieser Arbeit durch das sogenannte „branch-site Modell A“ (Yang und Nielsen 2002; Zhang et al. 2005). Es ermöglicht den Nachweis positiver Selektion auf einzelne Positionen innerhalb einer Verwandtschaftslinie bzw. eines Zeitabschnittes. Frühere Modelle ermöglichten es nur, entweder Verwandtschaftslinien oder eine bestimmte Auswahl an Positionen bezüglich positiver Selektion zu überprüfen. Diese Modelle, das „branch model“ (Yang 1998) und das „site model“ (Yang et al. 2000), waren wenig aussagekräftig, da positive Selektion oft nur auf wenige Aminosäuren und oft auch nur innerhalb eines bestimmten Zeitabschnittes wirkt. Durch das „branch-site Modell A“ werden beide Kriterien berücksichtigt. Dadurch ist dieses Modell aussagekräftiger und sensitiver in der Detektion von positiver Selektion als die früheren Modelle (Zhang et al. 2005).

Voraussetzung für die Anwendung des „branch-site Modells A“ war ein Alignment und ein phylogenetischer Stammbaum. Das angewendete Alignment enthielt die HSS- und DHS-kodierenden cDNA-Sequenzen aus den Convolvulaceae. Als Baum kam ein mit Hilfe von PAUP erstellter „Maximum Parsimony“-Baum zur Anwendung. Lücken im Alignment wurden in den Berechnungen als „missing data“ gewertet und nicht interpretiert. An diesem

Stammbaum mussten *a priori* Zweige definiert werden, für die eine mögliche positive Selektion untersucht werden sollte. An diesen Zweigen, den sogenannten „foreground branches“, ist positive Selektion erlaubt ($\omega_2 > 1$). Alle anderen Zweige des Baums, die sogenannten „background branches“, können nach dem Modell A nur unter stabilisierender oder neutraler Selektion stehen ($0 < \omega_0 < 1$ und $\omega_1 = 1$). Insgesamt werden bei diesem Modell vier Klassen an „sites“, also Positionen, unterschieden. Die Klasse 0 beinhaltet über den ganzen Baum konservierte Codons mit einem geschätzten ω_0 von $0 < \omega_0 < 1$. Die Klasse 1 beinhaltet Codons, die über den gesamten Baum neutral evolvieren mit $\omega_1 = 1$. Die beiden Klassen 2a und 2b stellen jene Codons dar, die in den „background branches“ konserviert sind ($0 < \omega_0 < 1$) oder neutral evolvieren ($\omega_1 = 1$), in den „foreground branches“ aber positive Selektion zeigen ($\omega_2 > 1$). Das Modell berechnet den Anteil der konservierten Positionen p_0 und deren ω_0 Wert. Ebenso wird der Anteil der neutralen Positionen p_1 mit fixierten $\omega_1 = 1$ und ω_2 der Positionen unter positiver Selektion abgeschätzt (Zhang et al. 2005). In Tab. 2.2 sind die Parameter des „branch-site Modell A“ zusammengefasst.

Tab. 2.2 Branch-site Modell A nach Zhang et al. (2005).

<i>Site class</i>	<i>Anteil p</i>	<i>Background branch</i>	<i>Foreground branch</i>
0	P_0	$0 < \omega_0 < 1$	$0 < \omega_0 < 1$
1	P_1	$\omega_1 = 1$	$\omega_1 = 1$
2a	$(1 - p_0 - p_1) p_0 / (p_0 + p_1)$	$0 < \omega_0 < 1$	$\omega_2 > 1$
2b	$(1 - p_0 - p_1) p_0 / (p_0 + p_1)$	$\omega_1 = 1$	$\omega_2 > 1$

Im Modell A enthalten ist eine „Bayes Empirical Bayes“ (BEB) Analyse (Yang et al. 2005) zur Kalkulation der „posterior probabilities“ der einzelnen Positionen, die unter positiver Selektion stehen. Für einen tatsächlichen Hinweis auf positive Selektion sollte die posterior probability/site $\geq 95\%$ sein (Zhang et al. 2005).

Zur Überprüfung, ob das „Branch-Site Modell A“ dem Datensatz aussagekräftig erklärt, wurde es mit einem weniger komplexen Modell (Nullhypothese) verglichen. Dazu wurde der „log-likelihood ratio Test“ (LRT) verwendet.

Dabei gilt:

LRT	$2 \times \Delta \ln L$	bzw.	$2 \times (\ln L_0 - \ln L_1)$
$\ln L_0$	Likelihood Wert der Nullhypothese		
$\ln L_1$	Likelihood Wert des alternativen Modells		

Als Nullhypothese diente ein Modell, bei dem die „nonsynonymous/synonymous rate ratio“ ω_2 mit $\omega_2=1$ als fixiert angenommen wurde, bezeichnet als Test 1. Dieses Modell erlaubt Positionen, die in den „background branches“ unter starker stabilisierender Selektion stehen, in den „foreground branches“ allerdings eine neutrale Evolution zeigen. Das Modell berücksichtigt somit eine Reduzierung des selektiven Druckes in den „foreground branches“, erlaubt jedoch keine positive Selektion in den „foreground branches“. Der Vergleich beider Modelle ermöglicht somit eine direkte Überprüfung, ob tatsächlich positive Selektion oder Reduzierung des selektiven Druckes vorkommt (Zhang et al. 2005). Zusätzlich wurde das „site model M1a“ (Yang et al. 2000; Zhang et al. 2005) als Nullmodell verwendet, bezeichnet als Test 2. Dieses Modell nimmt nur zwei Klassen an Nukleotiden bzw. Positionen an, mit $0 < \omega_0 < 1$ und $\omega_0=1$ in allen Zweigen. Bei einer signifikanten Unterstützung für das branch-site Modell A kann diese entweder durch einen reduzierten selektiven Druck oder durch positive Selektion in den foreground branches entstehen.

Die Signifikanz des LRT-Tests wurde mit Hilfe der kritischen Werte (P-Werte) bestimmt, wobei eine χ^2 -Verteilung verwendet wurde. Bei Test 1, in dem sich das zu testende Modell durch einen zusätzlichen Parameter ($\omega_2 > 1$) vom Nullmodell (ω_2 mit 1 fixiert) unterscheidet, wurde eine χ^2 -Verteilung mit einem Freiheitsgrad (degree of freedom, df) verwendet. Hingegen bei Test 2 kam die χ^2 -Verteilung mit zwei Freiheitsgraden zum Einsatz, da das alternative Modelle im Vergleich zum Nullmodell zwei zusätzliche Parameter enthält (p_2 und ω_2). Berechnet wurden die P-Werte wurden mit Hilfe der PAML Software (Funktion CHI2). Generell gilt: ist der berechnete Wert des LRT-Tests größer als der kritische Wert, dann wird das Nullmodell abgelehnt. Als statistisch signifikant gelten Ergebnisse aus den LRT-Tests mit P-Werten von $\leq 0,05$, entsprechend einem Signifikanzniveau von 5 %.

2.3. Proteinchemische Methoden

2.3.1. Reinigung rekombinanter Proteine über Affinitätschromatographie

Die heterolog in *E. coli* exprimierten Proteine wurden mit Hilfe der Affinitätschromatographie gereinigt. Es kamen dabei native Bedingungen zum Einsatz. Dadurch konnten die gereinigten Proteine in nachfolgenden biochemischen Assays charakterisiert werden.

Das Prinzip der Reinigung der so genannten 6xHis-tagged Proteine (s. Kap. 2.2.12) basiert auf der selektiven Bindung der sechs konsekutiven Histidin-Bausteine an immobilisierte, zweiwertige Metall-Ionen der Affinitätsmatrizen (Immobilisierte Metall(ionen)-Chelat-Affinitätschromatographie, IMAC). Im Rahmen dieser Arbeit hat sich die Nickel-Nitrilotriacetic Acid (Ni-NTA) Metall-Affinitätschromatography-Matrix von Qiagen als besonders geeignet erwiesen. Die Vorgehensweise zur Reinigung erfolgte hauptsächlich nach den Angaben des Herstellers, zusammengefasst im Handbuch des QIAexpress® Systems „The QIAexpressionist“.

Standardmäßig wurden die rekombinanten Proteine im Rahmen dieser Arbeit durch eine sogenannte „batch“ Methode unter Verwendung der Ni-NTA-Matrix gereinigt. Hierzu wurde das 6xHis-tagged-Protein in Lösung an die Ni-NTA-Matrix gebunden und der Protein-Matrix Komplex für die nachfolgenden Wasch- und Elutionsschritte in eine Säule gepackt.

Zur Vorgehensweise:

Die induzierten und durch Zentrifugation vom Medium abgetrennten *E. coli* BL21(DE3)-Zellen wurden in Lysispuffer durch Ultraschall auf Eiswasser aufgeschlossen. Verwendet wurde ein Branson Sonifier II W-250, mit Standard-Mikrotip, 3 mm Durchmesser. Alternativ erfolgte zusätzlich ein Vorverdau der Zellen mit Lysozym (1 mg/ml) unter Schütteln bei 26°C für 15 Minuten. Nach einem Zentrifugationsschritt zur Entfernung der Zelltrümmer wurde der Überstand mit der Ni-NTA-Matrix für 60 Minuten bei 4°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Dadurch wurde die Bindung des rekombinanten Proteins über den 6xHis-tag an die Matrix ermöglicht. Nicht gebundene Proteine und andere Bestandteile wurden entfernt, indem zuerst der Überstand plus Matrix mit dem gebundenen His-Tag-Protein in eine kleine Säule transferiert und der Durchlauf verworfen wurde. Anschließend wurde die Säule mit mindestens dem vierfachen Volumen des Säulenbettes mit Waschlösung gewaschen. Durch Einsatz von niedrigeren Konzentrationen von Imidazol im Waschlösung konnten unspezifische Proteinbindungen reduziert werden. Die Elution erfolgte durch Erhöhung der Imidazolkonzentration im Elutionspuffer. Imidazol besitzt die gleiche Ringstruktur wie Histidin und verdrängt bei genügend hoher Konzentration das rekombinante Protein.

Die verwendeten Puffer setzten sich wie folgt zusammen:

<i>Komponente</i>	<i>Lysispuffer pH 7,5-8,0</i>	<i>Waschpuffer pH 7,5-8,0</i>	<i>Elutionspuffer pH 7,5-8,0</i>
NaH ₂ PO ₄	50 mM	50 mM	50 mM
NaCl	300 mM	1,5 M	300 mM
β-Mercaptoethanol	5 mM	5 mM	5 mM
Imidazol	20 mM	50 mM	250 mM

Die Reinigung wurde durch SDS-Gelelektrophorese (s. Kap. 2.3.2) überwacht. Die Elutionsfraktionen mit reinem Protein wurden vereinigt, mit Hilfe der Konzentratoren von Millipore (Amicon® Ultra-4, 30.000 MWCO) konzentriert und gegebenenfalls umgepuffert. Die Quantifizierung des gereinigten Proteins erfolgte nach der Bradford-Methode (s. Kap. 2.3.4).

2.3.2. Denaturierende SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)

Die SDS-Gelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von Proteinen bzw. Proteinuntereinheiten nach ihrer molekularen Größe. Sie kam im Rahmen dieser Arbeit zum einen zur Überwachung der Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine, zum anderen als Teil des Western-Blots zur Analyse von Proteinextrakten aus den verschiedenen pflanzlichen Geweben zum Einsatz. Verwendet wurde ein von Laemmli (1970) erstmals beschriebenes diskontinuierliches System mit Tris-Glycin-Puffern, nach modifizierten Vorschriften von Maurer (1971), Gordon (1975) und Sambrook et al. (1989). Standardmäßig wurde ein 12 % iges Acrylamid-Trenngel, überschichtet mit einem 4 %-igem Sammelgel, zur Auftrennung der Proteine verwendet. Die genaue Zusammensetzung der Gele ist in Tab. 2.3 aufgelistet.

Als Elektrophorese-Apparatur wurde das Mini Protean III System von BioRad und als Spannungsgeber das Multidrive XL Gerät von Pharmacia verwendet. Die Proteinproben wurden mit Laemmli-Puffer, Verhältnis 1:2, nach einer 5-minütigen Denaturierung bei 95°C im Heizblock auf die Gele aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in 1x SDS-Puffer bei 200 V, 75 mA und einer maximalen Leistung von 15 W durchgeführt. Bei den Gelen zur Überwachung der Expression und der Reinigung wurde als Größenmarker eine Standardproteinleiter von Fermentas, der „Unstained Protein Molecular Weight Marker“, zusätzlich

zu den Proben aufgetragen. Zur Färbung der Proteine wurden die Gele nach der Auftrennung mit Coomassie-Blau (s. Kap. 2.3.3.1) inkubiert.

Tab. 2.3 Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel bei der SDS-PAGE

<i>Komponente</i>	<i>Trenngel 12 %</i>	<i>Sammelgel 4 %</i>
Wasser	3,35 ml	3,40 ml
Acrylamid-Lösung ^{a)}	4,00 ml	830 µl
1,5 M Tris-Puffer pH 8,8	2,70 ml	-
1,0 M Tris-Puffer pH 6,8	-	630 µl
10 % (m/v) SDS-Lösung	100 µl	50 µl
10 % (m/v) APS-Lösung	75 µl	50 µl
TEMED	35 µl	15 µl

^{a)} Rotiphorese® Gel 30 (Roth), bestehend aus 30 % (m/v) Acrylamid und 0,8 % Bisacrylamid im Verhältnis 37,5:1

Die verwendeten Puffer setzten sich wie folgt zusammen:

<i>Laemmli-Puffer</i>		<i>10x SDS-Elektrodenpuffer</i>	
10 % (m/v) SDS-Lösung	3,3 ml	Glycin (1,9 M)	144,0 g
Glycerin (wasserfrei)	2,0 ml	Tris-Base (0,25 M)	30,0 g
0,5 M Tris-Puffer pH 6,8	1,0 ml	SDS (35 mM)	10,0 g
β-Mercaptoethanol	0,5 ml	Wasser	ad 1000,0 ml
0,5% (m/v) Bromphenolblau	0,5 ml		
Wasser	ad 10,0 ml	Vor Gebrauch 1:10 verdünnt	

2.3.3. Proteinfärbungen

2.3.3.1. Coomassie Färbung

Die Proteine in den SDS-Gelen wurden nach der elektrophoretischen Auftrennung mit dem Farbstoff Coomassie-Brilliant-Blau R-250 (Serva) gefärbt. Dieser Farbstoff lagert sich reversibel an die aromatischen Seitenketten der Aminosäuren. Zur Färbung wurden die Gele eine Stunde mit der Coomassie-Färbelösung unter leichtem Schütteln auf einem Taumel-schüttler (Heidolph Polymax, 1040) inkubiert. Der Farbstoff färbte zunächst das gesamte Gel blau. Erst die Entfärbung der Gele in zwei Schritten, in den Entfärberlösungen I und II, machte die selektive Anfärbung der Proteine als blaue Banden im Gel sichtbar. In Entfärberlösung II konnten die Gele mehrere Wochen gelagert werden, wohingegen durch längere

Inkubation in Entfärberlösung I die Proteine wieder entfärbt werden konnten. Die Dokumentation erfolgte analog zur Agarose-Gelelektrophorese im Light Cabinet (Biozym) unter Vis-Auflicht und mit Hilfe der Alphaimager Software (Version 4.1.0).

Zusammensetzung der verwendeten Lösungen:

<i>Komponenten</i>	<i>Entfärber I</i>	<i>Entfärber II</i>
Methanol	500,0 ml	50,0 ml
Eisessig	100,0 ml	70,0 ml
Wasser	ad 1000,0 ml	ad 1000,0 ml

<i>Komponenten</i>	<i>Färbelösung</i>
1% (m/v) Coomassie Blau	25,0 ml
Methanol	100,0 ml
Eisessig	20,0 ml
Wasser	ad 200,0 ml

2.3.3.2. *Indian-Ink Färbung*

Im Zuge des Immuno- bzw. Western-Blots (s. Kap. 2.4.3) wurden nach dem spezifischen Nachweis mit Hilfe der Antikörper-Detektion die Gesamtheit der auf der Blotmembran übertragenen Proteine mit Hilfe der unspezifischen aber irreversiblen Indian-Ink Färbung angefärbt. Diese Methode der Färbung wurde ursprünglich von Hancock und Tsang (1983) beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine leicht modifizierte Färbemethode, beschrieben durch Ober (1997), angewendet. Im Prinzip beruht die Färbung auf der Anlagerung von kolloidalen Kohlepartikeln aus der eingesetzten Tinte an die Proteine. Sie zeichnet sich durch eine sehr hohe Sensitivität im Vergleich zu anderen Färbungen aus. So sind z.B. Proteinbanden noch bis zu einer Menge von 10 ng nachweisbar. Im Vergleich dazu liegt die Nachweisgrenze bei der Färbung mit Coomassie-Blau bei ca. 300 ng pro Bande.

Die Färbung der Blotmembranen erfolgte durch Inkubation mit der Indian-Ink-Färbelösung unter Schütteln am Taumelschüttler bis eine ausreichende Intensität der Färbung erreicht wurde. Anschließend wurden die Membranen mit Wasser gespült und getrocknet. Diese getrockneten Blotmembranen sind über einen langen Zeitraum stabil und können in diesem Zustand gelagert werden. Die computergestützte Dokumentation erfolgte analog zu den SDS-Gelen im Light Cabinet (Biozym) unter Vis-Auflicht und mit Hilfe der Alphaimager Software (Version 4.1.0).

Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Färbelösungen:

Indian-Ink-Färbelösung

1x TBS-T	100,0 ml
Eisessig	1,0 ml
Fount India Tinte (Pelikan)	0,1 ml

Vor Gebrauch ist diese Lösung zu filtrieren.

<i>10x TBS (pH 8)</i>		<i>1x TBS-T</i>	
NaCl	80,0 g	10x TBS	50,0 ml
Tris-Base	30,0 g	Tween-20	0,5 g
KCl	2,0 g	Wasser	ad 500,0 ml
Wasser	ad 1000,0 ml		

2.3.4. Quantifizierung von Proteinen

Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen nach der Reinigung der rekombinanten Proteine aber auch die Gehaltsbestimmung von Proteinextrakten aus Pflanzengewebe erfolgte nach der von Bradford (1976) beschriebenen Methode. Sie beruht auf der Bindung des Farbstoffes Coomassie brilliant blue G-250 an Proteine und einer damit einhergehenden Verschiebung des Absorptionsmaximums von 465 nm (ohne Protein) zu 595 nm (mit Protein). Die Zunahme der Absorption bei 595 nm ist damit ein Maß für die Proteinkonzentration der Lösung. Zur Bestimmung wurden 20 µl der Probe mit 1 ml Bradford-Reagenz in Einmalküvetten (Plastibrand®, ROTH, 1 cm Schichtdicke) gemischt und die Absorption bei 595 nm am Ultrospec 2100pro, Amersham Biosciences gemessen. Anschließend wurde die Konzentration basierend auf einer Kalibriergerade mit 0,1-1,0 mg Rinderserumalbumin, BSA (Roth) als Referenzprotein ermittelt.

Als Schnelltest zur groben Überprüfung der Elutionsfraktionen bei der Reinigung von Proteinen mit einem 6xHis-tag (s. Kap. 2.2.12) Proteine wurde ein Mikroansatz in Mikrotiterplatten durchgeführt. Dabei wurden 100 µl Bradford-Reagenz mit 5-10 µl Probe gemischt und die Blaufärbung visuell im Vergleich zu einer Negativprobe mit Lysispuffer anstelle einer Probe als positiv oder negativ beurteilt.

Das Bradford Reagenz setzte sich wie folgt zusammen:

100 mg Coomassie brilliant blue G-250 wurden in 50 ml 95% (v/v) absoluten Ethanol vollständig gelöst. Nach Zugabe von 100 ml 85% (m/v) Phosphorsäure wurde die Lösung mit Wasser auf 1000 ml aufgefüllt und anschließend filtriert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C unter Lichtausschluss.

Eine alternative Methode zur Ermittlung der Konzentration eines reinen Proteins in Lösung ohne Probenverlust (nicht destruktive Messung) stellte die Bestimmung der Absorption bei 280 nm dar. Hierbei werden die aromatischen Aminosäuren der Proteine erfasst. Allerdings sollte man für eine genaue Quantifizierung den Extinktionskoeffizienten des Proteins kennen oder man schätzt die Menge anhand der Faustregel „1 mg Protein/ml gibt etwa OD₂₈₀ 1“. Zum Vergleich, für Antikörper und BSA gilt nach Harlow und Lane (1988):

Protein	OD ₂₈₀ (1mg/ml)
IgG	1,35
IgM	1,20
BSA	0,7

2.3.5. Biochemische Charakterisierung der rekombinanten Proteine

Für die biochemische Charakterisierung wurde die Fähigkeit der aktiven rekombinanten Enzyme ermittelt, einen Aminobutyl-Rest von Spermidin auf ein Molekül Putrescin (HSS-Assay) bzw. auf das eIF5A-Vorstufenprotein, engl. *precursor*, (DHS-Assay) in Gegenwart von NAD⁺ zu übertragen. Dazu wurde im HSS-Assay ¹⁴C-Putrescin, hingegen im DHS-Assay ¹⁴C-Spermidin eingesetzt. Die Auswertung erfolgte über den Nachweis von gebildetem und ¹⁴C-markierten Homospermidin durch Radio-TLC im HSS-Assay bzw. durch den Nachweis von ¹⁴C-markierten eIF5A mit Hilfe der Szintillationsmessung im DHS-Assay.

In einem ersten Schritt mussten die gereinigten und konzentrierten rekombinanten Proteine in einen geeigneten Puffer, der eine optimale Aktivität der Enzyme gewährleistet (Ober und Hartmann 1999a), überführt werden.

Dieser Puffer setzt sich wie folgt zusammen:

0,1 M Glycin NaOH – Puffer (DHS-Puffer)

Glycin 0,1 M	1,88 g
DTT 1 mM	38,6 mg
EDTA 0,1 mM	7,3 mg
Mit NaOH pH-Wert auf 9,0 einstellen	

Das Umpuffern erfolgte zum einen mit Hilfe der unter Kap. 2.3.1 bereits erwähnten Konzentratoren von Millipore und zum anderen mit PD-10 Säulen von Amersham Biosciences. Beide, Konzentratoren wie PD-10 Säulen, konnte mehrmals verwendet werden. Die Handhabung und Regeneration zur mehrfachen Verwendung erfolgte nach Angaben der Hersteller. Nach dem Umpuffern wurde die Konzentration der Proteine nach der Methode nach Bradford bestimmt (s. Kap. 2.3.4). Pro Reaktionsansatz wurden routinemäßig 20 µg Protein verwendet. Der Standard DHS-Assay wurde in einem 110 µl Reaktionsansatz wie folgt durchgeführt:

	pro Ansatz	Konzentration im Ansatz
¹⁴ C-Spermidin (0,125 mM)	8,8 µl	10,0 µM ^{b)}
¹² C-Spermidin (0,5 mM)	6,6 µl	30,0 µM
eifsv1 ^{a)} (2,8 mg/ml)	3,5 µl	16,2 µM
NAD ⁺ (25 mM)	8,8 µl	2,0 mM
DHS-Puffer pH 9,0	x µl	
Protein-Probe in DHS-Puffer	x µl	
	<hr/> 110 µl	

^{a)} eIF5A-precursor aus *Senecio vernalis*

^{b)} entspricht 0,06 µCi/Assay

Die Reaktionen wurden bei 30°C inkubiert und um den linearen Anstieg der Produkte zu überprüfen, wurden nach jeweils 2, 4, 8 und 16 Minuten Aliquots von 25 µl entnommen und die enzymatische Reaktion durch Zugabe von 10 µl 60 mM Spermidin in Kaliumphosphatpuffer (1 M, pH 6.) gestoppt. Durch Zugabe einer Nitrocellulose-Membran (Millipore) ins Reagiergefäß wurden die Proben nach dem Stoppen der Reaktion aufgesogen. Anschließend erfolgte mittels Proteinfällung durch Zugabe von 250 µl 10% Trichloressigsäure (TCA) mit 10 mM Spermidin und anschließendem Erhitzen der Proben auf 95°C für 10 Minuten die Bindung des eIF5A-Vorstufenproteins an diese Nitrocellulose-Membran. In nachfolgenden

Waschschritten der Membran mit 0,2 M HCl (4 Waschschritte à 5 Minuten) und 70%igen Ethanol (2 Waschschritte à 5 Minuten) wurde ungebundenes, radioaktives Spermidin entfernt. Die so behandelten Membranstückchen wurden anschließend getrocknet und in Szintillationsgefäße (VWR/Kartell, 4 ml) transferiert. Durch Zugabe von 500 µl 2-Ethoxyethanol (Sigma) wurden die Membranstückchen vollständig aufgelöst. Die damit in Lösung gebrachten Proteinkomplexe des eIF5A konnten nach der Zugabe von 3 ml Szintillationscocktail Optiphase (Hisafe 3, Perkin Elmer) im Szintillator vermessen werden. Die Messung erfolgte am WinSpectral™ 1414 Liquid Scintillation Counter (Perkin Elmer). Die gemessene Radioaktivität, counts per minute, cpm, bzw. decays per minute, dpm, stellt dabei ein direktes Maß für DHS-Aktivität der rekombinanten Proteine dar. Je höher die gemessene Radioaktivität ist, desto mehr Aminobutylreste wurden vom radioaktiven Spermidin auf das eIF5A-Vorstufenprotein übertragen.

Das im DHS-Assay standardmäßig eingesetzte eIF5A-Vorstufenprotein stammte aus *S. vernalis*. Dieser von Ober und Hartmann (1999a) charakterisierte Initiationsfaktor (GenBank Akzessionsnummer AJ238624) wurde analog zu Kap. 2.2.12 mit einer C-terminalen Polyhistidin-Markierung (6xHis-tag) kloniert, heterolog exprimiert und routinemäßig über immobilisierte Metall(ionen)-Chelat-Affinitätschromatographie (s. Kap. 2.3.1) gereinigt. Wie bereits bei Reimann et al. (2004) beschrieben, zeigen aufgrund der hoch konservierten Struktur des eIF5A-Vorstufenproteins die DHS-Enzyme aus verschiedenen Arten eine deutliche Aktivität mit dem eIF5A aus *S. vernalis*. Demnach kann er zur Charakterisierung der Aktivität homologer Enzyme aus unterschiedlichen Arten herangezogen werden. Für den Standard HSS-Assay wurde folgender Reaktionsansatz (50 µl) gewählt:

	pro Ansatz	Konzentration im Ansatz
¹⁴ C-Putrescin (0,125 mM)	4,0 µl	10,0 µM ^{a)}
¹² C-Putrescin (5,0 mM)	3,8 µl	0,4 mM
¹² C-Spermidin (5,0 mM)	4,0 µl	0,4 mM
NAD ⁺ (25 mM)	4,0 µl	2 mM
DHS-Puffer pH 9,5	x µl	
Protein-Probe in DHS-Puffer	x µl	
	50 µl	

^{a)} entspricht 0,06 µCi/Assay

Die Proben wurden bei 30°C inkubiert. Um wiederum den linearen Anstieg der Produkte zu überprüfen, wurden in einer Zeitreihe von 2, 4, 8, 16 und 32 Minuten Aliquots von 8 µl entnommen und direkt auf eine DC-Platte (Merck, Kieselgel 60 F₂₅₄) aufgetragen. Die DC wurde mit dem Laufmittel Methanol : Aceton : NH₄OH (25%) im Verhältnis 30 : 40 : 20 entwickelt. Die Radioaktivität der DC-Platten wurden am Rita Star „Thin Layer Analyzer“ (raytest) gemessen. Rita (Beta-Radioactivity Intelligent Thin Layer Analyzer) dient zur Messung von Beta-Strahlung bei einer Sensivität für ¹⁴C von 10 dpm/peak. Die Chromatogramme wurden mit der Gina Star TLC™-Software, Version 2.18, ausgewertet. Die Integration der Peakfläche von ¹⁴C-markierten Homospermidin (Rf=0,3) und ¹⁴C-markierten Putrescin (Rf=0,59) lieferte ein Maß für die HSS-Aktivität der rekombinanten Proteine. Dabei ist mit HSS-Aktivität die Fähigkeit, einen Aminobutylrest von Spermidin auf Putrescin zu übertragen, definiert.

Die radioaktiven Chemikalien [1,4-¹⁴C]Putrescin-Dihydrochloride mit 107 µCi/mmol und ¹⁴C-Spermidin-Trihydrochlorid (N-(3-aminopropyl)-[1,4-¹⁴C]tetramethylene-1,4-diamine) mit 111 µCi/mmol wurden bei Amersham Pharmacia Biosciences bezogen.

2.4. Immunologische und mikroskopische Techniken

2.4.1. Immunisierung

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei Pflanzenarten, *I. neei* und *P. laevigata*, für weiterführende Untersuchungen der HSS-Expression auf Proteinebene ausgewählt. Der spezifische Nachweis der HSS-Proteine erfolgte durch polyklonale Antikörper, die von der Firma Sequence Laboratories Göttingen GmbH bezogen wurden. Zur Auftragsimmunisierung wurde heterolog exprimiertes und gereinigtes HSS-Protein aus *I. neei* und *P. laevigata*, gefriergetrocknet und aliquotiert (1x 500 µg, 2x 250 µg), an Sequence Laboratories gesandt. Zuvor wurden die Protein-Proben in einen Kaliumphosphatpuffer (5 mM K₂HPO₄-Puffer, pH8) umgepuffert. Dadurch enthielten die Proben möglichst wenig Salzanteile. Die Immunisierung des Wirtsorganismus (Kaninchen) erfolgte nach einem standardisierten Dreimonatsprogramm, mit einer Initialimmunisierung mit 500 µg Antigen und zwei nachfolgenden Injektionen, mit 250 µg Antigen. Zur Überwachung des Immunisierungserfolgs wurde Präimmunsersum vor der ersten Injektion entnommen und zugesandt. Es folgten Blutabnahmen und Serumgewinnung nach 35 und 63 Tagen, die im weiteren als „First-“ und „Second-

Bleeding“ bezeichnet werden. Konnten mittels Western-Blot (s. Kap. 2.4.3) durch die spezifische Erkennung des Antigen die entsprechenden Antikörper in den Seren nachgewiesen werden, erfolgte nach 98 Tagen die Endblutung („Final-Bleeding“). Dieses Final-Bleeding wurde für die Affinitäts-Reinigung (s. Kap. 2.4.2) des Antikörpers eingesetzt. Die Lagerung der Seren erfolgte bis zur weiteren Verwendung bei -20°C .

Die Herstellung des Kaliumphosphat-Puffers erfolgte wie folgt:

5 mM K_2HPO_4 -Puffer pH 8,0

A: 5 mM KH_2PO_4 Lösung	890 mg auf 1000 ml
B: 5 mM K_2HPO_4 Lösung	680 mg auf 1000 ml

Puffer A mit Puffer B bis zum Erreichen des gewünschten pH-Wertes mischen.

2.4.2. Affinitätsreinigung der polyklonalen Antikörper

Die Aufreinigung der polyklonalen Antikörper aus dem Serum erfolgte über eine Antigen-Antikörper-Affinitätschromatographie. Hierzu wurde das Antigen, in diesem Fall die HSS-Proteine der jeweiligen Pflanzenart, über chemische Kopplung an einer Gelmatrix immobilisiert und diente für den Antikörper als Affinitätsligand. Über die spezifische Antikörper-Antigen-Reaktion wurde der Antikörper an das fixierte Antigen reversibel gebunden und die nicht affinen Bestandteile des Serums konnten durch Waschschrte mit geeignetem Puffer entfernt werden. In einem letzten Schritt wurde die spezifische Antikörper-Antigen-Bindung durch Absenken oder Anheben des pH-Wertes gelöst und der gereinigte polyklonale Antikörper konnte von der Matrix eluiert werden. Als Gelmatrix kam die CNBr-aktivierte Sepharose™ 4B von GE Healthcare zum Einsatz. Die kovalente Bindung des Antigens an die Sepharose basiert hierbei auf der Bildung von reaktiven Cyanatestergruppen durch die Reaktion von cyanogenem Bromid mit Hydroxyl-Gruppen der Sepharose. An diese so entstandenen reaktiven Cyanatester binden primäre Amine, so auch die Aminosäuren von Proteinen, in einer spontanen Reaktion.

Die praktische Durchführung der Antikörper-Reinigung erfolgte im wesentlichen nach Angaben des Herstellers und ist im Folgenden kurz geschildert. Zuerst wurde die Sepharose mit 1 mM HCl gewaschen und vorgequollen. Da während diesen Schrittes Blausäure entstand, war es unbedingt erforderlich, unter dem Abzug zu arbeiten. Anschließend erfolgte

die Äquilibrierung mit dem Kopplungspuffer und die kovalente Bindung der HSS an die aktivierte Sepharose. Dazu wurden 1-5 mg der heterolog exprimierten und gereinigten HSS mittels PD-10 Säule ebenfalls in den Kopplungspuffer überführt und anschließend für vier Stunden bei Raumtemperatur bei leichter Rotation mit der Sepharose inkubiert. In der oben geschilderten Spontanreaktion binden in dieser Phase Proteine über primäre Amine an die reaktiven Cyanatestergruppen. Nach der Kopplung wurde die Sepharose in eine Säule transferiert und der Durchlauf gesammelt. Die Kopplungseffizienz konnte durch Vergleich der OD_{280} der aufgetragenen Proteinlösung und des Durchlaufes überprüft werden. Bei 280 nm absorbieren die aromatischen Aminosäuren der Proteine (s. Kap. 2.2.3.). Nicht gebundene HSS wurde durch Waschen mit Kopplungspuffer bis zu einer $OD_{280} \leq 0,02$ aus der Säule entfernt. Anschließend wurden die nach der Kopplung noch freien Bindungsstellen der CNBr-aktivierten Sepharose durch Inkubation mit 0,1 M Tris-HCl (pH 8,0) abgeblockt. Nicht kovalent gebundene Liganden wurden durch 3 alternierende Waschschrte mit je 10 ml saurem Waschpuffer pH 4,8 und alkalischen Waschpuffer pH 8,8 entfernt. Eine Absättigung unspezifischer Bindungsstellen erfolgte durch Inkubation der Sepharose über Nacht bei leichter Rotation mit einer Lösung von 1 mg BSA/ ml 1x PBS. Nach mehrmaligem Waschen der Säule mit 1x PBS konnte die Sepharose nun mit 7-8 ml Serum („Final Bleeding“) beladen werden. Eine vorhergehende Filtration des Serums über Glaswolle diente zur Entfernung von störenden Lipiden. Die Inkubation der Sepharose mit Serum erfolgte für 15 Stunden bei Raumtemperatur. Dadurch war eine ausreichende Antikörper-Antigen Bindung gewährleistet. Die Sepharose wurden anschließend mit saurem Waschpuffer pH 4,8 gewaschen bis zu einer $OD_{280} \leq 0,02$, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Die Elution der spezifisch gebundenen Antikörper erfolgte mit geeigneten Elutionspuffer. Routinemäßig kam ein saurer Elutionspuffer (A) mit pH 2,8 zum Einsatz. Alternativ wurde ein basischer Elutionspuffer (B) pH 11,5 verwendet. Um ein Denaturieren der Antikörper in dem stark sauren bzw. basischen Milieu zu verhindern, wurden die Elutionsfraktionen in Gefäßen gesammelt, in denen ein entsprechender Gegenpuffer vorgelegt war. Im Falle des Elutionspuffers A wurden pro ml Elutionsfraktion 150 μ l 1,5 M Tris-Puffer (pH 8,8) verwendet, im Falle des Elutionspuffers B hingegen 150 μ l 1,5 M Tris-HCl (pH 6,8). Die Elutionsfraktionen wurden sofort photometrisch vermessen. Fraktionen mit einer $OD_{280} > 0,1$ wurden vereinigt und mittels Konzentratoren (Millipore, Amicon® Ultra-4, 30.000 MWCO) in 1x PBS umgepuffert und bis zu einer $OD_{280} > 0,8$ konzentriert. Der Antikörper gegen die HSS aus *I. neei*, antiHSSneei, wurde bis zu einer OD_{280} von 2,4 konzentriert, der Antikörper

gegen die HSS aus *P. laevigata*, antiHSSpars, bis zu einer OD₂₈₀ von 1,6. Das entspricht etwa 1,8 mg/ml für antiHSSneei und 1,2 mg/ml für antiHSSpars. Die Lagerung erfolgte nach einem Zusatz von 0,02% (m/v) Natriumazid in 30-50 µl Aliquots bei -80°C.

Das Säulenmaterial mit der gebundenen artspezifischen HSS konnte mehrfach für Antikörper-Reinigungen verwendet werden. Dazu wurde es nach mehrmaligen Waschen mit 1x PBS in 1x PBS mit 0,02% (m/v) Natriumazid bis zur Wiederverwendung bei +4°C aufbewahrt.

Die verwendeten Puffer setzten sich wie folgt zusammen:

10 x PBS (pH 7,2)		1 x PBS	
1,4 M NaCl	80,0 g	10 x PBS	50,0 ml
30 mM KCl	2,0 g	Tween 20	0,5 g
99 mM Na ₂ HPO ₄	14,4 g	Wasser	ad 500,0 ml
14 mM KH ₂ PO ₄	2,4 g		
Wasser	ad 1000,0 ml		
pH 7,2			

Kopplungspuffer (pH 8,3)

0,1 M NaHCO ₃	8,4 g
0,5 M NaCl	29,2 g
Wasser	ad 1000,0 ml

Alkalischer Waschpuffer (pH 8,8)

0.1 M Tris-HCl	
0.5 M NaCl	
Wasser	ad 250,0 ml

Saurer Waschpuffer (pH 4,8)

0.1 M Natriumacetat	
0,5 M NaCl	
Wasser	ad 250,0 ml

Elutionspuffer A (pH 2,5)

0,2 M Natriumacetat	
0,5 M NaCl	
Wasser	ad 100,0 ml

Elutionspuffer B (pH 11,5)

100 mM Triethanolamin	
Wasser	ad 100,0 ml

Die Spezifität, vor allem mit Hinblick auf eine Kreuzreaktivität mit der DHS, und die Sensitivität der gereinigten Antikörper wurde im Western-Blot (s. Kap. 2.4.3) überprüft.

Dazu wurden HSS und DHS in Mengen von 1-100 ng im SDS Gel aufgetrennt, geblottet und mit dem gereinigten spezifischen Antikörper entwickelt.

2.4.3. Isolierung von Proteinen aus pflanzlichen Geweben und Western-Blot

Als Methode zur Untersuchung der Proteinexpression in den verschiedenen pflanzlichen Organen wurde der Western-Blot gewählt. Darüber hinaus wurde der Western-Blot auch für die Überprüfung der Antigenität der Seren und zur Ermittlung der Spezifität sowie Sensitivität der affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörper verwendet (s. Kap. 2.4.2). Generell ermöglicht der Western-Blot die Identifizierung von bestimmten Proteinen innerhalb eines Proteingemisches durch Detektion mit spezifischem Antikörper. Das Proteingemisch wird zuvor mit Hilfe der SDS-PAGE (s. Kap. 2.3.2) aufgetrennt und die Proteine auf eine Membran transferiert.

Für diese Expressionsstudien wurden in einem ersten Schritt die Gesamtproteine aus unterschiedlichen Pflanzenorganen isoliert. Dazu wurden die Proben in flüssigem Stickstoff gefroren und ebenfalls mit flüssigem Stickstoff mit Mörser und Pistill zu einem feinen Pulver zermahlen. Das homogenisierte Pflanzenmaterial wurde in einen geeigneten Extraktionspuffer transferiert. Standardmäßig wurde dazu 1x PBS-Puffer gewählt, der folgende Proteinase-Inhibitoren enthielt: 10 μ M PMSF (gelöst in Isopropanol), 0,5 mM EDTA; 1 μ M Benzamidin, 1 μ g/ml Pepstatin A (gelöst in MeOH), 1 μ g/ml Leupeptin und 5 μ g/ml Aprotinin. Zusätzlich wurden 2,5% (w/v) Polyvinylpyrrolidon (Polyclar AT, Serva) und 2,5% (w/v) Natrium-Ascorbat (Fluka) dem Extraktionspuffer zugesetzt. Ersteres diente zur Bindung von Gerbstoffen, letzteres sollte die Bildung von quervernetzten Polyphenolen durch die vor allem in den Wurzeln vorkommenden Phenoloxidasen unterbinden. Die Extraktion der Proteine erfolgte für 30 min auf Eis und unter Rühren auf einem Magnetrührer. Anschließend wurden Zelltrümmer und unlösliches Polyvinylpyrrolidon durch Zentrifugation entfernt. Die löslichen Proteine wurden nach der Methode von Bradford (s. Kap. 2.3.4.) quantifiziert. Die Lagerung der Proteinextrakte bis zur Verwendung erfolgte bei -20°C .

Die Auftrennung der Proteinextrakte erfolgte standardmäßig durch 12% (w/v) SDS-PAGE (s. Kap. 2.3.2.). Eingesetzt wurden 20 μ g Proteinextrakt. Bei ausreichend hoher Proteinkonzentration konnten die Extrakte direkt mit Laemmli-Puffer nach 5 min Denaturie-

nung aufgetragen werden. Bei niedriger Proteinkonzentration erfolgte eine Proteinfällung mit 0,1% (m/v) Natrium-DOC-Lösung und 55% (m/v) TCA-Lösung über Nacht bei 4°C. Eingesetzt wurden jeweils 1/10 VT bezogen auf das Volumen der Proteinprobe. Die gefällten Proteine wurden nach Zentrifugation in 1,5 M Tris-Puffer, pH 8,8 resuspendiert und anschließend mit Laemmli-Puffer (1:2) versetzt, für 5 min auf 95°C erhitzt und auf die Gele geladen. Im Anschluss an die SDS-PAGE-Proteinauftrennung erfolgte der Proteintransfer aus den Gelen auf eine Polyvinyliden-difluorid-Membran (Roth, Roti[®]PVDF) mittels Elektrolot nach der Semi-Dry-Methode in einer Multiphor II Nova Blot Elektrophorese Apparatur (LKB, Bromma). Als Spannungsgeber wurde der Multidrive XL (Pharmacia) verwendet. Die PVDF-Membran wurde nach Angaben des Herstellers vor dem Blot zuerst in 100% Methanol bis zur vollständigen Benetzung getaucht und anschließend für 15 Minuten gemeinsam mit dem Blotpapier (Whatman paper, 3MM) in 1x Blotpuffer äquilibriert. Nach einem luftblasenfreien Aufbau des Semi-Dry-Blots (s. Abb. 2.3) erfolgte der Proteintransfer bei einer ansteigenden Spannung von 1-5 V und 120 mA bei einem bzw. 180 mA bei zwei zu blottenden Gelen für 60 min. Zum Abschätzen der Proteingrößen wurde der „prestained molecular weight marker“ (Fermentas) im SDS Gel mit aufgetrennt und auf die Membran übertragen. Ein Vorteil dieser Leiter liegt in der Möglichkeit, durch die bereits vorhandene Färbung den Transfer auf die Blotmembran zu überprüfen. Nach dem erfolgreichen Proteintransfer wurde die Blotmembran mit einer Lösung von 5% (m/v) Trockenmilchpulver (Blotting Grade, Roth) in 1x TBS-T für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln auf dem Taumelschüttler inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen abzusättigen. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörper ebenfalls in der beschriebenen Blocklösung für die Dauer einer Stunde bei Raumtemperatur unter Schütteln. Die Antikörper wurden dabei in der Blocklösung wie folgt verdünnt: der Antikörper gegen die HSS aus *I. neei*, antiHSSneei (OD₂₈₀ von 2,4), 1:10.000 [v/v], der Antikörper gegen die HSS aus *P. laevigata*, antiHSSpars (OD₂₈₀ von 1,6), 1:2.000 [v/v]. Nach der Inkubation führten drei Waschschrte mit 1x TBS-T (3x 10 Minuten) zur Entfernung der überschüssigen primären Antikörper. Es folgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper, ein aus einer Ziege gewonnener und gegen Kaninchenantikörper gerichteter Antikörper, konjugiert mit einer Meerrettichperoxidase (horseradish peroxidase, HRPO) von Dianova. Dieser Antikörper wurde 1:3.300 (v/v) in TBS-T verdünnt und die Membran für eine Stunde in dieser Lösung geschwenkt. Es folgten drei Waschschrte mit 1x TBS-T (3x 10 Minuten) sowie ein Waschschrte mit 1x PBS, der zur Vorbereitung der Detektion diente. Die eigentli-

Die Detektion erfolgte mit dem ECL Western Blotting System (Amersham Biosciences) nach Angaben des Herstellers und wurde in der Dunkelkammer durchgeführt. Das System beruht auf einer oxidativen Spaltung des zugesetzten Luminol durch die mit dem sekundären Antikörper konjugierte Meerrettichperoxidase. Die dabei entstehende Chemolumineszenz wird detektiert. Dokumentiert wurde das emittierte Licht auf einem Röntgenfilm (XAR-5, Kodak). Die Exposition des Röntgenfilms variierte je nach Stärke des Signals zwischen 15 Sekunden und 10 Minuten und wurde empirisch ermittelt. Die Entwicklung und Fixierung der Filme erfolgte mit Kodak GBX „Developer and Replenisher“ und Kodak GBX „Fixer and Replenisher“. Nach der immunologischen Detektion wurde die PVDF-Membran mit Indian-Ink angefärbt (s. Kap. 2.3.3.2), um die Proteinbeladung der Membran bei den einzelnen Proben zu kontrollieren.

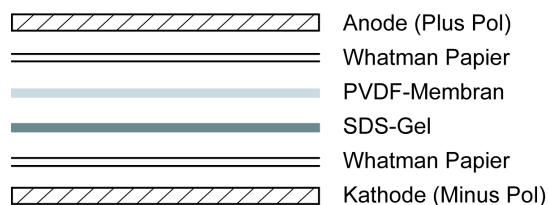


Abb. 2.3 Blotaufbau des Semi-Dry-Blots.

Eine alternative Methode zur Isolierung von Gesamtprotein aus Pflanzenmaterial bot das NucleoSpin® RNA/Protein Kit von Macherey-Nagel. Dieses Kit ermöglichte die parallele Isolierung von RNA sowie Protein aus einer Probe. Besonders für Expressionsanalysen bot dieses System den Vorteil, ausgehend von einer Probe die Expression auf RNA- sowie Proteinebene untersuchen zu können. Die Durchführung der Isolierung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

Die im Rahmen des Western-Blot verwendeten Puffer setzten sich folgendermaßen zusammen:

10 x Blotpuffer		1 x Blotpuffer	
Tris-Base	58,0 g	10 x Blotpuffer	10 ml
Glycin	29,0 g	Methanol	20 ml
SDS	3,7 g	Wasser	ad 100 ml
Wasser	ad 1000 ml		

Die Zusammensetzung von TBS-T sowie PBS-Puffers ist unter Kap. 2.3.3 und 2.4.2. aufgelistet.

2.4.4. *in situ* – Immunolokalisation

Die Lokalisation der HSS auf zellulärer Ebene wurde durch *in situ* – Immunolokalisation untersucht. Diese Methode basiert auf einer spezifischen Antigen-Antikörper-Erkennung in histologischen Schnitten von Geweben. In einem ersten Schritt mussten die pflanzlichen Gewebe fixiert und für die histologischen Schnitte in Kunstharz eingebettet werden.

2.4.4.1. *Gewebefixierung und Einbettung*

Pflanzenmaterial von im Glashaus gezogenen Pflanzen wurde gesammelt und möglichst zügig nach dem Ernten in kleine Segmente (max. 0,5 cm Länge) zerteilt und für zwei Stunden unter reduzierten Druck (max. –0,3 bar) im Exsikkator mit eisgekühlten Fixierpuffer inkubiert. Der Fixierpuffer auf Phosphatbasis enthielt die proteinquervernetzenden Aldehyde p-Formaldehyd (2% [m/v]) und Glutardialdehyd (0.1% [v/v]) als fixierende Komponenten. Zusätzlich wurde dem Puffer 0,1% Triton X-100 (m/v) zugesetzt, um ein besseres Infiltrieren des Fixativs in das Gewebe zu ermöglichen. Im Verlauf der zweistündigen Fixierung wurde das Fixativ mehrfach gewechselt, um ein Abdampfen im Vakuum zu kompensieren. Nach zwei Waschschritten mit 1x PBS zur Entfernung der Fixierlösung wurden die Proben in einer aufsteigenden Ethanol-Reihe (30, 50, 70, 90 und 100% Ethanol) für jeweils 30 Minuten entwässert. Dabei wurde die letzte Stufe zweimal wiederholt, um eine möglichst quantitative Entwässerung zu erzielen. Die Einbettung erfolgte in den Kunststoff Technovit 7100 (Heraeus-Kulzer) nach Angaben des Herstellers. Dieser kalt polymerisierende Kunststoff zeichnet sich vor allem durch eine schnelle Polymerisation und eine gute Schneidfähigkeit aus. Generell erfolgte eine Präinfiltration der Gewebe mit einer Lösung von Ethanol (100%) und T7100, zu gleichen Teilen gemischt, vor der eigentlichen Infiltration mit T7100 über Nacht. Die Polymerisation wurde in kleinen PCR-Gefäßen durchgeführt. Nach dem Aushärten des Kunststoffes bei Raumtemperatur wurde noch vorhandene Feuchtigkeit auf den Kunststoffblöckchen mit Zellstoff entfernt und die Blöckchen mit Technovit 3040 (Heraeus-Kulzer) überschichtet. T3040 zeichnet sich durch eine erhöhte Festigkeit aus und ermöglicht das Einspannen der Kunststoffblöcken in das Mikrotom. Die fertig polymerisierten Blöckchen wurde nach dem Entfernen der PCR-Gefäße im Exsikkator mit Trockenmittel (Silicalgel Orange, Roth) gelagert, um die noch vorhandene Restfeuchte zu entfernen.

Fixierpuffer

2 g p-Formaldehyd wurden zusammen mit einem Plätzchen NaOH in 45 ml Wasser unter ständigem Rühren und leichtem Erhitzen (ca. 60 °C) gelöst. Die Alkalisierung durch den Zusatz von NaOH verbesserte die Löslichkeit des p-Formaldehyds. Nach dem Abkühlen der Lösung erfolgte die Einstellung des pH-Wertes mit 1 N H₂SO₄ auf den Bereich 6-8. Anschließend wurde die Lösung zuerst mit Wasser auf ein Volumen von 50 ml gebracht und danach mit 0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2 auf 100 ml aufgefüllt. Letztlich wurde 0,1% (m/v) Triton X-100 und 0,1% (v/v) Glutaraldehyd hinzugefügt. Die Lagerung der Fixierlösung erfolgte unter Lichtausschluss bei 4 °C für maximal 1 Monat.

Der Phosphatpuffer wurde wie folgt hergestellt:

0,1 M Phosphatpuffer pH 7,2

A: 0,1 M NaH ₂ PO ₄ Lösung	1.35 g auf 100 ml
B: 0,1 M Na ₂ HPO ₄ Lösung	1.80 g auf 100 ml

Puffer A mit Puffer B bis zum Erreichen des gewünschten pH-Wertes mischen.

Alternativ zum hier beschriebenen 0,1 M Natrium-Phosphatpuffer wurde auch ein 0,1 M Kalium-Phosphatpuffer pH 7,2 verwendet. Die Herstellung erfolgte analog zum Natrium-Phosphatpuffer.

2.4.4.2. Immundetektion

Zur eigentlichen Immundetektion wurden von den eingebetteten Geweben mikroskopische Schnitte mit einer Dicke 3-4 µm am Rotationsmikrotom (HM 355S, Microm) hergestellt und auf adhäsive Diagnostika-Objektträger mit dauerhafter Teflonbeschichtung (10 Felder, 6 mm Durchmesser, Roth) aufgebracht.

Die Detektion der HSS in diesen mikroskopischen Schnitten erfolgte mittels der gereinigten polyklonalen Antikörper und der spezifischen Antikörper-Antigen-Wechselwirkungen. Ein sekundärer Antikörper diente der Visualisierung dieser Antikörper-Antigen Komplexe. Hier kam der Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit IgG von Invitrogen (Molecular Probes) zum Einsatz. Dieser gegen Kaninchen gerichtete Antikörper ist mit einem grün fluoreszierenden Farbstoff markiert und ermöglicht die Detektion mittels Fluoreszenzmikroskopie bei UV-Licht von 450-490 nm. Als Mikroskop wurde das Axioskop 2 epifluorescence

Mikroskop (Zeiss) verwendet und die Aufzeichnung der Bilder erfolgte mit der AxioCam HRc Digitalkamera (Zeiss).

Im Folgenden ist die praktische Durchführung kurz beschrieben:

Um störende Aldehyde des Fixativs zu binden, wurden die Schnitte nacheinander mit 50 mM Ammoniumchlorid (NH₄Cl, Roth) und mit 50 mM Glycin (Roth) für 20 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 1% (w/v) BSA (Roth) und 0,1% Fischgelatine (Roth) in 1x PBS für eine weitere Stunde bei 37°C abgeblockt. Nach drei Waschschrinen mit 1x PBS für 10 Minuten erfolgte die Inkubation mit dem affinitätsgereinigten Antikörper in einer 1:50 oder 1:100 Verdünnung mit 1x PBS für 4 Stunden bei 37°C. Die Schnitte wurden dabei in einer Petrischale mit befeuchtem Filterpapier aufbewahrt, um ein Verdunsten des Wassers aus der Antikörper-Lösung zu verhindern. Nach dieser ersten spezifischen Markierung wurde nicht gebundener Antikörper in weiteren drei Waschschrinen mit 1x PBS für 10 Minuten entfernt und es erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper Alexa Fluor 488 goat anti-rabbit, 1:100 verdünnt in 1x PBS für eine Stunde bei 37°C. Da der gebundene Fluoreszenzfarbstoff lichtempfindlich ist, erfolgten die Inkubation und auch die nachfolgenden Waschschrine (3 x 10 Minuten 1x PBS) unter Lichtausschluss. Nach dem vollständigen Trocknen der markierten Schnitte in der Dunkelkammer wurden diese nach dem Hinzufügen von Mounting Medium (Citiflour; Agar Scientific, AF1, Glycerol/PBS solution), welches den sekundären Antikörper vor dem Ausbleichen schützte, mit einem Deckgläschen versetzt und konnten am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden. Die Markierung der so behandelten Schnitte konnten bei einer Lagerung bei +4°C und unter Lichtausschluss für einige Tage aufbewahrt werden.

3. Ergebnisse

Wie bereits in der Einleitung dargelegt wurde, ist die Homospermidin-Synthase (HSS), das Eingangsenzym der PA-Biosynthese, durch Genduplikation aus der Desoxyhypusin-Synthase (DHS), einem Enzym des Primärstoffwechsels, hervorgegangen. Diese Rekrutierung erfolgte innerhalb der Angiospermen mehrfach und unabhängig. So konnte in vorhergehenden Arbeiten von Ober (1999b) und Reimann (2004) die unabhängige Duplikation der HSS innerhalb der Boraginaceae, der Monokotylen und in zwei Triben der Asteraceae, den Eupatorieae und Senecioneae, nachgewiesen werden. Vor diesem Hintergrund kann das verstreute Vorkommen der PAs in phylogenetisch entfernten Familien auf wiederholte Evolutionsereignisse und konvergente Evolution zurückgeführt werden. Von zentraler Bedeutung ist die Frage nach der Häufigkeit dieser unabhängigen Rekrutierungen. Auf der Basis der oben genannten Arbeiten und den dabei gesammelten Erfahrungen konnte im Rahmen dieser Arbeit mit der Untersuchung der Evolution der HSS in den ebenfalls PA-produzierenden Familien der Apocynaceae und Convolvulaceae diese Frage ein Stück weiter aufgeklärt werden. Dabei stellten neben den Apocynaceae die Convolvulaceae mit dem verstreuten Vorkommen der PAs in isolierten Arten eine besonders interessante Familie dar. Die molekularen Grundlagen für dieses verstreute Vorkommen innerhalb einer Familie waren ebenfalls Gegenstand dieser Arbeit. Einen ersten Schritt stellte das Identifizieren von HSS- und DHS-kodierenden cDNA-Sequenzen aus Vertretern beider Familien dar.

3.1. Identifizierung HSS- und DHS-kodierenden cDNAs mit Hilfe der DOP-PCR

Für die Aufklärung des evolutiven Ursprungs der HSS wurde ein molekularbiologischer Ansatz gewählt. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit der HSS- und DHS-kodierenden cDNA-Sequenzen aus verschiedenen Arten der Angiospermen konnten degenerierte Primer zur Identifizierung homologer Sequenzen entworfen werden. Dazu wurde ein Nukleinsäure-Alignment aller bekannten HSS- und DHS-Sequenzen erstellt. Anhand dieses Alignments erfolgte der Entwurf degenerierter Primer mit Bindungsstellen in hoch konservierten Bereichen der Sequenzen. Eine anschließende PCR mit diesen Primern (degenerate oligonucleotide-primed polymerase chain reaction, DOP-PCR) sollte sowohl DHS- aber auch HSS-kodierende cDNA-Sequenzen in den hier untersuchten Arten amplifizieren. DOP-PCR stellt einen wichtigen Ansatz zur Identifizierung neuer Sequenzen dar (Reimann et al. 2004; Nur-

hayati und Ober 2005). Voraussetzung für die Anwendung der DOP-PCR ist eine hohe Sequenzidentität und das Vorhandensein stark konservierter Bereiche. Beide Kriterien werden von den HSS- und DHS-Sequenzen erfüllt. Die Sequenzidentität auf Nukleinsäureebene selbst zwischen humaner DHS (*Homo sapiens* DHS cDNA, GenBank Akzessionsnummer BC000333) und pflanzlicher DHS (z. B. *Senecio vernalis* DHS cDNA AJ238622) beträgt noch 65,7 %.

Für diesen Versuchsansatz wurden die PA-akkumulierenden Arten *Ipomoea neei* (SPRENG.) und *Merremia quinquefolia* (L.) HALL. f als Vertreter der Convolvulaceae ausgewählt. In *I. neei* wurden insgesamt 15 PAs des Ipangulin-Typs nachgewiesen (Jenett-Siems et al. 2005). In *M. quinquefolia* wurden mit Hilfe von GC-Analysen 12 PAs identifiziert, unter anderen vier Alkaloide des Lycopsamin-Typs (Mann 1997). Von den Apocynaceae wurde *Parsonsia laevigata* ALSTON verwendet. Aus dieser Art wurden ebenfalls PAs des Lycopsamin-Typs isoliert, wobei makrozyklische Derivate dominieren (Abe et al. 1991; Hartmann et al. 2003). Da über den Ort der Biosynthese nichts bekannt war, erfolgte eine getrennte Untersuchung der Pflanzenorgane. Unterschieden wurden Wurzel, Sprossachse, Blatt und Sprossspitze.

Mit Hilfe der DOP-PCR konnten in allen drei untersuchten Arten interne Sequenzbereiche von zur HSS und DHS homologen Sequenzen ermittelt werden. Dabei wurden verschiedene Kombination von degenerierten Primern verwendet. Die erfolgreichen Primer sowie PCR Parameter sind zusammenfassend in Tab. 3.1. aufgelistet. Für *I. neei* konnte mit den Primern P1 und P2 ein 726 bp langes Fragment in einem touch-down PCR Programm (Annealingtemperatur 60-45°C, pro Zyklus – 0,5°C) mit der *Taq* DNA-Polymerase von Invitrogen amplifiziert werden. cDNA aus dem Spross einer Sterilkulturpflanze wurde dabei als Template eingesetzt. Nach dem Klonieren dieses Fragments in den pGEM-T easy Vektor und der Transformation in *E. coli* ergab die Restriktionsanalyse (Doppelverdau *Eco*RI und *Eco*RV) der isolierten Plasmid-DNA aus verschiedenen *E. coli*-Klonen unterschiedliche Restriktionsmuster. Für den Sequenztyp „ipomneei_1“ waren drei Fragmente mit der Größe 3000 bp, 500 bp und 250 bp kennzeichnend. Bei Typ „ipomneei_2“ weichten die Größen der ebenfalls erhaltenen drei Fragmente mit 3000 bp, 400 bp und 350 bp etwas von dem vorherbezeichneten Muster ab (s. Abb. 3.1). Die Sequenzierung beider Typen zeigte, dass beide Sequenzen eine hohe Identität (80 – 85 %) zu HSS- und DHS-kodierenden cDNA-Sequenzen aus anderen Angiospermen besitzen, sich aber voneinander zu 12 % unterschei-

den. Darüber hinaus ergaben Sequenzvergleiche auf Nukleinsäureebene mit der bereits bekannten DHS aus *Ipomoea hederifolia* (Reimann et al. 2004) eine Sequenzähnlichkeit zu *ipomnee1_1* von 96,3%. Basierend auf diesen ersten Sequenzdaten konnten wir davon ausgehen, aus *I. neei* ein Fragment der DHS und möglicherweise auch eine HSS-kodierende cDNA-Sequenz gefunden zu haben. In analoger Weise wurden ebenfalls in *M. quinquefolia* zwei Sequenzen mit hoher Nukleinsäureidentität zu bereits bekannten HSS- und DHS-Sequenzen gefunden. Hierbei war ebenfalls die Primerkombination P1 und P2 in einer PCR mit cDNA aus jungen Keimpflanzen erfolgreich und ergab ein 728 bp langes Produkt (Details s. Tab. 3.1) Nach der erfolgreichen Klonierung ergaben Restriktionsanalysen der Plasmid-DNA aus verschiedenen *E. coli*-Klonen mit *EcoRI* auch in diesen Fall zwei unterschiedliche Muster (s. Abb. 3.1). Für den Sequenztyp „*merrquin_1*“ waren zwei Banden von 3000 bp und 700 bp charakteristisch, hingegen kennzeichneten drei Banden der Größen 3000 bp, 350 bp und 300 bp den Typ „*merrquin_2*“. Sequenzanalysen ergaben, dass beide Sequenzen eine Nukleinsäureidentität von 80 – 85 % zu bekannten HSS- und DHS-Sequenzen besitzen und sich voneinander zu 14 % unterscheiden. Somit konnten auch in *M. quinquefolia* zwei zu HSS und DHS homologe Sequenzen identifiziert werden.

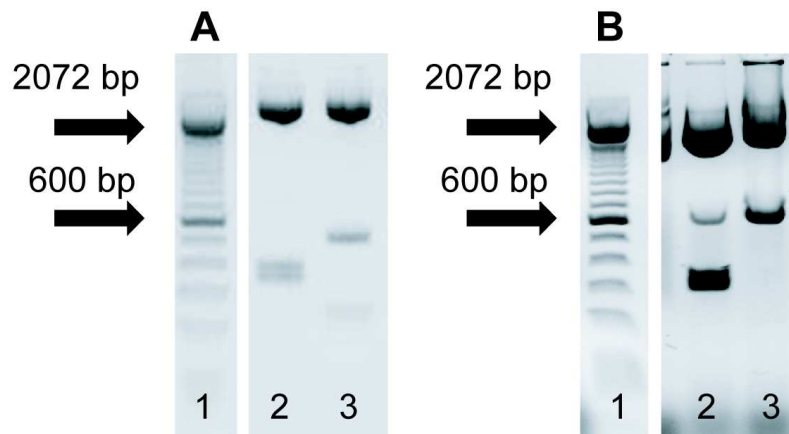


Abb. 3.1 Agarose Gelelektrophorese einer Restriktionsanalyse von Plasmid-DNA aus transformierten *E. coli* TOP10 Zellen. **A.** Restriktionsmuster der DOP-PCR-Produkte aus *I. neei* nach einem Restriktionsverdau mit *EcoRI* und *EcoRV*. Spur 1 100 bp DNA-Leiter von Invitrogen. Spur 2 Typ „*ipomnee1_2*“ mit Fragmenten der Größe 3000, 400 und 350 bp. Spur 3 Typ „*ipomnee1_1*“ mit Fragmenten der Größe 3000, 500 und 250 bp. **B.** Restriktionsmuster der DOP-PCR-Produkte aus *M. quinquefolia* nach einem Restriktionsverdau mit *EcoRI*. Spur 1 100 bp DNA-Leiter von Invitrogen. Spur 2 Typ „*merrquin_2*“ mit Fragmenten der Größe 3000, 350 und 300 bp. Eine Bande von 700 bp ist als Zeichen einer nicht vollständigen Restriktion zu erkennen. Spur 3 Typ „*merrquin_1*“ mit Fragmenten der Größe 3000 und 700 bp.

Den gleichen Arbeitsschritten folgend wurden aus *P. laevigata* ebenfalls zwei Sequenzfragmente identifiziert. Hierbei ergaben die Primer P3 und P4 in einer PCR mit cDNA aus dem Spross sowie den Wurzeln einer Sterilkulturpflanze eine 587 bp und 582 bp große Bande (Details s. Tab. 3.1). Auch in dem Fall bestätigten Sequenzanalysen eine hohe Nukleinsäureidentität beider Sequenzen zu bekannten HSS und DHS Sequenzen wobei sich die beiden Sequenzen aus *P. laevigata* zu 15 % voneinander unterschieden.

Tab. 3.1 DOP-PCR. Aufgelistet sind die PCR-Parameter, die eingesetzte cDNA und Primer sowie die erhaltenen PCR-Produkte.

internes Sequenz-fragment	Sequenz-Primer	Pflanzenorgan zur cDNA-Synthese	PCR-Parameter	PCR-Produkt
ipomneei_1 DHS ^{d)}	P1 for P2 rev	Spross Sterilkulturpflanze ^{b)}	<i>Taq</i> DNA-Polymerase TD ^{a)} 60-45 °C -0,5°C pro Zyklus 40 Zyklen insg.	726 bp
ipomneei_2 HSS ^{d)}	P1 for P2 rev	Spross Sterilkulturpflanze ^{b)}	<i>Taq</i> DNA-Polymerase TD ^{a)} 60-45 °C -0,5°C pro Zyklus 40 Zyklen insg.	726 bp
merrquin_1 DHS ^{d)}	P1 for P2 rev	Keimling Sterilkulturpflanze ^{c)}	<i>Taq</i> DNA-Polymerase Annealing-Temp. 56°C 35 Zyklen	728 bp
merrquin_2 HSS ^{d)}	P1 for P2 rev	Keimling Sterilkulturpflanze ^{c)}	<i>Taq</i> DNA-Polymerase Annealing-Temp. 56°C 35 Zyklen	728 bp
parslaev_1 DHS ^{d)}	P3 for P4 rev	Wurzel Sterilkulturpflanze ^{c)}	<i>Taq</i> DNA-Polymerase TD ^{a)} 60-45 °C -0,5°C pro Zyklus 40 Zyklen insg.	582 bp
parslaev_2 HSS ^{d)}	P3 for P4 rev	Spross Sterilkulturpflanze ^{c)}	<i>Taq</i> DNA-Polymerase TD ^{a)} 60-45 °C -0,5°C pro Zyklus 40 Zyklen insg.	587 bp

^{a)} „touch-down“ PCR-Temperaturprogramm

^{b)} cDNA-Synthese mit der RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas)

^{c)} cDNA-Synthese mit der Superscript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen)

^{d)} die Klassifizierung erfolgte nachträglich aufgrund der biochemischen Charakterisierung der Gesamtsequenz (s. Kap. 3.5)

3.2. Amplifizierung der 3'- und 5'-Enden der HSS- und DHS-kodierenden cDNAs

Die bereits identifizierten internen Fragmente der vermutlich HSS- und DHS-kodierenden cDNA-Sequenzen lieferten die Grundlage für die Amplifizierung der 3'- sowie 5'-Enden mit Hilfe der RACE-Technik (rapid amplification of cDNA ends). Basierend auf der bekannten Sequenz der internen Fragmente wurden genspezifische Primer entworfen. Generell war beim Primerentwurf zu beachten, dass die Primer in möglichst verschiedenen Bereichen der Sequenzpaare einer Art lagen, sodass mit Ihnen spezifisch die jeweiligen Sequen-

zen des Sequenzpaares amplifiziert werden konnten. Für die PCR-Amplifikation der 3'-Region wurde pro Sequenz jeweils ein genspezifischer Primer entworfen. Für die 5'-RACE waren drei genspezifische Primer erforderlich. Dabei wurde mit dem ersten Primer die reverse Transkription der mRNA durchgeführt wurde, die beiden weiteren genspezifischen Primer wurden für die PCR-Vervielfältigung als reverse-Primer verwendet. Insgesamt wurden für die RACE-Technik die Primer P5, P6 und P9-P28 entworfen. Deren Sequenzen sind in der Tab. 8.2 im Anhang aufgelistet. Zu erwähnen ist, dass als reverse-Primer in der 3'-RACE-PCR immer der oligo(dT)₁₇ Primer, der sich an den ubiquitären Poly(A)Schwanz der umgeschriebenen mRNA anlagert, zum Einsatz kam. In der 5'-RACE-PCR wurden als forward-Primer der sogenannte „abridged anchor primer“ (AAP) und der sogenannte „Abridged Universal Amplification Primer“ (AUAP) verwendet. Ebenfalls zu erwähnen ist der Einsatz der sogenannten „semi-nested PCR“ in der 5'-RACE. Hier wurde das PCR Produkt einer ersten PCR als Vorlage in einer zweiten PCR eingesetzt. Der genspezifische reverse-Primer bindet dabei innerhalb des genspezifischen Primers der ersten PCR.

Durch die erfolgreiche Anwendung der RACE-Methode konnte der offene Leserahmen der zu untersuchenden cDNA-Sequenzen identifiziert werden. Damit war die Basis für eine heterologe Expression und die anschließende Charakterisierung geschaffen (s. Kap. 3.3). Im Folgenden sind die Ergebnisse der 3'- sowie der 5'-RACE für die einzelnen Pflanzenarten geschildert. Zusammengefasst sind die Daten sowie die PCR-Parameter und die verwendeten Primer in Tab. 3.2 und Tab. 3.3.

3.2.1. *Ipomoea neei*

Für die 3'-RACE-PCR der Sequenz ipomneei_1 wurde der genspezifische Primer P5 und die aus dem Spross isolierte cDNA, die ebenfalls bei der DOP-PCR eine positive Bande ergab, als Template verwendet. Die optimale Annealing-Temperatur der PCR-Reaktion von 61,1°C wurde mit Hilfe eines Gradienten-Temperatur-Programmes im Eppendorf Gradienten-Cycler ermittelt. Bei dieser Annealing-Temperatur gelang es, ein 760 bp langes Fragment zu amplifizieren. Dieses Fragment zeigte einen Überlapp von 391 bp zu der internen Sequenz ipomneei_1. Das Fragment besitzt des weiteren ein Stoppcodon und einen 256 bp langen, nicht translatierten Bereich (3'-UTR), engl. „untranslated region“. Demnach konnte die Sequenz ipomneei_1 erfolgreich über das 3'-Ende des kodierenden Bereiches hinaus bis zum Poly(A)-Schwanz vervollständigt werden. Sequenzvergleiche des zu diesem Zeitpunkt

bekanntem Sequenzabschnittes von ipomneei_1, der nun das interne Fragment aus der DOP-PCR und den 3'-Bereich aus der RACE-PCR enthielt, mit der bereits bekannten cDNA-Sequenz der DHS aus *I. hederifolia* ergaben eine sehr hohe Nukleinsäureidentität von 97 %. Diese hohe Identität gab Anlass, genspezifische Primer (P7+P8), die für die Amplifikation des gesamten offenen Leserahmens (engl. open reading frame, ORF) der DHS aus *I. hederifolia* entworfen wurden, für die direkte Amplifikation des ORF von ipomneei_1 zu verwenden. Da diese PCR erfolgreich verlief und somit die Sequenz bis zu dem Startcodon bekannt war, konnte für ipomneei_1 auf die 5'-RACE-PCR verzichtet werden.

Die 3'-RACE-PCR für das interne Fragment ipomneei_2 ergab mit Spross-cDNA aus einer Sterilkulturpflanze und dem genspezifischen Primer P6 in einem Standard-PCR-Ansatz mit der *Taq* DNA-Polymerase (Annealingtemperatur 63°C, 35 Zyklen) ein schwaches PCR-Produkt von ca. 1000 bp Länge. Nach Reinigung dieser schwachen Bande konnte durch erneute Amplifikation des 1:10 verdünnten Produktes in einer weiteren PCR-Reaktion (s. Tab. 3.2) eine starke und scharfe Bande erzielt werden, die erfolgreich kloniert werden konnte. Dieses Fragment mit 684 bp Länge besitzt einen 255 bp langen Überlapp zum internen Bereich der Sequenz ipomneei_2, ein Stoppcodon, den charakteristischen 3'-Poly(A)-Schwanz und eine 328 bp lange 3'-UTR. Für die 5'-RACE wurde ebenfalls RNA aus dem Spross einer Sterilkulturpflanze eingesetzt und mit dem genspezifischen Primer P15 umgeschrieben. Nach einer ersten 5'-RACE-PCR mit den Primern P16 und AAP ergab die semi-nested PCR mit dem 1:100 verdünnten ersten PCR-Ansatzes als Vorlage und den Primern P17 und AUAP eine schwache Bande bei 900 bp. Die genauen PCR-Parameter sind in Tab. 3.3 zusammengefasst. Diese schwache Bande wurde aufgereinigt und als Vorlage in einer dritten PCR mit der Primerkombination P17/AUAP reamplifiziert (PCR Parameter gleich 5'-RACE-PCR 1, Tab. 3.3). Dadurch gelang es, ein für eine Klonierung ausreichend starkes PCR-Produkt zu erhalten. Die Sequenzierung ergab, dass dieses 908 bp lange Produkt einen Sequenzüberlapp von 512 bp zu dem internen Fragment besitzt. Zudem beinhaltet das 5'-RACE –Fragment den angeknüpften oligo(dC)-Schwanz am 5'-Ende, einen 5'-UTR mit einer Länge von 79 bp und das Translations-Initiations- bzw. Startcodon (ATG). Dabei entspricht die Lage des Startcodons der von anderen, bereits bekannten, HSS- und DHS-kodierenden cDNA-Sequenzen.

3.2.2. *Merremia quinquefolia*

Die 3'-RACE-PCR für die beiden internen Sequenzen aus *M. quinquefolia* mit den sequenzspezifischen forward-Primern P9 und P10 ergaben PCR-Produkte mit 684 bp für merrquin_1 und 786 bp für die merrquin_2. Als Vorlage kam die bereits in der DOP-PCR erfolgreich eingesetzte cDNA aus Keimlingen zum Einsatz. Das 3'-RACE-Produkt von merrquin_1 zeigte eine 333 bp lange UTR sowie den charakteristischen Poly(A)-Schwanz. Es überlappte mit der internen Sequenz um 241 bp. Analog dazu besaß das 3'-RACE-Produkt von merrquin_2 eine 155 bp lange UTR und einen 512 bp zählenden Überlapp zur internen Sequenz. Für die 5'-RACE wurde ebenfalls RNA aus jungen Keimpflanzen mit dem Primer P18 umgeschrieben und nach dem oligo(dC)-tailing als Vorlage für die 5'-RACE-PCR eingesetzt. Das 5'-Ende der Sequenz merrquin_1 konnte durch zwei Amplifikationszyklen mit den Primern P19/AAP und P20/AUAP vervielfältigt werden. In Sequenzvergleichen zeigte dieses 849 bp lange Fragment einen 409 bp langen Überlapp zur internen Sequenz. Darüber hinaus beinhaltete das Fragment neben den für die RACE-Technik typischen oligo(dC)-Schwanz das Startcodon (ATG). In analoger Weise konnte auch für merrquin_2 das 5'-Ende amplifiziert werden, wobei die Details in Tab. 3.3 zusammengefasst sind.

3.2.3. *Parsonsia laevigata*

Die 3'-RACE-PCR von parslaev_1 mit P11 als genspezifischen Primer und cDNA aus der Wurzel ergab ein 709 bp langes Amplifikat mit einem 425 bp langen Überlapp zur internen Sequenz. Für die zweite Sequenz aus *P. laevigata*, parslaev_2, musste die AccuTaq DNA-Polymerase eingesetzt werden. Mit dieser Polymerase konnte ein 739 bp langes Fragment amplifiziert werden, das sowohl das Stoppcodon sowie den typischen Poly(A)-Schwanz enthielt. Die genauen Daten sind in der Tab. 3.2 zusammengefasst. Ebenso gelang die Amplifikation des 5'-Endes beider Sequenzen (s. Tab. 3.3), wobei eine dritte PCR für die Amplifikation von parslaev_1 erforderlich war. In dieser dritten PCR wurde das gereinigte PCR-Produkt aus der zweiten (semi-nested) PCR als Vorlage (1:100 verdünnt) eingesetzt. Dadurch wurde eine zur Klonierung geeignete PCR-Bande erhalten.

Tab. 3.2 3'-RACE. Aufgelistet sind PCR-Parameter, Primer, eingesetzte cDNA und die Ergebnisse der PCR.

internes Sequenzfragment	RACE Primer	Pflanzenorgan zur cDNA-Synthese	PCR-Parameter	3'-RACE Produkt ^{a)}
ipomneei_1 DHS ^{d)}	P5	Spross ^{a)}	Taq DNA-Polymerase Annealing-Temp. 60,4 °C 35 Zyklen	760 bp
ipomneei_2 HSS ^{d)}	P6	Spross ^{a)}	AccuTaq DNA-Polymerase Annealing-Temp. 63°C 35 Zyklen	684 bp
merrquin_1 DHS ^{d)}	P9	Keimling ^{b)}	Taq DNA-Polymerase Annealing-Temp. 64°C 35 Zyklen	684 bp
merrquin_2 HSS ^{d)}	P10	Keimling ^{b)}	Taq DNA-Polymerase Annealing-Temp. 62°C 35 Zyklen	786 bp
parslaev_1 DHS ^{d)}	P11	Wurzel ^{b)}	Taq DNA-Polymerase Annealing-Temp. 62,5°C 35 Zyklen	709 bp
parslaev_2 HSS ^{d)}	P12	junge Spitzen ^{b)}	AccuTaq DNA-Polymerase TD ^{c)} 65-55°C -0,5°C pro Zyklus 35 Zyklen	739 bp

^{a)} cDNA-Synthese mit der RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas)

^{b)} cDNA-Synthese mit der Superscript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen)

^{c)} „touch-down“ PCR-Temperaturprogramm

^{d)} die Klassifizierung erfolgte nachträglich aufgrund der biochemischen Charakterisierung der Gesamtsequenz (s. Kap. 3.5)

Tab. 3.3 5'-RACE. Aufgelistet sind PCR-Parameter, Primer, eingesetzte cDNA und die Ergebnisse der PCR.

internes Sequenzfragment	RACE Primer	Pflanzenorgan zur cDNA-Synthese	PCR-Parameter 5'-Race-PCR 1	5'-RACE-PCR 2 (semi-nested PCR)	5'-RACE Produkt
ipomneei_2 HSS ^{d)}	P15-P17	Spross ^{a)}	Taq DNA-Polymerase Annealing-Temp. 65°C 35 Zyklen	Taq DNA-Polymerase Annealing-Temp. 68°C 35 Zyklen	908 bp
merrquin_1 DHS ^{d)}	P18-P20	Keimling ^{c)}	AccuTaq DNA-Polymerase Annealing-Temp. 62°C 35 Zyklen	AccuTaq DNA-Polymerase Annealing-Temp. 62°C 35 Zyklen	849 bp
merrquin_2 HSS ^{d)}	P18 P21-P22	Keimling ^{b)}	Taq DNA-Polymerase Annealing-Temp. 62°C 35 Zyklen	Taq DNA-Polymerase Annealing-Temp. 62°C 35 Zyklen	743 bp
parslaev_1 DHS ^{d)}	P23-P25	Wurzel ^{b)}	Taq DNA-Polymerase Annealing-Temp. 62°C 35 Zyklen	Pfx DNA-Polymerase Annealing-Temp. 63,5°C 35 Zyklen	698 bp
parslaev_2 HSS ^{d)}	P26-P28	junge Spitzen ^{b)}	Taq DNA-Polymerase Annealing-Temp. 61°C 35 Zyklen	Taq DNA-Polymerase Annealing-Temp. 65°C 35 Zyklen	764 bp

^{a)} cDNA-Synthese mit der RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas)

^{b)} cDNA-Synthese mit der Superscript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen)

^{c)} cDNA-Synthese mit der Superscript™ III Reverse Transcriptase (Invitrogen)

^{d)} die Klassifizierung erfolgte nachträglich aufgrund der biochemischen Charakterisierung der Gesamtsequenz (s. Kap. 3.5)

Zusammenfassend konnten durch die RACE-Technik insgesamt sechs putative HSS- und DHS-kodierende cDNA Sequenzen aus den Arten *I. neei*, *M. quinquefolia* und *P. laevigata* vervollständigt werden. In der nachstehenden Tabelle (Tab. 3.4) sind die Daten bezüglich Länge, Sequenzüberlapp zum internen Fragment aus der DOP-PCR, sowie die Länge der UTR zusammengefasst.

Tab. 3.4 Ergebnisse der RACE-Technik und Charakteristika der vervollständigten cDNA-Sequenzen

cDNA-Sequenz	3'-RACE Produkt	5'-RACE Produkt	Überlapp zum internen Fragment ^{a)}	Gesamtlänge	3'-UTR	5'-UTR
ipomneei_1 DHS ^{b)}	760 bp	-	391 bp	-	256 bp	-
ipomneei_2 HSS ^{b)}	684 bp	908 bp	255 bp 512 bp	1536 bp	328 bp	79 bp
merrquin_1 DHS ^{b)}	684 bp	849 bp	241 bp 409 bp	1611 bp	333 bp	137 bp
merrquin_2 HSS ^{b)}	786 bp	743 bp	512 bp 390 bp	1337 bp	155 bp	62 bp
parslaev_1 DHS ^{b)}	709 bp	698 bp	425 bp 233 bp	1332 bp	160 bp	57 bp
parslaev_2 HSS ^{b)}	739 bp	764 bp	253 bp 232 bp	1528 bp	385 bp	106 bp

^{a)} in der ersten Zeile ist der Überlapp der 3'-RACE Produktes angegeben, darunter jener des 5'-RACE Produktes

^{b)} die Klassifizierung erfolgte nachträglich aufgrund der biochemischen Charakterisierung der Gesamtsequenz (s. Kap. 3.5)

3.3. Amplifizierung des gesamten kodierenden Bereichs der putativen HSS- und DHS-kodierenden cDNAs und deren heterologe Expression in *E. coli*

Generell können aufgrund von Sequenzdaten nur Hinweise auf die katalytische Funktion der kodierten Enzyme abgeleitet werden. Ein hoher Grad an Sequenzähnlichkeit zu einer Sequenz mit bekannter Funktion ist jedoch keine Garantie dafür, dass zwei Proteine die gleiche Substratspezifität oder katalytische Aktivität besitzt (Fridman und Pichersky 2005). Erst durch eine biochemische Charakterisierung der sechs identifizierten Sequenzen konnten die enzymatischen Eigenschaften aufgeklärt und eine eindeutige Klassifizierung als DHS und HSS vorgenommen werden. Für diese Charakterisierung erfolgte eine Klonierung des offenen Leserahmens, engl. „open reading frame“ (ORF) in geeignete Expressionsvektoren zwecks anschließender heterologer Expression. Die rekombinanten Proteine dienten nachfolgend zur Untersuchung der katalytischen Aktivitäten (s. Kap. 3.5). Zudem ermöglichten

sie die Herstellung polyklonaler Antikörper und eröffneten so die Möglichkeit zur Anwendung immunologischer Techniken für Expressionsanalysen (s. Kap. 3.7.2).

Zunächst wurde der ORF der jeweiligen cDNA mit Hilfe von genspezifischen Primer, die auf der Basis der vervollständigten cDNA-Sequenzen (s. Kap. 3.2) entworfen wurden, amplifiziert. Dabei war zu beachten, dass die Primer die entsprechenden Restriktionsschnittstellen für die anschließende Klonierung in das Expressions-Plasmid enthielten. Die Expressionsprimer für die PCR-Amplifizierung sind in Tab. 3.5 mit den verwendeten Restriktionsschnittstellen aufgelistet. Des weiteren sind die für die cDNA-Synthese verwendeten Pflanzenorgane angegeben sowie die entsprechenden PCR-Parameter und die eingesetzten DNA-Polymerasen. Wichtig war die Verwendung von so genannten „proof-reading“ DNA-Polymerasen, die durch eine 3'-5'-Exonuclease-Aktivität eine Korrekturaktivität während der Strangsynthese besitzen. Dadurch wurde die Fehlerrate während der PCR-Amplifikation gering gehalten. Bezüglich der Primer für die Amplifizierung der vermutlichen DHS-kodierenden cDNA aus *I. neei* wurden die bereits publizierten genspezifischen Primer für die homologe Sequenz der nahverwandten Art *I. hederifolia* verwendet (Reimann et al. 2004). Der ursprüngliche reverse-Primer (P8) wurde jedoch für die Klonierung in den Expressionsvektor hinsichtlich der Restriktionsschnittstelle modifiziert (P29).

Die den ORFs entsprechenden Sequenzbereiche wurden nach der PCR-Vervielfältigung in einen Expressionsvektor kloniert. Mit Hilfe dieses Vektors wurde ein Oligo-Histidin-Rest, bestehend aus sechs aufeinander folgenden Histidin-Bausteinen, an das C- oder N-terminale Ende der Sequenz angeknüpft. Dieses im Folgenden als 6xHis-tag bezeichnete Motiv ermöglichte eine anschließende Reinigung der überexprimierten Proteine über Metallchelataffinitätschromatographie. Für die Wahl der Expressionsvektoren waren in erster Linie die für die Klonierung verwendeten Schnittstellen ausschlaggebend. Die nötigen Restriktionsenzyme durften nicht in der Sequenz des ORF schneiden. Für die meisten Sequenzen eignete sich der pET22b/23a Vektor. Dieser Vektor ist ein Mischkonstrukt aus den Plasmiden pET22b und pET23a wobei die multiple Klonierungsstelle von pET22b in den pET23a-Vektor transferiert wurde. Die Restriktion von Insert und Vektor erfolgte mit den Enzymen *NdeI* und *XhoI*. Für beide Enzyme trägt der Vektor pET22b/23a Erkennungssequenzen in der multiplen Klonierungsstelle. Darüber hinaus ermöglichte der Vektor bei Verwendung dieser Schnittstellen das Anknüpfen eines 6xHis-tags am C-Terminus der zu

klonierenden Sequenz und die Expression dieser rekombinanten Sequenz unter Kontrolle des T7 Promotors. Da beide Sequenzen aus *P. laevigata* eine *NdeI*-Schnittstelle im ORF enthielten, wurde für deren Klonierung und Expression mit einem C-terminalen 6xHis-tag ein modifizierter pET28a-Vektor eingesetzt (pET28a-mod*PstI*). Dieser Vektor enthielt anstelle der *NcoI*-Restriktionsstelle in der multiplen Klonierungsstelle eine *PstI*-Schnittstelle, die auch für die Klonierung genutzt wurde (s. Tab. 3.5). Um hingegen ein N-terminales 6xHis-tag an die Sequenz *parslaev_2* zu knüpfen, wurde der unmodifizierte pET28a-Vektor und die Schnittstellen *NdeI* + *EcoRI* der multiple Klonierungsstelle verwendet. Da der ORF von *parslaev_2* ebenfalls eine Schnittstelle für *NdeI* trägt, wurde die zu inserierende DNA, also *parslaev_2*, mit *VspI*, das zu *NdeI* kompatible Enden erzeugt, und *EcoRI* geschnitten. Zur Expression wurden *E. coli* BL21(DE3)-Zellen gewählt. Zuvor erfolgte eine Zwischen-Klonierung in *E. coli* TOP10-Zellen zur Kontrolle und Vermehrung der Expressionskonstrukte. Die eigentliche Expression erwies sich unter Standardbedingungen (s. Kap. 2.2.13) bei 37°C als unproblematisch. Ein Teil der überexprimierten Proteine bildeten sogenannte Einschlusskörperchen“ (engl. inclusion bodies), allerdings war ein großer Teil löslich und somit für die nachfolgende Reinigung zugänglich.

Zusammengefasst konnten von *I. neei* zwei cDNAs mit einem ORF von 1149 bp und 1131 bp zur Expression gebracht werden. In Sequenzvergleichen mit der DHS kodierenden cDNA aus *I. hederifolia* (GenBank Akzessionsnummer AJ704844) zeigte *ipomneei_1ORF* eine Nukleinsäureidentität von 98%, hingegen *ipomneei_2ORF* nur eine 87%ige Identität. Die ORFs kodieren für Proteine mit 383 bzw. 377 Aminosäuren und einer molekularen Masse von 42,2 bzw. 41,6 kDa. In den SDS-Gelen zur Überprüfung der heterologen Expression waren die rekombinanten Proteine als deutlich Banden auf Höhe der 45 kDa Bande sichtbar (s. Abb. 3.2). Die ORFs der cDNAs aus *M. quinquefolia*, *merrquin_1ORF* und *merrquin_2ORF*, weisen eine Länge von 1143 bp bzw. 1122 bp auf. Sie kodieren Proteine mit 381 bzw. 374 Aminosäuren und einer molaren Masse von 42,1 bzw. 41,3 kDa. Vergleiche zu der DHS-kodierenden cDNA aus *I. hederifolia* ergaben eine Sequenzidentität von 94% bei *merrquin_1ORF* und 86% bei *merrquin_2ORF* auf Nukleinsäureebene. Damit ist zu beobachten, dass jeweils eine Sequenz eines jeden Sequenzpaares eine deutlich höhere Identität zur bereits funktionell charakterisierten DHS aus *I. hederifolia* zeigt. Für die beiden cDNA-Sequenzen aus *P. laevigata* ist dies nicht zu beobachten. *Parslaev_1* (1107 bp) und *parslaev_2* (1125 bp), die Proteine von 369 und 375 Aminosäuren bzw. 40,9 und 41,9

kDa kodieren, zeigen auf Ebene der Nukleinsäure eine Identität von 75-80 % zu anderen HSS- und DHS-kodierenden cDNAs. Im direkten Vergleich zueinander entsprechen sich die beiden Sequenzen zu 82% auf Nukleinsäureebene.

Tab. 3.5 Klonierungsstrategie des ORF der HSS- und DHS-kodierenden cDNAs. Aufgelistet sind die PCR-Parameter zur Amplifizierung des ORF mit den Primern und der als Vorlage verwendeten cDNA. Des Weiteren sind die verwendeten Expressionsvektoren inklusive der Schnittstellen für die Klonierung angegeben. Der Vektor-kodierte 6xHis-tag wurde an das C-terminale Ende geknüpft, einzig bei der Klonierung von *parslaev_2** kam ein N-terminales 6xHis-tag zum Einsatz.

Sequenz	Expressions-Primer ^{a)}	Expressionsvektor ^{a)}	Pflanzenorgan zur cDNA Synthese	PCR-Parameter	Länge des ORF ^{f)}
ipomneei_1 DHS ^{e)}	P7 for (<i>Nde</i> I) P29 rev (<i>Xho</i> I)	pET22b/23a (<i>Nde</i> I + <i>Xho</i> I)	Spross, Sterilkulturpflanze ^{b)}	<i>Pfx</i> DNA-Polymerase, Annealing-Temp. 64°C 35 Zyklen	1149 bp
ipomneei_2 HSS ^{e)}	P30 for (<i>Nde</i> I) P31 rev (<i>Xho</i> I)	pET22b/23a (<i>Nde</i> I + <i>Xho</i> I)	Spross, Sterilkulturpflanze ^{b)}	<i>Pfu</i> DNA-Polymerase, Annealing-Temp. 65°C 35 Zyklen	1131 bp
merrquin_1 DHS ^{e)}	P32 for (<i>Nde</i> I) P33 rev (<i>Xho</i> I)	pET22b/23a (<i>Nde</i> I + <i>Xho</i> I)	Keimpflanze ^{c)}	AccuTaq DNA-Polymerase, Annealing-Temp. 62°C 35 Zyklen	1143 bp
merrquin_2 HSS ^{e)}	P34 for (<i>Nde</i> I) P35 rev (<i>Xho</i> I)	pET22b/23a (<i>Nde</i> I + <i>Xho</i> I)	Keimpflanze ^{c)}	AccuTaq DNA-Polymerase Annealing-Temp. 62°C 35 Zyklen	1128 bp
parslaev_1 DHS ^{e)}	P36 for (<i>Pst</i> I) P37 rev (<i>Xho</i> I)	pET28a mod <i>Pst</i> I ^{d)} (<i>Pst</i> I + <i>Xho</i> I)	Wurzel ^{e)}	<i>Pfx</i> DNA-Polymerase, Annealing-Temp. 65°C 35 Zyklen	1107 bp
parslaev_2 HSS ^{e)}	P38 for (<i>Pst</i> I) P39 rev <i>Xho</i> I)	pET28a mod <i>Pst</i> I ^{d)} (<i>Pst</i> I + <i>Xho</i> I)	Spross ^{e)}	<i>Pfx</i> DNA-Polymerase Annealing-Temp. 62°C 35 Zyklen	1125 bp
parslaev_2* HSS ^{e)}	P40 for (<i>Vsp</i> I) P41 rev (<i>Eco</i> RI)	pET28a (<i>Nde</i> I + <i>Eco</i> RI)	Spross ^{e)}	<i>Pfu</i> DNA-Polymerase, Annealing-Temp. 62°C 40 Zyklen	1098 bp

^{a)} in Klammer sind die für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen angegeben

^{b)} cDNA-Synthese mit der RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas)

^{c)} cDNA-Synthese mit der Superscript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen)

^{d)} pET28a mod *Pst*I: die *Nco*I Restriktionsstelle des Vektors pET28a ist durch eine *Pst*I Schnittstelle ersetzt worden

^{e)} die Klassifizierung erfolgte nachträglich aufgrund der biochemischen Charakterisierung der Gesamtsequenz (s. Kap. 3.5)

^{f)} das Stoppcodon wurde bei der Anknüpfung eines C-terminalen 6xHis-tag nicht mit amplifiziert

In Abb. 3.2 ist beispielhaft ein SDS-Gel einer Expressionskultur von *ipomneei_2* aus *I. neei* (cDNA im pET22a/23b-Plasmid) sowie *parslaev_2* aus *P. laevigata* (cDNA im pET28a-Plasmid) gezeigt. Auffallend ist die starke Expression von *ipomneei_2* unter der Kontrolle eines einfachen T7 Promotors bereits vor der Induktion mit IPTG (s. Kap. 2.2.13).

Im Gegensatz dazu zeigt *parslaev_2* unter Kontrolle eines kombinierten T7/lac-Promoters eine deutliche Unterdrückung der Expression vor Induktion.

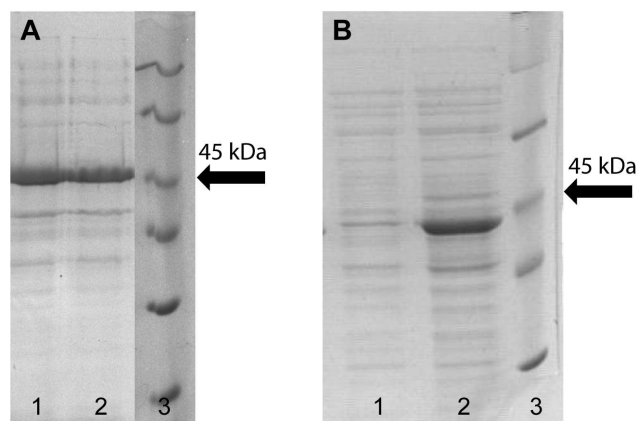


Abb. 3.2 Heterologe Expression von *ipomneei_2* und *parslaev_2* in *E. coli* BL21-Kulturen. Abgebildet sind Coomassie-gefärbte SDS-Gele (12%). Aufgetragen wurden jeweils 10 μ l Bakterienkultur. Spur 1 uninduzierte Kultur; Spur 2 induzierte Kultur; Spur 3 Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas). **A.** Expression der *ipomneei_2* cDNA in pET22b/23a mit C-terminalem 6xHis-tag. **B.** Expression der *parslaev_2* cDNA in pET28a mit N-terminalem 6xHis-tag. Im pET22b/23a mit einfachem T7-Promotor ist eine deutliche Expression auch in den nicht-induzierten Zellen sichtbar.

3.4. Reinigung der heterolog exprimierten Proteine über Affinitätschromatographie

Nach der Überexpression der rekombinanten Proteine erlaubte das durch den Vektor angefügte 6xHis-tag eine Reinigung durch Ni-NTA-Affinitätschromatographie. Einzig das Konstrukt *parslaev_2* in pET28a mod *Pst*I bereitete hierbei gewisse Schwierigkeiten. Das rekombinante Protein dieses Konstruktes zeigte keine Bindung an die Affinitätssäule. Auch Modifikationen der Bindungs- und Waschlösung oder die Anwendung einer Kobalt-Affinitätschromatographie (Talon[®] IMAC Resins, Clontech, BD Bioscience) führten zu keiner erfolgreichen Bindung des überexprimierten Proteins. Möglicherweise war durch die spezifische Sekundär- und Tertiärstruktur des rekombinanten Proteins der C-terminale 6xHis-tag sterisch nicht zugänglich und konnte demnach nicht binden. Durch die Verschiebung des 6xHis-tags an den N-Terminus konnten diese Schwierigkeiten beseitigt und das überexprimierte Protein unter Standardbedingungen gereinigt werden. Dazu wurde die Sequenz mit den Primern P40/P41 amplifiziert und in den unmodifizierten Vektor pET28a kloniert (s. Tab. 3.5). Die PCR ergab überraschenderweise eine Sequenz, *parslaev_2**, mit einem Stoppcodon 27 bp vor dem Stoppcodon der ursprünglichen, mittels RACE-Technik identifizierten Sequenz *parslaev_2*. Dadurch kodierte *parslaev_2** ein um 9 Aminosäuren ver-

kürztes Protein mit insgesamt 366 Aminosäuren und 40,7 kDa molarer Masse. Diese neue Position des Stoppcodons in der Sequenz *parslaev_2** wurde durch eine wiederholte 3'-RACE überprüft und dabei verifiziert. Das Stoppcodon der Sequenz *parslaev_2* bei 1122 bp scheint ein Artefakt. Die Expression und Reinigung der korrigierten Sequenz *parslaev_2** verlief im weiteren routinemäßig. Hervorzuheben ist jedoch, dass die reverse Primer P39 und P41 für die Vervielfältigung des ORF letztlich auf der Basis der inkorrekten Sequenz entworfen wurden und demnach einen Fehler beinhalten. Für die genspezifische Amplifizierung der HSS Sequenzen, auch in RT-PCR Experimenten (s. auch Kap. 3.7 und 3.7.3) scheint sich dieser Fehler allerdings nicht nachteilig auszuwirken.

In Abb. 3.3 ist beispielhaft die SDS-Kontrolle einer Standardreinigung der rekombinanten HSS und DHS aus *M. quinquefolia* dargestellt.

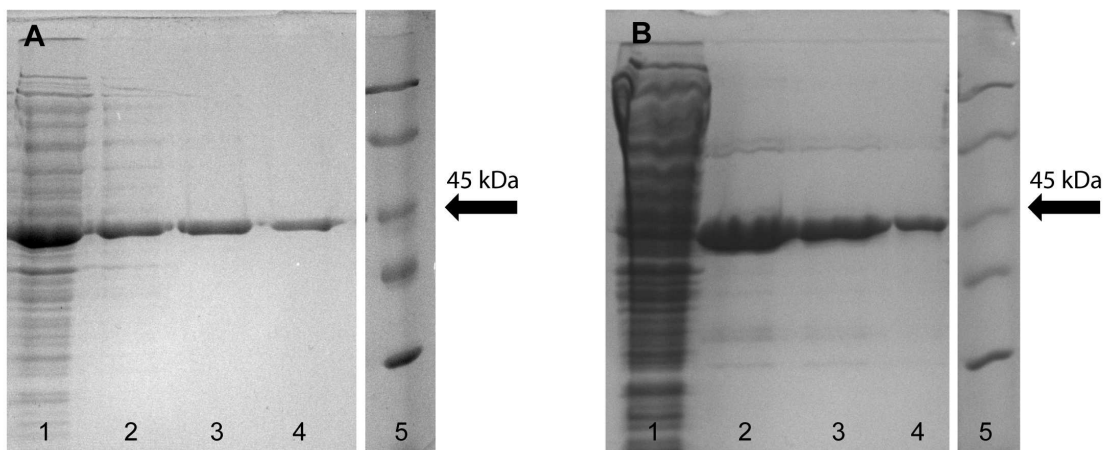


Abb. 3.3 Reinigung der rekombinanten DHS (A) und HSS (B) aus *M. quinquefolia*. Abgebildet sind Coomassie-gefärbte SDS-Gele (12%). Aufgetragen wurden jeweils 10 μ l Probe. Spur 1 Durchlauf nach der Bindung der rekombinanten Proteine an die Affinitätsäule; Spur 2 – 4 Elutionsfraktionen E1-E3 zu je 500 ml (s. dazu Kap. 2.3.1); Spur 5 Unstained Protein Molecular Weight Marker (Fermentas).

3.5. Biochemische Charakterisierung der gereinigten rekombinanten Proteine

Die biochemische Aktivität der über die Ni-NTA-Affinitätschromatographie gereinigten Proteine konnte in spezifischen Assays ermittelt werden. Dabei wurde die Fähigkeit der rekombinanten Proteine untersucht, einen Aminobutylrest von Spermidin in Gegenwart von NAD^+ auf einen Akzeptor zu übertragen. Zum einen wurde Putrescin, zum anderen das eIF5A-Vorstufen-Protein als Aminobutyl-Akzeptor verwendet. Die hohe Sequenzidentität des ubiquitär in den Archaeobakterien und Eukaryoten vorkommenden eIF5A und dessen streng konservierter Aktivierungsmechanismus ermöglichten den Einsatz eines gereinigten,

rekombinanten eIF5A-Vorstufen-Protein aus *Senecio vernalis* (Ober und Hartmann 1999b). Auch in vorhergehenden Untersuchungen von DHS-Proteinen aus unterschiedlichen Pflanzenarten wurde das eIF5A-Vorstufen-Protein aus *Senecio vernalis* verwendet. Dabei wurde es mit ähnlicher Aktivität umgesetzt wie arteigene eIF5A-Vorstufen-Proteine (Reimann et al. 2004). Die Bildung von ¹⁴C-markierten Produkten, zum einen ¹⁴C-Homospermidin und zum anderen ¹⁴C-eIF5A, diente als Maß für die Aktivität der rekombinanten Proteine mit den jeweiligen Substraten und ermöglichte die Klassifizierung der rekombinanten Enzyme. Dabei sind DHS-Enzyme charakterisiert durch die Fähigkeit, den eIF5A als Aminobutyl-Akzeptor zu verwenden. Manche zeigen jedoch auch eine niedrige Aktivität mit Putrescin als Akzeptor. Bisher eindeutig als HSS charakterisierte Enzyme hingegen können nur Putrescin als Aminobutyl-Akzeptor verwenden (Ober et al. 2003b; Nurhayati und Ober 2005). Abb. 3.4 veranschaulicht diese Charakteristika schematisch, der genaue Reaktionsmechanismus ist in Kap. 1.3 ausgeführt und dargestellt.

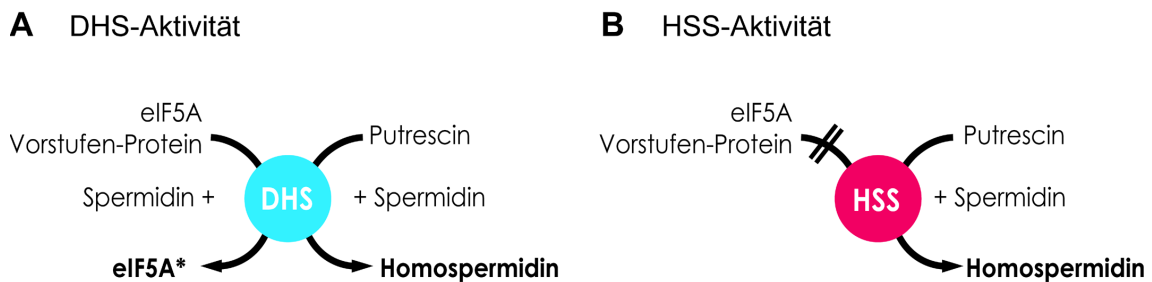


Abb. 3.4 Schematische Darstellung der DHS- und HSS-Aktivität. **A.** Die DHS kann sowohl das eIF5A-Vorstufen-Protein als auch Putrescin als Aminobutyl-Akzeptor verwenden. **B.** Die HSS kann nur Putrescin als Aminobutyl-Akzeptor umsetzen, hingegen das eIF5A-Vorstufen-Protein kann nicht mehr binden und demnach nicht umgesetzt werden (Ober et al. 2003b).

In der Tab. 3.6 sind die spezifischen Aktivitäten (pkat/mg) der rekombinanten Proteine aus *I. neei*, *M. quinquefolia* und *P. laevigata* mit den Substraten eIF5A und Putrescin zusammengefasst. Zusammenfassend konnten von jedem Sequenzpaar der drei untersuchten Arten je eine Sequenz als typische DHS bzw. HSS charakterisiert werden. In den Convolvulaceen zeichneten sich die Enzyme kodiert durch die Sequenzen ipomneei_1 und merrquin_1 durch eine hohe Aktivität mit dem eIF5A Vorstufen-Protein bei gleichzeitiger niedriger Aktivität mit Putrescin aus. Gleiches trifft auf die Sequenz parslaev_1 aus *P. laevigata* zu. Diese Aktivitäten sind mit den Eigenschaften der bereits beschriebenen DHS-Enzyme konform. Auf der anderen Seite zeigten die Enzyme kodiert durch die Sequenzen

ipomneei_2, merrquin_2 und parslaev_2* eine hohe Aktivität mit Putrescin als Substrat, jedoch eine niedrige bzw. im Fall von merrquin_2 und parslaev_2* nicht detektierbare Aktivität mit dem eIF5A-Vorstufen-Protein als Substrat. Damit entsprechen ihre Eigenschaften denen jener HSS-Proteine, die bereits aus anderen Angiospermen identifiziert und charakterisiert wurden (Ober und Hartmann 1999b; Ober et al. 2003b; Reimann et al. 2004). Basierend auf diesen biochemischen Eigenschaften konnten die Enzyme, kodiert durch die Sequenzen ipomneei_1, merrquin_1 und parslaev_1 als DHS, hingegen die Enzyme, kodiert durch ipomneei_2, merrquin_2 und parslaev_2* als HSS klassifiziert werden.

Tab. 3.6 Spezifische Aktivität der gereinigten, rekombinanten Proteine, deren cDNA-Sequenzen aus *I. neei*, *M. quinquefolia*, *P. laevigata* identifiziert wurden.

Sequenz	HSS-Assay	DHS-Assay	6xHis-tag
	Aminobutyl-Akzeptor Putrescin	Aminobutyl-Akzeptor eIF5A	
ipomneei_1 DHS	94 pkat/mg	45 pkat/mg	C-terminal
ipomneei_2 HSS	1083 pkat/mg	6,3 pkat/mg	C-terminal
merrquin_1 DHS	96 pkat/mg	53 pkat/mg	C-terminal
merrquin_2 HSS	1102 pkat/mg	nicht detektierbar ^{a)}	C-terminal
parslaev_1 DHS	274 pkat/mg	288 pkat/mg	C-terminal
parslaev_2* HSS	2265 pkat/mg	nicht detektierbar ^{a)}	N-terminal

^{a)} die gemessene Radioaktivität dieser Proben lag mit 100 – 200 dpm im Bereich der Hintergrundstrahlung. Demnach konnte keine spezifische Aktivität detektiert werden.

3.6. Amplifizierung homologer Sequenzen in weiteren *Ipomoea* Arten

Bisher war es gelungen, aus den beiden phylogenetisch weit entfernt stehenden Arten der Convolvulaceae, *I. neei* und *M. quinquefolia*, sowohl HSS- aus auch DHS-Enzyme zu identifizieren. Für die phylogenetische Untersuchung hinsichtlich der HSS-Rekrutierung innerhalb dieser Familie mit dem verstreuten Vorkommen an PAs (s. Kap. 1.4.1) war es erforderlich, weitere HSS- und DHS-kodierende Sequenzen zu identifizieren. Hierbei war das Hauptaugenmerk auf *I. meyeri* (Spreng.) G. DON gerichtet. In den Wurzeln dieser Art wurden Turneforicidin-Derivate, PAs des Triangulin-Typs, nachgewiesen (Mann 1997). Interessanterweise zählt *I. meyeri* nicht zur Sectio Mina, jener Sektion innerhalb der Convolvulaceen, auf die sich das Vorkommen von Estern gesättigter Necinbasen konzentriert. Besonders durch diese systematische Stellung und dem Vorkommen eines abweichenden

PA-Typus stellte *I. meyeri* einen spannenden Kandidaten für die Untersuchung der Evolution der HSS dar. Ähnlich zur Gattung *Merremia* stellte sich die Frage, ob die HSS in dieser Art möglicherweise unabhängig entstanden war.

Auf der Basis der bereits vorhandenen Ergebnisse konnte ein neuer Versuchsansatz verwendet werden. Vor allem der bereits erwähnte erfolgreiche Versuch, die DHS-kodierende cDNA aus *I. neei* mit genspezifischen Primern für die DHS-kodierende cDNA-Sequenz aus *I. hederifolia* zu amplifizieren (s. Kap. 3.2.1) und für die Expression zu nutzen (s. Kap. 3.3), gab den Anlass, weitere homologe Sequenzen in verwandten *Ipomoea*-Arten mit diesen eigentlich genspezifischen Primern zu suchen. Voraussetzung für einen Erfolg war eine besonders hohe Sequenzähnlichkeit über die Artgrenzen hinweg, wie sie etwa bei den cDNA-Sequenzen der DHS aus *I. neei* und *I. hederifolia* mit 98 % zu finden ist. Verwendet wurden hierzu die Primer zur Amplifizierung der HSS aus *I. neei* (P30+P31) und der DHS aus *I. hederifolia* (P7+P29). Dabei ist zu beachten, dass diese Primer mit dem Ziel zur Klonierung in den Expressionsvektor pET22b/23a und der Anknüpfung eines C-terminalen 6xHis-tag entworfen wurden und damit kein Stoppcodon amplifizieren.

Dieser Versuchsansatz wurde auch zur Suche einer HSS-kodierenden cDNA-Sequenz aus *I. hederifolia* angewendet, die ebenso wie *I. neei* Ipanguline akkumuliert, mit Platynecin als Necinbase (Jenett-Siems et al. 1993; Jenett-Siems et al. 1998), und zur Sectio Mina zählt. Darüber hinaus wurde auch die bereits von Reimann (2004) publizierte DHS aus *I. hederifolia* mit den Primern P8 und P29 erneut amplifiziert und kloniert. In der zitierten Arbeit war diese Sequenz ohne 6xHis-tag kloniert worden und die biochemische Charakterisierung erfolgte mit Proteinextrakten aus *E. coli*-Kulturen, die das rekombinante Enzym exprimierten. Für die Vergleichbarkeit der Daten war jedoch die biochemische Charakterisierung des gereinigten, rekombinanten Enzyms erforderlich.

Für die PCR-Reaktionen wurden wiederum proof-reading DNA-Polymerasen verwendet. Die amplifizierten Produkte wurden analog zu den bereits charakterisierten Sequenzen aus *I. neei*, *M. quinquefolia* und *P. laevigata* in Expressionsvektoren kloniert (s. Kap. 3.3). Die Klonierungsstrategie ist in Tab. 3.7 zusammengefasst. Es konnten mit diesem Ansatz sowohl HSS- als auch DHS-kodierende Sequenzen in *I. meyeri* und *I. hederifolia* amplifiziert werden. Die DHS- sowie HSS-Sequenzen weisen ohne Stoppcodon mit 1146 bp sowie 1128 bp die gleiche Länge wie die homologen Sequenzen aus *I. neei* auf. Sie kodieren Pro-

teine mit einer molaren Masse von 42,2 kDa (ipommey_1), 41,5 kDa (ipommey_2), 42,3 kDa (ipomhed_1) und 41,6 kDa (ipomhed_2).

Tab. 3.7 Klonierungsstrategie der ORFs vermutlicher HSS- und DHS-kodierender cDNAs aus *I. meyeri* und *I. hederifolia*. Aufgelistet sind die PCR-Parameter zur Amplifizierung des ORF mit den Primern und der als Template verwendeten cDNA. Des weiteren sind die verwendeten Expressionsvektoren inklusive der Schnittstellen für die Klonierung angegeben.

Sequenz	Expressions-Primer ^{a)}	Expressionsvektor ^{a)}	Pflanzenorgan zur cDNA Synthese	PCR Parameter	Länge des ORF ^{d)}
ipommey_1 DHS ^{c)}	P7 for (<i>Nde</i> I) P29 rev (<i>Xho</i> I)	pET22b/23a (<i>Nde</i> I + <i>Xho</i> I)	Blatt ^{b)}	<i>Pfx</i> DNA-Polymerase Annealing-Temp. 55°C 40 Zyklen	1146 bp
ipommey_2 HSS ^{c)}	P30 for (<i>Nde</i> I) P31 rev (<i>Xho</i> I)	pET22b/23a (<i>Nde</i> I + <i>Xho</i> I)	Blatt ^{b)}	<i>Pfu</i> DNA-Polymerase, Annealing-Temp. 55°C 35 Zyklen	1128 bp
ipomhed_1 DHS ^{c)}	P7 for (<i>Nde</i> I) P29 rev (<i>Xho</i> I)	pET22b/23a (<i>Nde</i> I + <i>Xho</i> I)	Spross ^{b)}	<i>Pfx</i> DNA-Polymerase Annealing-Temp. 55°C 40 Zyklen	1146 bp
ipomhed_2 HSS ^{c)}	P30 for (<i>Nde</i> I) P31 rev (<i>Xho</i> I)	pET22b/23a (<i>Nde</i> I + <i>Xho</i> I)	Wurzel ^{b)}	<i>Pfx</i> DNA-Polymerase, Annealing-Temp. 55°C 35 Zyklen	1128 bp

^{a)} in Klammer sind die für die Klonierung verwendeten Restriktionsschnittstellen angegeben

^{b)} cDNA-Synthese mit der Superscript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen)

^{c)} die Klassifizierung erfolgte nachträglich aufgrund der biochemischen Charakterisierung der Gesamtsequenz (s. Tab. 3.8)

^{d)} ohne Stoppcodon

Nach der erfolgreichen Etablierung von Expressionsplasmiden erfolgte die heterologe Expression in *E. coli* BL21(DE3)-Zellen und die nachfolgende Reinigung der rekombinante Proteine unter Standardbedingungen wie bereits unter Kap. 3.3 und 3.4 beschrieben.

In den Assays zur biochemischen Charakterisierung (s. Kap. 3.5) zeigten die rekombinanten Proteine aus *I. meyeri* und *I. hederifolia* Eigenschaften, die eindeutig mit bereits charakterisierten DHS- und HSS-Enzymen korrelierten. Die Ergebnisse der Assays sind in Tab. 3.8 zusammengefasst. Aufgrund dieser Eigenschaften konnten die Sequenzen ipommey_1 und ipomhed_1 als DHS-kodierende Sequenzen sowie ipommey_2 und ipomhed_2 als HSS kodierende Sequenzen klassifiziert werden.

Tab. 3.8 Spezifische Aktivität der gereinigten, rekombinanten Proteine, deren cDNA-Sequenzen aus *I. meyeri* und *I. hederifolia* identifiziert wurden.

Sequenz	HSS-Assay	DHS-Assay	6xHis-tag
	Aminobutyl-Akzeptor Putrescin	Aminobutyl-Akzeptor Putrescin	
ipommei_1 DHS	146 pkat/mg	116 pkat/mg	C-terminal
ipommei_2 HSS	2333 pkat/mg	3 pkat/mg	C-terminal
ipomhed_1 DHS	333 pkat/mg	200 pkat/mg	C-terminal
ipomhed_2 HSS	2333 pkat/mg	12 pkat/mg	C-terminal

3.7. Expressionsanalysen der HSS und DHS

Nach der erfolgreichen biochemischen Charakterisierung der HSS- und DHS-Sequenzen (s. Kap. 3.5 und 3.6) stellte sich neben der Rekonstruktion der Phylogenie (s. Kap. 3.8) die Frage nach der Expression der durch Genduplikation auseinander hervorgegangenen *hss*- und *dhs*-Gene. Beide durch diese Gene kodierten Enzyme weisen einen praktisch identischen Reaktionsmechanismus auf (s. Kap. 1.3), sind aber an vollkommen unterschiedlichen biologischen Prozessen beteiligt. Diese getrennten biochemischen Aufgaben sind einerseits durch die unterschiedliche Substratspezifität beider Enzyme gewährleistet. Andererseits ermöglicht eventuell eine differenzierte Regulation der Expression, wie sie z.B. für *Senecio vernalis* (Moll et al. 2002), *Eupatorium cannabinum* (Anke et al. 2004) und *Phalaenopsis* sp. (Anke et al. 2008) beschrieben worden ist, diese Funktionstrennung. In wie weit dies zutrifft bzw. ob diese Differenzierung der Expression bei allen *hss*-Genen zu beobachten ist, war auch Gegenstand dieser Arbeit. Mit Hilfe der Reverse-Transkription-PCR (RT-PCR) wurde die Transkription beider Gene in *I. neei*, *I. hederifolia* und *P. laevigata* untersucht (s. Kap. 3.7.1). Von *I. neei* und *P. laevigata* wurden zusätzlich auch Expressionsstudien auf Protein-Ebene durchgeführt (s. Kap. 3.7.2).

3.7.1. Semiquantitative RT-PCR

Durch die semiquantitative RT-PCR sollte untersucht werden, in welchen Pflanzenorganen die *hss*- und *dhs*-Gene transkribiert werden. Nachgewiesen wurde das Vorhandensein der entsprechenden mRNAs. Generell wird die RT-PCR von der Qualität der isolierten RNA, der cDNA-Synthese sowie der anschließenden PCR beeinflusst. Diese drei genannten Schritte können den Erfolg der Experimente und damit deren Aussage maßgeblich beeinflussen. Eine Möglichkeit, die Aussagekraft der RT-PCR zu überprüfen, bietet die parallele

Amplifizierung eines so genannten „housekeeping genes“ als externem Standard. Ein solches Gen sollte konstant in allen zu untersuchenden Geweben exprimiert werden und demnach PCR-Produkte gleichbleibender Menge ergeben. In vielen Fällen wird hierfür die Glycerinaldehyd-3-phosphatdehydrogenase (GAPDH) verwendet (Apostolakos et al. 1993). In dem hier untersuchten System stellt allerdings die *dhs* gewissermaßen ein „housekeeping gene“ dar. Alle bisherigen Untersuchungen deuten darauf hin, dass die DHS ubiquitär in allen Pflanzenorganen exprimiert wird (Moll et al. 2002; Anke et al. 2004; Nurhayati und Ober 2005) und auch die ersten Ergebnisse aus den eigenen Experimenten sprechen für eine konstante Expression. Eine RT-PCR wurde demnach nur als erfolgreich betrachtet, wenn eine Amplifizierung der DHS-kodierenden cDNA-Sequenz in allen untersuchten Pflanzenorganen gelang.

Für die Durchführung der RT-PCR-Experimente wurde Gesamt-RNA von den verschiedenen Pflanzenorganen extrahiert und anschließend einem DNase I-Verdau unterzogen, um eine Kontamination mit genomischer DNA und die Amplifizierung möglicher Pseudogene zu vermeiden. Insbesondere Pseudogene die durch Retrotransposition entstanden, sind in ihrer Größe nicht von der cDNA zu unterscheiden, da sie keine Introns besitzen, und könnten dadurch die Ergebnisse der RT-PCR verfälschen (Nurhayati und Ober 2005; Nurhayati et al. 2009). Für die eigentliche PCR-Reaktion wurden jeweils 1 µg Gesamt-RNA mit Hilfe der reversen Transkriptase umgeschrieben und 1,0 µl der resultierenden cDNA als Vorlage eingesetzt. Als Primer wurden die genspezifischen Primer, welche die Amplifikation des gesamten ORF ermöglichten, verwendet. Für *I. neei* und *I. hederifolia* sind dies die Primer P30/P31 für die HSS- sowie P7/P29 für den Nachweis der DHS-kodierenden mRNA. Analog dazu wurden die Primer P40/P41 für die Amplifizierung der HSS- sowie P36/P37 für die Amplifizierung der DHS-kodierenden mRNA aus *P. laevigata* verwendet. Die erwartete Größe der PCR-Produkte der HSS- sowie der DHS-kodierenden Sequenzen lag bei etwa 1200 bp.

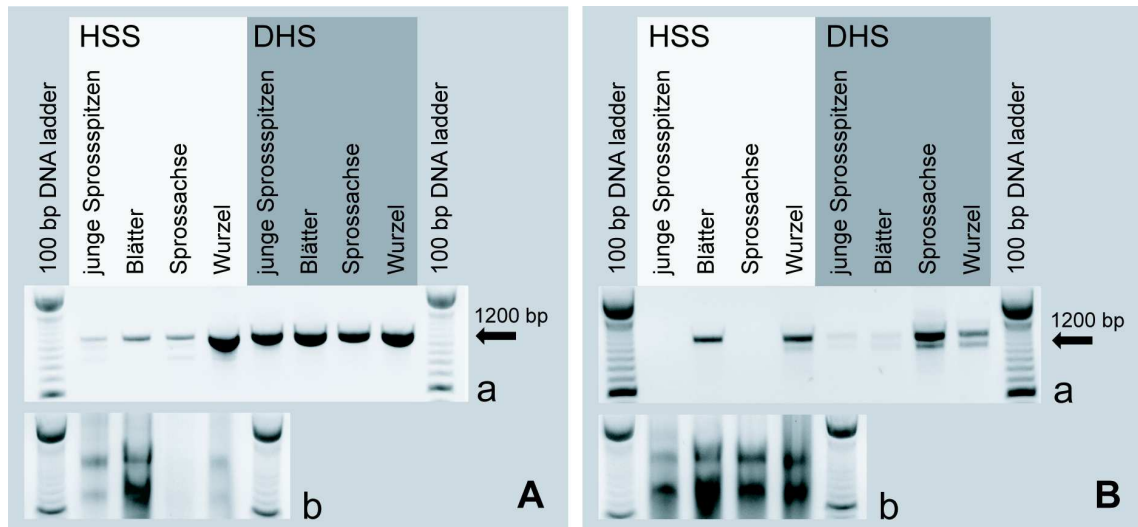


Abb. 3.5 Semiquantitative RT-PCR von *I. neei* (A) und *P. laevigata* (B). Die Reverse Transkription wurde mit RNA aus verschiedenen Pflanzenorganen durchgeführt. Die PCR erfolgte mit genspezifischen Primern für die HSS und DHS der jeweiligen Art. **a.** Gelelektrophorese der PCR-Produkte (35 Zyklen) mit cDNA aus jungen Sprossspitzen, Blättern, Sprossachse und Wurzel als Vorlage, wobei jeweils 1,0 μ l eingesetzt wurden. Die PCR erfolgte mit der *Pfu* DNA-Polymerase im Fall von *I. neei* sowie der *Taq* DNA-Polymerase im Fall von *P. laevigata* **b.** Gelelektrophorese der isolierten Gesamt-RNA aus den oben genannten Pflanzenorganen, die zur cDNA-Synthese eingesetzt wurde.

In Abb. 3.5 sind die Ergebnisse der RT-PCR-Versuche von *I. neei* sowie *P. laevigata* gezeigt. Zur Isolierung der Gesamt-RNA aus den unterschiedlichen Pflanzenorganen von *I. neei* wurde eine Pflanze aus dem Gewächshaus (s. Kap. 2.1) verwendet. Die RNA-Isolierung erfolgte zunächst mit dem NucleoSpin[®] RNA/Protein Kit von Macherey-Nagel mit einer anschließenden cDNA-Synthese mit der Superscript III reversen Transkriptase. Eine Amplifizierung der DHS-kodierenden cDNA mit cDNA aus den Blättern und Wurzeln gelang jedoch nicht. Nach einer erneuten RNA-Isolierung aus beiden Organen mit dem TRIzol reagent (Invitrogen) und anschließender cDNA-Synthese, ebenfalls mit Superscript III, konnte jedoch die DHS-kodierende cDNA nachgewiesen werden. Im Fall von *P. laevigata* wurde eine Pflanze aus der Sterilkultur (s. Kap. 2.1) verwendet. Die RNA-Isolierung erfolgte hier zunächst mit Hilfe des TRIzol reagent und die cDNA-Synthese mit der Superscript II reversen Transkriptase. Da jedoch, ähnlich wie bei *I. neei*, in den Wurzeln keine DHS-kodierende cDNA amplifiziert werden konnte, wurde aus den Wurzeln nochmals RNA isoliert. Bei diesem zweiten Versuch wurde das „RNeasy Plant Minikits“ zur RNA-Isolierung verwendet. Mit dieser RNA als Ausgangspunkt der cDNA-Synthese gelang eine Amplifizierung. Beide Beispiele, die RT-PCR von *I. neei* sowie *P. laevigata*, belegen deutlich, wie stark die Methode der RNA-Isolierung die Qualität der isolierten RNA und somit den Erfolg der RT-PCR beeinflusst. Welche Methode am Besten geeignet war, konnte nur

durch empirische Versuche ermittelt werden. Zudem erzielten auch unterschiedliche DNA-Polymerasen unterschiedliche Ergebnisse. Konnte im Beispiel von *I. neei* zwar mit der *Pfu* DNA-Polymerase in allen Pflanzenorganen die DHS-kodierende cDNA amplifiziert werden (s. Abb. 3.5), schlug die Amplifizierung mit der *Taq* DNA-Polymerase fehl (nicht abgebildet). Daraus wird die essentielle Bedeutung eines Standards zur Überprüfung der RT-PCR ersichtlich aber auch die Problematik der Vergleichbarkeit verschiedener Pflanzenorgane und Gewebe. Die stark variierende Zusammensetzung der Inhaltsstoffe in den verschiedenen Pflanzenorganen beeinflusst zum einen die RNA-Isolierung maßgeblich, zum anderen kann auch der Erfolg der reversen Transkription dadurch gestört werden. Die Überprüfung der RNA durch Agarose-Gelelektrophorese sowie die Quotienten aus OD_{260}/OD_{280} und OD_{260}/OD_{230} bei der photometrischen Quantifizierung der RNA können hierbei Hinweise auf Verunreinigungen geben. Aussagen zur Quantität der nachgewiesenen Transkripte sind insgesamt problematisch. Vorwiegend kann durch diese Methode hauptsächlich das Vorhandensein eines Transkriptes nachgewiesen werden. Mit Blick auf diese Problematik sind die Ergebnisse der RT-PCR zu bewerten. So konnte die DHS-kodierende mRNA bzw. cDNA in den mit verschiedenen Pflanzenorganen von *P. laevigata* nur in variierender Quantität nachgewiesen werden womit der interne Standard stark schwankt. Diesbezüglich sind für dieses Experiment quantitative Aussagen besonders schwierig, jedoch das Vorhandensein der HSS-kodierende mRNA bzw. cDNA konnte überprüft werden. Hier erwiesen sich die Wurzeln und Blättern als positiv hinsichtlich der HSS-Expression (s. Abb. 3.5). Die RT-PCR bei *I. neei* ergab mit cDNA aus allen untersuchten Pflanzenorganen zum einen eine regelmäßige Amplifikation der DHS-kodierenden cDNA sowie zum anderen auch eine positive Amplifikation der HSS-kodierenden cDNA in allen Pflanzenorganen, jedoch mit unterschiedlich intensiven Banden in der Agarose-Gelelektrophorese. Die stärkste Bande war hierbei in den Wurzeln zu finden. In einem wiederholten RT-PCR-Experiment von *I. neei* mit Pflanzenmaterial einer im Gewächshaus gezogenen Pflanze (s. Abb. 3.6) wurde die cDNA photometrisch quantifiziert, wodurch genau definierte Mengen als Vorlage in der PCR eingesetzt werden konnten. Zudem wurden nach 25, 30 und 35 Zyklen der PCR Aliquots elektrophoretisch aufgetrennt. Dadurch konnte die Zunahme der PCR-Produkte verfolgt werden. Eine Analyse nur am Ende der PCR berücksichtigt nicht den sigmoiden Verlauf der PCR, denn besonders bei hohen Transkriptmengen treten gegen Ende der PCR limitierende Faktoren auf, wie etwa das dNTPs aufgebraucht sind, und die PCR stagniert. Lässt man die PCR bis zu dieser Stagnation laufen, sind Unterschiede zwischen den Proben unter Umständen

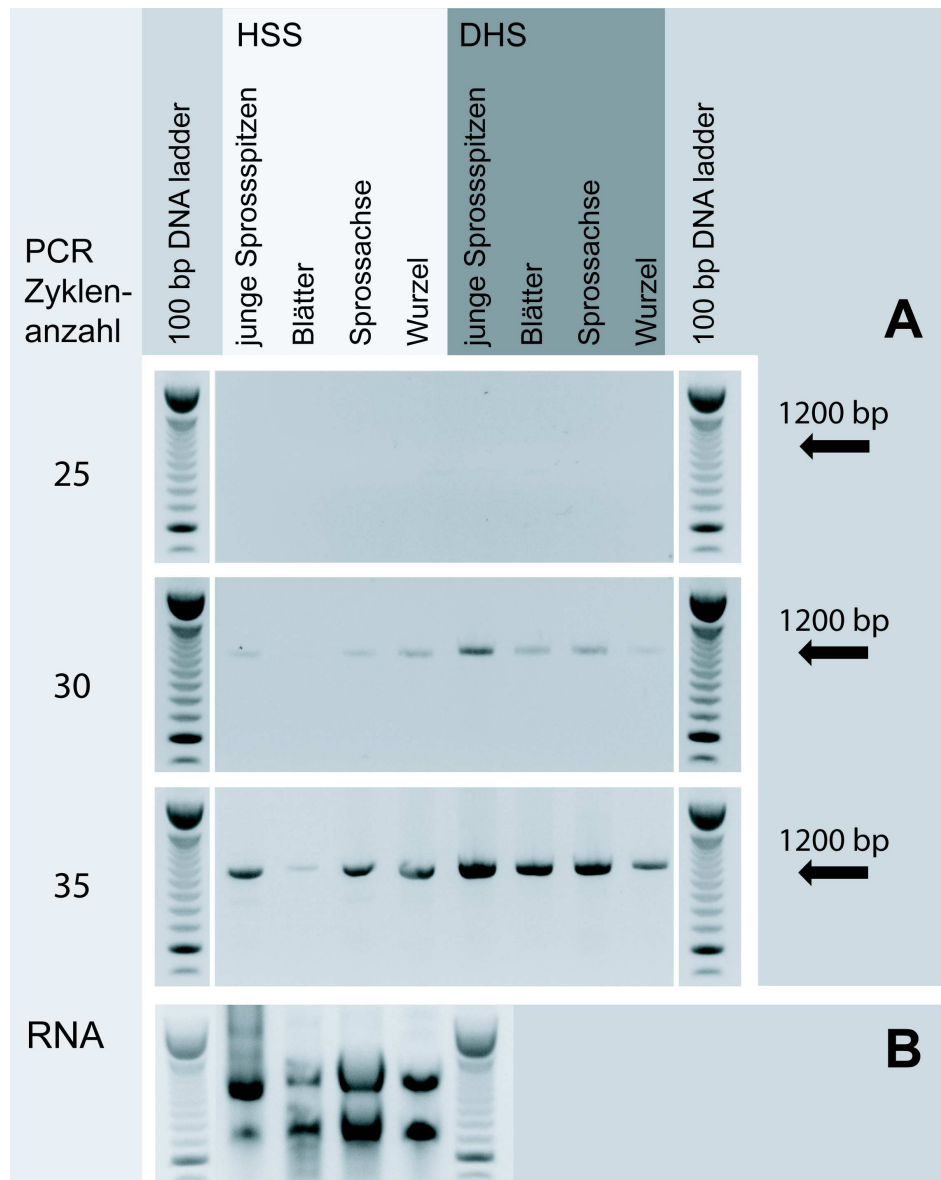


Abb. 3.6 Semiquantitative RT-PCR von *I. neei*. Die Reverse Transkription wurde mit Gesamt-RNA aus verschiedenen Pflanzenorganen durchgeführt. Die PCR erfolgte mit genspezifischen Primern für die HSS (P30/P31) und DHS (P7/P29) bei einer Annealing-Temperatur von 50°C. Als Vorlage wurden cDNA aus jungen Sprossspitzen, Blättern, Sprossachse bzw. Wurzeln (jeweils 100 ng) eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit der *Pfu* DNA-Polymerase. **A.** Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte nach 25, 30 und 35 Zyklen der PCR-Reaktion. **B.** Gelelektrophorese der isolierten Gesamt-RNA aus den oben genannten Pflanzenorganen. RNA Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Plant Minikit im Fall der Sprossspitzen, bei den übrigen Proben mittels TRIzol reagent. Am Anschluss daran wurde die RNA mit der RevertAid™ H Minus M-MuLV Reverse Transcriptase umgeschrieben.

nicht mehr zu erkennen. In diesem Experiment konnte die annähernd gleichmäßige Transkription der DHS in allen untersuchten Pflanzenorganen bestätigt werden. Zudem konnte die Transkription der HSS in allen untersuchten Pflanzenorganen bestätigt werden, aller-

dings war in den Proben aus Sprossachse und junger Sprossspitze nun eine ähnlich starke Bande nachweisbar wie in den Wurzeln.

Eine weitere RT-PCR wurde mit verschiedenen Pflanzenorganen von *I. hederifolia* durchgeführt (s. Abb. 3.7). Das zur RNA-Isolierung verwendete Pflanzenmaterial stammte ebenfalls von einer im Gewächshaus kultivierten Pflanze (s. Kap. 2.1). Eine Quantifizierung der eingesetzten cDNA erfolgte in dem Fall nicht. Es wurde routinemäßig 1,0 µl cDNA als Template verwendet, die für jede Probe in gleicher Weise aus 1,0 µg Gesamt-RNA umgeschrieben wurde. Eine Probennahme mit anschließender elektrophoretischer Auftrennung erfolgte ebenfalls nach 25, 30 und 35 Zyklen um die Zunahme der PCR-Produkte zu verfolgen. Auch in dieser RT-PCR konnte in allen untersuchten Pflanzenorganen die DHS-kodierende mRNA nachgewiesen werden. Damit war die interne Kontrolle der RT-PCR positiv. Betrachtet man die Transkription der HSS, so ergab die RT-PCR deutliche HSS-Banden in den Wurzeln, der Sprossachse sowie in jungen Sprossspitzen nach bereits 30 Zyklen der PCR-Vervielfachung. Im Vergleich zu *I. neei* scheint damit die HSS in *I. hederifolia* ähnliche reguliert zu werden, in beiden Pflanzen ist die Bande in der Probe aus den Blättern am schwächsten. Die Ergebnisse der semiquantitativen RT-PCR sprechen somit für die Hauptexpression der HSS in den Wurzeln und Sprossspitzen. Dies sollte auf Proteinebene verifiziert werden (s. Kap. 3.7.2).

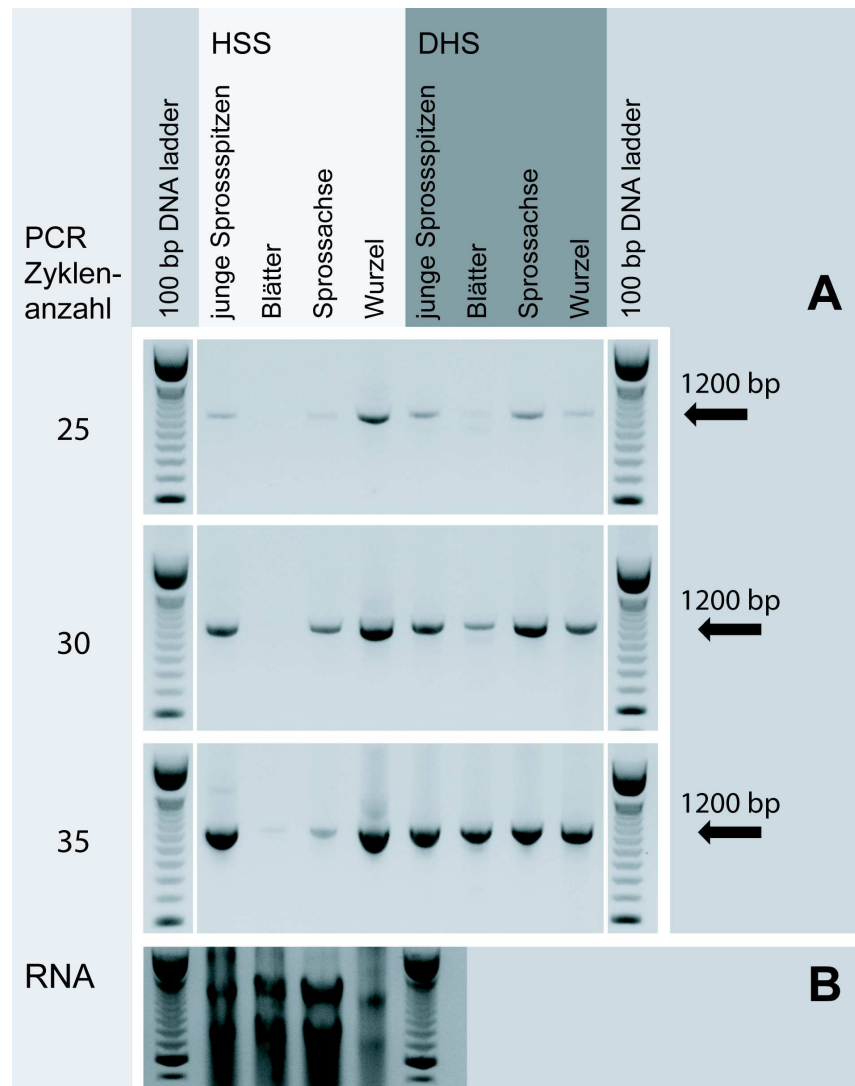


Abb. 3.7 Semiquantitative RT-PCR von *I. hederifolia*. Die Reverse Transkription wurde mit Gesamt-RNA aus verschiedenen Pflanzenorganen durchgeführt. Die PCR erfolgte mit genspezifischen Primern für die HSS (P30/P31) und DHS (P7/P29) bei einer Annealing-Temperatur von 55°C. Als Vorlage wurde cDNA aus jungen Sprossspitzen, Blättern, Sprossachse bzw. Wurzeln (jeweils 1,0 µl) eingesetzt. Die Amplifikation erfolgte mit der *Taq* DNA-Polymerase. **A.** Agarose-Gelelektrophorese die PCR-Produkte nach 25, 30 und 35 Zyklen der PCR-Reaktion. **B.** Gelelektrophorese der isolierten Gesamt-RNA aus den oben genannten Pflanzenorganen. RNA Isolierung erfolgte mit dem RNeasy Plant Minikit im Fall der Wurzeln, bei den übrigen Proben mittels TRIzol reagent. Am Anschluss daran wurde die RNA mit der Superscript II reversen Transkriptase umgeschrieben.

3.7.2. Expressionsanalysen der HSS und DHS mit Hilfe immunologischer Methoden

Ergänzend zu den Expressionsanalysen der *hss*- und *dhs*-Gene durch die semiquantitative RT-PCR auf Transkriptionsebene (s. Kap. 3.7.1) sollte die Anwendung immunologischer Methoden die Untersuchung der Expression auf der Proteinebene ermöglichen. Es wurden dazu polyklonale Antikörper, gerichtet gegen das HSS-Protein aus den Versuchs-

pflanzen *I. neei* sowie *P. laevigata*, benötigt (s. Kap. 3.7.2.1). Auf einen Nachweis der DHS-Proteine mit Hilfe immunologischer Nachweistechiken wurde im Rahmen dieser Arbeit verzichtet. Bereits vorhergehende Arbeiten kamen zu der Vermutung, dass eine im Vergleich zum *hss*-Gen niedrige Expression des *dhs*-Gens zu einer Proteinmenge führt, die unter der Nachweisgrenze immunologischer Methoden liegt (Moll et al. 2002).

3.7.2.1. *Produktion, Reinigung und Spezifitätsanalyse der gereinigten polyklonalen Antikörper*

In einer Auftragsimmunisierung wurden polyklonale Antikörper gegen die HSS beider Versuchspflanzen hergestellt. Zur Überwachung des Immunisierungsvorgangs und der Bildung der spezifischen Antikörper wurden Präimmunsereum, Serum nach der 1. und 2. Immunisierung („first-“, und „second-bleeding“) sowie das finale Serum („final-bleeding“, s. Kap. 2.4.1) in Western-Blots überprüft. Es wurden dazu definierte Mengen an rekombinanter DHS sowie HSS im SDS-Gel aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und anschließend mit Serum als Western-Blot entwickelt. Eine erfolgreiche Antikörper-Produktion konnte durch die Detektion des Antigens infolge des Bindens spezifischer Antikörper nachgewiesen werden. Antikörper gegen die HSS-Proteine beider Versuchspflanzen, *I. neei* und *P. laevigata*, konnten mit diesem Versuchsansatz in den Seren nachgewiesen werden, während die Präimmunsereum keine Signale ergaben.

Für die nachfolgenden Untersuchungen (s. Kap. 3.7.2.2 und 3.7.2.3), bei denen als Methoden der Western-Blot und die *in situ* – Immunolokalisation eingesetzt wurden, mussten die spezifischen Antikörper gereinigt werden. Prinzipiell könnte für Western-Blots das Serum eingesetzt werden, allerdings sind dabei oft unspezifische Hintergrund-Signale störend. Aus gleichem Grund erfordert die *in situ*-Immunolokalisation gereinigte Antikörper.

Die Reinigung der polyklonalen Antikörper erfolgte über Antigen-Affinitätschromatographie. Das Antigen, sprich die rekombinante, gereinigte HSS der jeweiligen Pflanzenart, wurde kovalent an eine CNBr-aktivierte Sepharose™ 4B gebunden (s. Kap. 2.4.2). An diese immobilisierten Antigen-Proteine wurden die Antikörper aus dem Serum reversibel gebunden und nach mehreren Waschschrinen wieder mit geeignetem Puffer eluiert. Die Antigen-Antikörper Bindung ist gewöhnlich in wässrigen Puffern mit physiologischen pH und ionischer Stärke am effizientesten. Die Elution kann durch Veränderungen des pH-Wertes oder der ionischen Stärke erreicht werden. Die optimalen Elutionsbedingungen waren für die

jeweilige Reinigung zu ermitteln. Im Falle der Antikörper gegen die HSS aus *I. neei* erwies sich eine Elution durch einen sauren pH-Wert (pH=2,5) als optimal. Hingegen konnten die Antikörper gegen die HSS aus *P. laevigata* mit alkalischen Puffer (pH=11,5) eluiert werden. Die gereinigten Antikörper wurden aufkonzentriert und in Aliquots bei -80°C bis zur Verwendung gelagert. Dabei konnten die Antikörper über die Absorption bei 280 nm grob quantifiziert werden. IgG Antikörper, welche die höchste Konzentration in Seren aufweisen und hier gereinigt wurden, besitzen bei der Wellenlänge von 280 nm und bei einer Konzentration von 1 mg/ml eine Absorption von 1,35. Der spezifische Antikörper gegen die HSS aus *I. neei* (antiHSSneei) wurde bis auf 1,8 mg/ml und der spezifische Antikörper gegen die HSS aus *P. laevigata* (antiHSSpars) bis auf 1,2 mg/ml aufkonzentriert.

Nach der Reinigung wurde in einem ersten Schritt die Sensitivität der Antikörper sowie deren Spezifität für die HSS im Vergleich zur DHS überprüft. Besonders aufgrund der hohen Aminosäure-Sequenz-Identität zwischen HSS und DHS aus *I. neei* von 88%, und aus *P. laevigata* von 89%, war eine Kreuzreaktivität der Antikörper zu berücksichtigen. Es wurden dazu Western-Blots mit dem affinitätsgereinigten, spezifischen Antikörper durchgeführt, wobei definierte Mengen an gereinigter, rekombinanter HSS sowie DHS mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend geblottet wurden. In Abb. 3.8 sind diese Western-Blots dargestellt. Im Falle von *I. neei* zeigte der gegen die HSS gerichtete Antikörper auch eine Affinität zu der DHS, die jedoch etwa 4-fach schwächer war, als die gegen die HSS. Konnten 2,5 ng der rekombinanten HSS noch ein nachgewiesen werden, so wurden als geringste Menge an rekombinanter DHS 10 ng detektiert. Generell ist die Sensitivität des Antikörpers mit einer Nachweisgrenze von 2,5 ng an rekombinanter HSS jedoch relativ hoch. Im Vergleich dazu zeigte der gereinigte Antikörper gegen die HSS aus *P. laevigata* keine Kreuzreaktivität gegenüber der DHS bei den eingesetzten Mengen von 2,5-100 ng. Allerdings ist auch die Sensitivität gegenüber der HSS geringer als bei dem antiHSSneei Antikörper. 25 ng an rekombinanter HSS war die geringste noch detektierbare Menge. Dabei kam der Antikörper im Western-Blot in einer Verdünnung von nur 1:2.000 zum Einsatz. Im Vergleich dazu wurde antiHSSneei in einer 1:10.000 Verdünnung eingesetzt. Diese niedrige Sensitivität von antiHSSpars könnte möglicherweise aus der basischen Elution resultieren. Generell gilt die Elution von der Affinitätssäule mittels niedrigen pH-Wert als sanfteste Methode. Der hohe pH-Wert der basischen Elution könnte durchaus nachteilige Effekte auf die Struktur und damit auf die spezifische Bindefähigkeit des Antikörpers mit sich bringen.

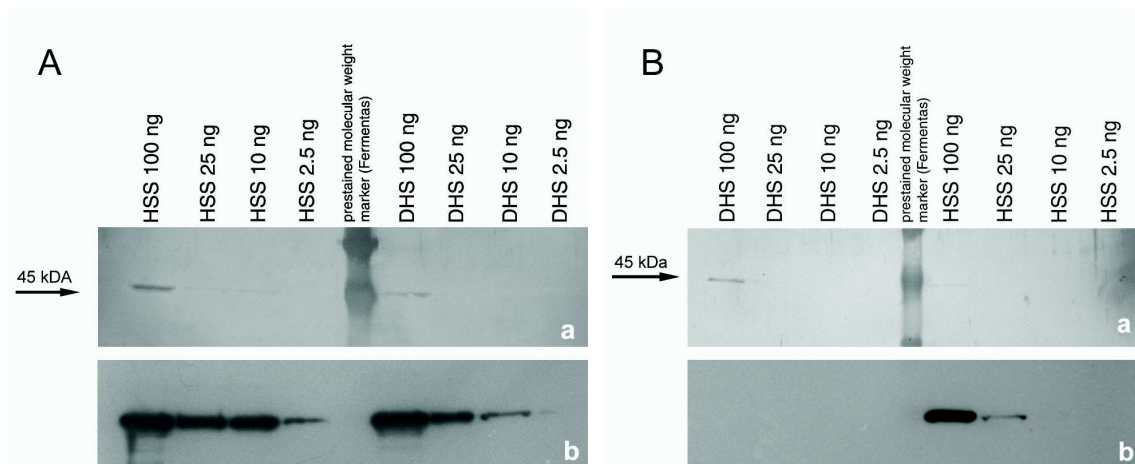


Abb. 3.8 Spezifitätsanalyse der affinitätsgereinigten HSS-Antikörper gegen HSS und DHS aus *I. neei* (A) und *P. laevigata* (B). Definierte Mengen von HSS und DHS wurden im SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Im Anschluss an die Inkubation mit dem spezifischen HSS-Antikörper und dem sekundären Antikörper (1:3.300) erfolgte die Detektion mit dem ECL-Kit. Die Inkubation mit dem spezifischen Antikörper antiHSS_{nee}i (OD₂₈₀ 2,4) erfolgte in einer Verdünnung von 1:10.000 (A.b) und die mit antiHSS_{pars} (OD₂₈₀ 1,6) in einer Verdünnung von 1:2.000 (B.b). Nach dem spezifischen Nachweis wurde die Membran mit Indian-Ink angefärbt. Dadurch konnte der gleichmäßige Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran überwacht werden (A.a und B.a).

3.7.2.2. Pflanzenorganspezifische Expression der HSS

Mit Hilfe der gereinigten Antikörper konnten nun die eigentlichen Expressionsanalysen der HSS auf Proteinebene durchgeführt werden. Dazu wurde Gesamtprotein aus verschiedenen Pflanzenorganen extrahiert (Wurzeln, Sprossachse, Blätter und Sprossspitze) und in Western-Blots analysiert (s. Kap. 2.4.3). Jeweils 20 µg Gesamtprotein wurden zuerst mittels SDS-PAGE aufgetrennt und anschließend auf eine PVDF Membran geblottet. In den ersten Versuchen von Western-Blots mit Proteinextrakten aus *I. neei* bereitete Proteinabbau während der Extraktion Probleme, ähnlich wie bereits bei Niemüller (2007) geschildert. Anstelle des erwarteten Signals bei 45 kDa konnten nur Signale mit der Größe 18 und 26 kDa detektiert werden. Diese Banden waren besonders stark in den Wurzeln. Durch den Zusatz von Protease-Inhibitoren zu dem Protein-Extraktions-Puffer konnte der Proteinabbau reduziert werden und es konnte ein deutliches Signal für die HSS mit einer Größe von 45 kDa in Wurzelextrakten nachgewiesen werden (s. Abb. 3.9). Darüber hinaus konnte auch in der Probe aus Sprossachsen ein schwaches Signal gefunden werden. Allerdings war hier eine Doppelbande zu sehen. Woher diese Doppelbande rührt, ist nicht geklärt. Dies wäre noch gesondert zu untersuchen.

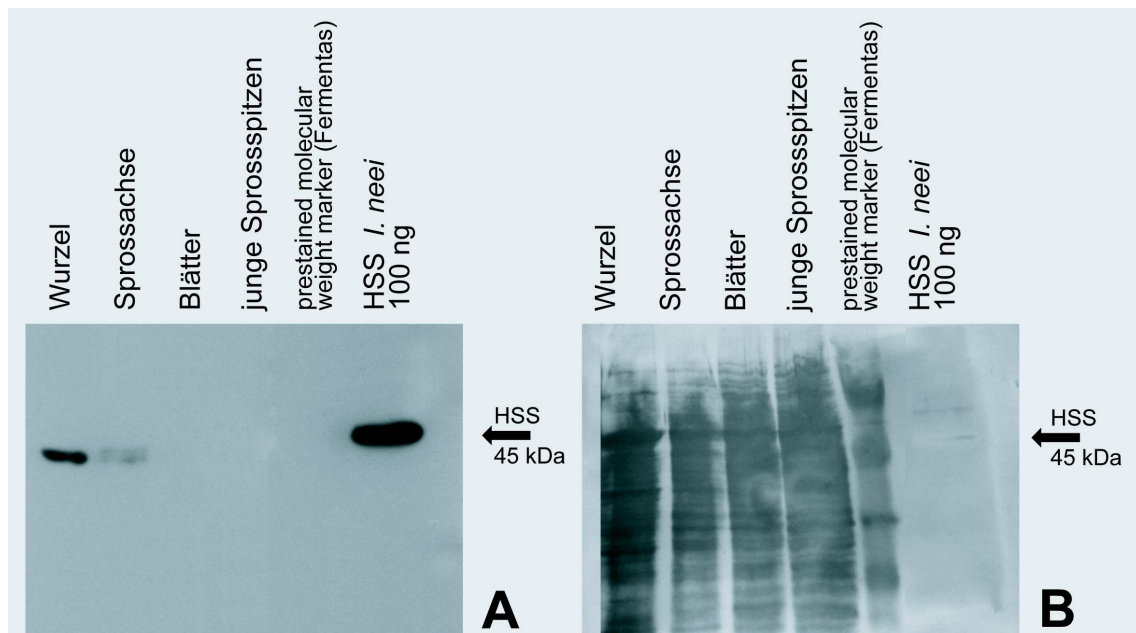


Abb. 3.9 Western-Blot verschiedener Pflanzenorgane aus *I. neei*. Jeweils 20 µg isoliertes Gesamtprotein aus Wurzeln, Sprossachse, Blätter und jungen Sprossspitzen wurden im SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran geblottet. Im Anschluss an die Inkubation mit dem primären Antikörper (antiHSS_{nee1} 1:10.000, OD₂₈₀ 2,4) und dem sekundären Antikörper (1:3.300) erfolgte die Detektion mit dem ECL-Kit (A). Nach dem spezifischen Nachweis wurde die Membran mit Indian-Ink angefärbt. Dadurch konnte der gleichmäßige Transfer der Proteine aus dem Gel auf die Membran überwacht werden (B).

Ein weiteres Experiment, bei dem mit Hilfe eines Kits von Macherey und Nagel Proteine sowie RNA aus einer Pflanzenprobe extrahiert wurden, ermöglichte die parallele Untersuchung der Expression auf RNA- und Proteinebene zum einen mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR, zum anderen mit Hilfe des Western-Blots. Die bisherigen Ergebnisse konnten in diesem Experiment bestätigt werden. Die HSS-kodierende cDNA wurde in allen Organen nachgewiesen, mit der stärksten Bande mit cDNA aus den Wurzeln und Sprossspitzen als Vorlage. Das HSS-Protein konnte im Western-Blot nur eindeutig in den Wurzeln nachgewiesen werden. Neben dem HSS-Signal mit einer Größe von 45 kDa traten allerdings auch wieder die bereits bekannten Abbaubanden auf. Außerdem zeigte sich wieder die bereits oben beschriebene schwache Doppelbande auf Höhe der HSS-Signals in Extrakten aus Sprossachse und Sprossspitzen (Ergebnisse nicht dargestellt). Hervorzuheben ist der beobachtete Unterschied zwischen dem Nachweis der HSS-mRNA, die durch die semiquantitative RT-PCR in allen untersuchten Pflanzenorganen nachgewiesen werden konnte, und dem auf die Wurzel beschränkten Nachweis des HSS-Proteins.

Neben diesen Pflanzenorgan-spezifischen Untersuchungen der HSS-Expression auf Proteinebene wurden von *I. neei* auch die Expressionsmuster von Pflanzen aus der Sterilkultur mit denen aus dem Gewächshaus verglichen. Dabei erschienen die Pflanzen aus dem Gewächshaus für Expressionsstudien besser geeignet zu sein. Die HSS-Signale im Western-Blot von Proteinextrakten aus der Sterilkultur waren deutlich schwächer. Darüber hinaus wurde auch eine zeitliche Beschränkung der HSS-Expression in Abhängigkeit bestimmter Vegetationsperioden mit in Betracht gezogen, wie sie etwa bei *Eupatorium cannabinum* L. (Asteraceae) auftritt. Bei dieser Art ist die Expression der HSS in den Wurzeln nur bis zum Zeitpunkt der Blütenöffnung nachweisbar (Anke et al. 2004). Um diesen temporalen Aspekt zu untersuchen, wurde zu unterschiedlichen Zeitpunkten Pflanzenmaterial der Gewächshauspflanze gesammelt. Dabei gelang tatsächlich nicht bei allen Proben der HSS-Nachweis, allerdings war keine klare Korrelation zu einer bestimmten Vegetationsperiode oder den Entwicklungszustand der Pflanzen erkennbar.

Western-Blots von Proteinextrakten aus verschiedenen Pflanzenorganen von *P. laevigata* ergaben keine spezifischen Signale obwohl in RT-PCR Untersuchungen in Blättern und Wurzeln eindeutig die mRNA der HSS nachgewiesen werden konnte (s. Kap. 3.7). Jedoch gilt die RT-PCR im Vergleich zu Western-Blots als deutlich sensitivere Methode. Möglicherweise lag die Menge an exprimiertem HSS-Protein unterhalb der Nachweisgrenze des spezifischen Antikörpers (antiHSSpars). Dies erscheint besonders unter Berücksichtigung der im Vergleich zum antiHSSneei niedrigen Sensitivität denkbar (s. Kap. 3.7.2.1). Es wurden daher höhere Mengen an Gesamtprotein bis zu einer Menge von 50 µg in der SDS-PAGE eingesetzt. Aber auch in diesen Ansätzen war keine Detektion der HSS möglich. Auch weitere Modifikationen bezüglich Extraktionsmethode und Extraktionspuffer sowie beim Blocken der Blotmembran und bei der Antikörperinkubation erbrachten keinen Erfolg. Letztlich gelang es nicht, das HSS-Protein in Gesamtproteinextrakten aus den Pflanzenorganen nachzuweisen, in denen die RT-PCR positive Signale für die HSS-kodierende cDNA ergab. Dies kann auf den Antikörper bzw. auf die Methode des Western-Blots zurückzuführen sein. Es ist nicht zu vergessen, dass im Western-Blot gegenüber der RT-PCR der Vielfältigungsschritt der zu untersuchenden Proben entfällt. Bereits in vorhergehenden Arbeiten zur Expression von HSS und DHS korrelierten die Ergebnisse aus der RT-PCR nicht immer mit denen aus Western-Blots. Zwar konnte in allen Geweben, in denen das HSS-Protein nachgewiesen wurde, auch die mRNA nachgewiesen werden, jedoch umge-

kehrt war dies nicht möglich (Anke et al. 2004; Niemüller 2007). Auch bei *I. neei* stimmen die Signale von RT-PCR und Western-Blot nicht überein. So konnte die HSS-mRNA in allen untersuchten Pflanzenorganen nachgewiesen werden, jedoch das HSS-Protein nur in Proteinextrakten aus Wurzeln. Die Unterschiede in der Methodik können diese Differenzen verursachen. Ein weiterer, nicht zu vernachlässigender Faktor ist der Umstand, dass die mRNA-Häufigkeit nicht zwingend mit der Proteinmenge korreliert (Gygi et al. 1999). Beide Faktoren können zu den negativen Ergebnissen aus den Western-Blots mit *P. laevigata* führen.

Versuche zur zell- und gewebespezifischen Lokalisation der HSS wurden trotz dieser negativen Ergebnisse im Western-Blot auch für *P. laevigata* durchgeführt (s. Kap. 3.7.2.3). Bedenkt man die zum Teil auf wenige Zellen beschränkte Expression der HSS in anderen Arten (Moll et al. 2002; Niemüller 2007; Anke et al. 2008), so könnte die Extraktion von Gesamtprotein das HSS-Protein so stark verdünnen, sodass es unterhalb der Nachweisgrenze des antiHSSpars-Antikörper sinkt. In der *in situ*-Immunolokalisation würden jedoch die Konzentrationsverhältnisse nicht verändert und bei einer hohen Konzentration an HSS in wenigen Zellen könnte ein Nachweis mit Hilfe des antiHSSpars Antikörper gelingen.

3.7.2.3. Zell- und gewebespezifische Expression der HSS

Nachdem im Fall von *I. neei* die Ergebnisse aus der semiquantitativen RT-PCR und dem Western-Blot für die Wurzeln als Hauptexpressionsort der HSS sprachen, konnte gezielt in den Wurzeln die gewebespezifische Expression untersucht werden. Verwendet wurde dazu die Methode der *in situ*-Immunolokalisation in histologischen Querschnitten von 3-4 µm Dicken (s. Kap. 2.4.4). Die Versuche konzentrierten sich dabei auf Wurzeln von im Gewächshaus gezogenen Pflanzen, da sich diese gemäß den bisherigen Untersuchungen besser als Sterilkulturpflanzen für Expressionsstudien eigneten. Die Immunomarkierung der HSS erfolgte mit dem auch im Western-Blot eingesetzten affinitätsgereinigten, spezifischen Antikörper antiHSSneei. Eine positive Antikörperbindung wurde mit Hilfe eines sekundären Antikörper visualisiert, der durch eine Farbstoffmarkierung eine grüne Fluoreszenz bei UV-Licht (450-490 nm) zeigt. Die Detektion erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop.

Nach Versuchen mit unterschiedlichen Segmenten der Wurzeln konnte schließlich in Querschnitten der Wurzelhaarzone eine spezifische Markierung nachgewiesen werden, welche in Abb. 3.10 abgebildet ist. Zu erkennen ist die Rhizodermis mit den Wurzelhaaren, die

beide bei der eingesetzten Wellenlänge von 495 nm eine gelbe Autofluoreszenz aufweisen. Die spezifische Markierung, erkennbar durch die deutlich grüne Fluoreszenz, beschränkt sich auf die unterhalb der Rhizodermis liegende Zellreihe – der Exodermis.

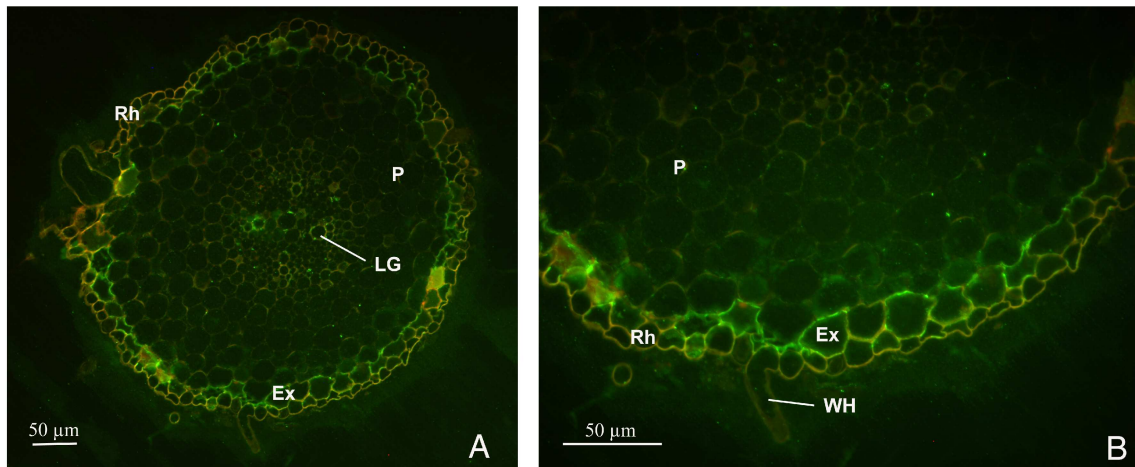


Abb. 3.10 *in situ*-Immunolokalisation junger Wurzeln von *I. neei* im Bereich der Wurzelhaarzone. In Abbildung **A** ist ein Querschnitt gezeigt. Abbildung **B** stellt einen Ausschnitt aus Abbildung **A** dar. Zu erkennen sind die Wurzelhaare und die Rhizodermis mit gelber Eigenfluoreszenz sowie der Zentralzylinder mit einzelnen Leitgefäßen des Xylem. Die Markierung beschränkt sich auf die Exodermis. Der Schnitt wurde mit antiHSS_{nee1} in einer 1:50-Verdünnung zur spezifischen Erkennung der HSS inkubiert. Die Schnittdicke beträgt 4 µl. Verwendete Abkürzungen: Rh-Rhizodermis, Ex-Exodermis, LG-Leitgefäß, P-Parenchym, WH-Wurzelhaar.

Da auch in der cDNA aus Sprossachsen und jungen Sprossspitzen die HSS-kodierende mRNA nachgewiesen wurde und im Western-Blot die bereits erwähnten Doppelbanden zu beobachten waren, wurden ebenfalls Querschnitte dieser Pflanzenorgane angefertigt und untersucht. Allerdings konnte keine spezifische Markierung nachgewiesen werden. Somit bestätigen die Ergebnisse der *in situ*-Immunolokalisation die Wurzeln als Hauptexpressionsort der HSS. Zudem scheinen hier nur wenige Zellen an der Expression beteiligt zu sein. Diese spezifische Expression der HSS in nur wenigen Zellen wurde bereits für mehrere Arten beschrieben (Niemüller 2007; Anke et al. 2008). So ist z. B. die HSS in *S. vernalis* nur in wenigen Zellen der Endodermis und des angrenzenden Rindenparenchyms nachweisbar (Moll et al. 2002).

In wiederholten Versuchen der *in situ*-Immunolokalisation konnte diese Markierung nicht immer nachgewiesen werden. Da bereits die Ergebnisse aus den Western-Blots darauf hindeuteten, dass die Expression von bisher unbekanntem Faktoren abhängig ist, müssten auch die Versuche der Immunolokalisation systematisch und umfassend auf Pflanzen ver-

schiedener Entwicklungsstadien ausgeweitet werden. Dies war jedoch im zeitlich begrenzten Rahmen dieser Arbeit nicht möglich. Letztlich geben diese Ergebnisse aber Hinweise auf eine nicht konstitutive Expression der HSS in der Wurzelspitze.

Für *P. laevigata* wurde analog zu *I. neei* die zell- und gewebespezifischen Expression der HSS auf Proteinebene untersucht. Allerdings konnte im Gegensatz zu *I. neei* in Western-Blots kein Pflanzenorgan mit deutlicher HSS-Expression auf Proteinebene identifiziert werden (s. Kap. 3.7.2.2). Hinweise auf den Ort der Expression lieferten nur die RT-PCR-Experimente (s. Abb. 3.5., Kap. 3.7.1). Hier konnte in Blättern sowie Wurzeln die HSS-kodierende mRNA nachgewiesen werden. In keinem der beiden Pflanzenorgane gelang jedoch ein immunologischer Nachweis der HSS im Rahmen der *in situ*-Immunolokalisation. Wie bereits unter Kap. 3.7.2.2 ausgeführt, könnte dafür die Sensitivität des Antikörpers mit verantwortlich sein. Im Rahmen dieser Arbeit konnten diese Probleme nicht gelöst werden. Es bliebe noch die Möglichkeit zur Optimierung der Antikörperreinigung.

3.7.3. Genomische Struktur der *hss*- und *dhs*-Gene

Einen wichtigen Punkt dieser Arbeit stellten phylogenetische Untersuchungen zur Evolution der HSS dar (s. Kap. 1.4.1). Für diese Untersuchungen stellten die identifizierten mRNA- bzw. cDNA Sequenzen die Basis dar. Zusätzliche Hinweise auf die Evolution können generell aus der genomischen Organisation abgeleitet werden. Die vererbte Intron-Exon-Struktur kann als weiteres Merkmal herangezogen werden. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit aus den Versuchspflanzen *I. neei* und *P. laevigata* die *hss*- und *dhs*-Gene mit Hilfe der PCR vervielfacht und für nachfolgende Sequenzanalysen kloniert. Als Primer kamen die für die Expression entworfenen genspezifischen Primer zum Einsatz. Ein Richtwert für die Länge der PCR-Produkte lieferten bereits bekannte *hss*- und *dhs*-Gene aus anderen Arten mit einer Länge von 5 – 8 kb. Für die Amplifizierung solcher relativ langer DNA-Fragmente wurde die speziell für solche Anwendungen entwickelte AccuTaq™ LA DNA Polymerase verwendet. Die genauen PCR Parameter und die verwendeten Primer sind in Tabelle 3.8. aufgelistet. Generell war im Vergleich zum PCR-Temperaturprogramm mit cDNA eine kürzere Denaturierungsphase von nur 10 Sekunden erforderlich. Auch die Annealingphase war auf 20 bis 30 Sekunden verkürzt. Hingegen wurde die Elongationsphase in Anbetracht der langen PCR-Produkte auf 20 Minuten verlängert. Ebenso wurde die abschließende Elongationsphase auf 30 Minuten ausgedehnt.

Dieser PCR-Ansatz, zusammengefasst in Tab. 3.9, führte mit genomischer DNA aus *P. laevigata* als Vorlage und bei Verwendung der DHS-spezifischen Primer P36/P37 zur Amplifizierung eines 3,5 kb langen DNA-Fragments sowie eines 2,0 kb langen Fragments mit den HSS-spezifischen Primern P40/P41. Im Fall von *I. neei* gelang es allerdings nur, das *dhs*-Gen mit einer Länge von 2,7 kb mit den Primern P7/P29 zu vervielfältigen. Die PCR mit den entsprechenden HSS-spezifischen Primern (P30/P31) führte zu keiner Bande. Jedoch gelang mit der Kombination des 3'-RACE forward-Primer P6 und den reverse Primer P31 die Amplifikation des 3'-Endes des *hss*-Gens (*hss-1*). Dieses Fragment mit 1,9 kb enthielt 4 Introns und reichte bis zum Stoppcodon am 3'-Ende. Um die Sequenz im 5'-Bereich zu komplettieren, wurde die Methode der inversen PCR eingesetzt (s. Kap. 2.2.16). Nach einem Restriktionsverdau mit *KpnI* und einer PCR mit den für die inverse PCR entworfenen Primern P42/P43 konnte ein 3,1 kb langes Fragment amplifiziert werden (*hss-2*). Allerdings war das 5'-Ende des Gens nicht erreicht. In einem weiteren PCR-Ansatz mit dem für die Amplifikation des ORF entworfenen forward-Primer P30 und einem genspezifischen reverse-Primer (P44), der anhand des bereits bekannten Bereiches der genomischen Sequenz entworfen wurde, gelang letztlich auch die Amplifikation des 5'-Endes. Das in diesem Ansatz amplifizierte 1,2 kb lange Fragment (*hss-3*) enthielt das bereits aus der cDNA bekannte Startcodon und somit den Beginn des kodierenden Bereiches. Diese drei Teilstrecken wurden mit Hilfe der GCG Software zum vollständigen *hss*-Gen mit einer Länge von 5,5 kb zusammengesetzt.

Zusätzlich wurde das *hss*-Gen aus *I. hederifolia* identifiziert. Anlass dafür gaben zunächst anfängliche Schwierigkeiten bei der Amplifikation der HSS-kodierenden cDNA aus dieser Art, die jedoch überwunden werden konnten. Der Vorteil des genomischen Ansatzes lag in der Unabhängigkeit gegenüber der Expression des Gens. Die Vervielfältigung einer cDNA-Sequenz hingegen setzt die Transkription des Genes voraus. Insbesondere da im Anfangsstadium der Arbeit noch keine Daten bezüglich des Expressions-Zeitpunktes und Ortes vorlagen, erschien der genomische Ansatz als eleganter Ausweg. Die PCR zur Suche nach dem *hss*-Gen in *I. hederifolia* wurde mit den Primern P30 und P31 durchgeführt. Diese Primer waren ursprünglich für die Expression des ORF der HSS aus *I. neei* entworfen worden. Wie bereits unter Kapitel 3.6 beschrieben, erlaubte eine hohe Sequenzidentität zwischen den HSS- bzw. den DHS-Sequenzen in nah verwandten *Ipomoea*-Arten die

Amplifikation homologer Sequenzen durch diese eigentlich genspezifischen Primer. Mit dieser PCR konnte das 5,5 kb lange *hss*-Gen aus *I. hederifolia* amplifiziert werden.

Tab. 3.9 PCR-Amplifizierung der *hss*- und *dhs*-Gene aus *P. laevigata* und *I. neei* und des *hss*-Gens aus *I. hederifolia*. Aufgelistet sind die PCR-Parameter, die verwendeten Primer und die Länge des erhaltenen Produktes. Als Template wurde 200 ng genomische DNA eingesetzt. Wenn nicht anders angegeben, wurde die AccuTaq™ LA DNA-Polymerase verwendet. Die Klonierung erfolgte in den pCR®-XL-TOPO® Vector. Vom *hss*-Gen aus *I. neei* wurden drei Teilsequenzen amplifiziert (*hss-1* bis *hss-3*).

Art Gen	Primer	PCR Parameter	Fragmentgröße ^{a)}
<i>P. laevigata</i> <i>dhs</i>	P36 for P37 rev	Annealing-Temp. 65°C 40 Zyklen	3479 bp
<i>P. laevigata</i> <i>hss</i>	P40 for P41 rev	TD 65-55 °C, -0,5°C pro Zyklus Annealing- Temp. 65°C 40 Zyklen	2002 bp
<i>I. neei</i> <i>dhs</i>	P7 for P29 rev	TD 65-55 °C, -0,5°C pro Zyklus Annealing- Temp. 65°C 40 Zyklen	2757 bp
<i>I. neei</i> <i>hss-1</i>	P6 for P31 rev	<i>Pfu</i> DNA Polymerase Annealing- Temp. 65°C 40 Zyklen	1899 bp
<i>I. neei</i> <i>hss-2</i> (inverse PCR)	P42 for P43 rev	Annealing- Temp. 60°C 35 Zyklen	3126 bp
<i>I. neei</i> <i>hss-3</i>	P30 for P44 rev	Annealing- Temp. 60°C 35 Zyklen	1205 bp
<i>I. neei</i> <i>hss</i> ^{b)}			5624 bp
<i>I. hederifolia</i> <i>hss</i>	P30 for P31 rev	TD 65-55 °C, -0,5°C pro Zyklus Annealing- Temp. 65°C 40 Zyklen	5472 bp

^{a)} die Restriktionsschnittstellen der Primersequenzen wurden entfernt und die Stoppcodons (bekannt aus der 3'-RACE) hinzugefügt.

^{b)} vollständige Sequenz des *hss*-Gens, mit Hilfe der GCG Software (s. Kap. 2.2.20) aus den Teilsequenzen *hss-1*, *hss-2* und *hss-3* zusammengesetzt.

Die genomische Struktur der identifizierten *hss*- und *dhs*-Gene aus *Ipomoea* sp. und *P. laevigata* ist durch sechs Introns und dementsprechend 7 Exons gekennzeichnet. Die Position und Phase der Introns ist hoch konserviert. Die Introns unterscheiden sich jedoch stark in ihrer Länge. Intron 1 ist bei den *hss*-Genen aus den *Ipomoea* Arten mit 2951 bp im Fall von *I. neei* und 2965 bp im Fall von *I. hederifolia* besonders lang. Im Vergleich dazu weist Intron 1 des *dhs*-Genes aus *I. neei* nur 357 bp auf. In Tab. 3.13 (auf S. 103) sind die Längen der Exons und Introns zusammengefasst. Diese Tabelle enthält alle im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten Sequenzen (s. dazu auch Kap. 3.9). Für Vergleichszwecke wurden zusätzlich die Daten des *dhs*-Gens aus *Nicotiana tabacum* L. sowie des humanen *dhs*-Gens mit aufgenommen. Als Vertreter aus der Familie der Solanaceae steht *N. tabacum* phylogenetisch in einer nahen Verwandtschaft zu den Convolvulaceae. Dies spiegelt sich

auch in den Daten wieder – die Länge der Exons 2-6 ist identisch. Die Tabelle verdeutlicht unter anderem die hohe Konservierung der Intronanzahl innerhalb des Pflanzenreichs. Besitzt die humane DHS 8 Introns, so zeichnen sich die *dhs*- und *hss*-Gene der Pflanzen durch vorwiegend 6 Introns aus. Einzig die *hss*-Gene der Senecioneae (nicht in Tab. 3.13 enthalten) besitzen nur 5 Introns (Reimann et al. 2004). Ebenso konserviert ist die Exonlänge. In den im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Genen ist nur in den Exons E1, E5 und E7 eine Variabilität zu beobachten. Dabei ist auffällig, dass bei allen *hss*-Genen der Convolvulaceae Exon 7 eine Länge von 78 bp aufweist, dagegen besitzt dieses Exon bei den *dhs*-Genen eine Länge von 87 bp. Eine ähnliche, wenn auch nicht so deutliche Zweiteilung kann auch bei Exon 1 beobachtet werden. Mit Exonlängen von 210 bp und 201 bp unterscheiden sich *hss*-Gene von den *dhs*-Genen, bei denen Exon 1 219 bp, 216 bp und 213 bp aufweist. Insgesamt belegt damit die genomische Organisation den Ursprung der *hss*-Gene durch ein ursprüngliches Duplikationsereignis des *dhs*-Gens in den Convolvulaceae (s. Kap. 3.8).

3.8. Evolution der HSS-kodierenden Sequenzen innerhalb der Angiospermen

Die HSS, das Eingangsenzym der PA-Biosynthese, nimmt eine Schlüsselposition in der Entstehung der PAs im Pflanzenreich ein. In vorhergehenden Arbeiten wurde die unabhängige und wiederholte Rekrutierung der HSS und damit der polyphyletische Ursprung der PAs durch Genduplikation nachgewiesen (Reimann et al. 2004). Damit erwies sich die Evolution der HSS als hervorragendes Modellsystem, um konvergente Evolution mit Genduplikation als zu Grunde liegender Mechanismus genauer zu untersuchen. Ein grundlegendes Anliegen dieser Arbeit war zunächst die Aufklärung der Anzahl der unabhängigen Ursprünge innerhalb der Convolvulaceae und Apocynaceae im Vergleich zu weiteren bekannten Sequenzen der Angiospermen. Ein wichtiges Ziel stellte somit die Rekonstruktion eines Stammbaumes der HSS- und DHS-kodierenden cDNA-Sequenzen mit Hilfe phylogenetischer Analysen dar. In die Analysen flossen die Daten der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten und charakterisierten cDNA-Sequenzen. Zusätzlich wurden bereits bekannte homologe Sequenzen aus Vertretern verschiedener Angiospermen-Familien miteinbezogen.

In Tab. 3.10 sind die für die Analyse verwendeten Sequenzen aufgelistet. Für die Berechnungen wurde der komplette ORF der cDNA-kodierenden Sequenzen verwendet. Wenn für die PCR-Vervielfachung Primer eingesetzt worden waren, die ursprünglich für die

genspezifische Amplifikation einer homologen Sequenz in einer nah verwandten Art entworfen worden waren, dann wurde die Sequenz der Primerbindungsstelle aus den Analysen ausgeschlossen (s. dazu Kap. 3.6). Dies betrifft die DHS aus *I. neei*, die HSS aus *I. hederifolia* sowie HSS und DHS aus *I. meyeri*.

Tab. 3.10 HSS- und DHS-kodierende cDNA-Sequenzen, die für phylogenetische herangezogen wurden.

cDNA	Art	Länge des ORF	Akzessionsnummer	Literatur
Boraginaceae				
DHS	<i>Heliotropium indicum</i>	1116 bp	AJ704844.1	(Reimann et al. 2004)
DHS	<i>Symphytum officinale</i>	1119 bp	AJ704852.1	(Reimann et al. 2004)
DHS	<i>Cynoglossum officinale</i>	1119 bp	AJ704839.1	(Reimann et al. 2004)
HSS	<i>Heliotropium indicum</i>	1095 bp	AJ704843.1	(Reimann et al. 2004)
HSS	<i>Symphytum officinale</i>	1128 bp	AJ704851.1	(Reimann et al. 2004)
HSS	<i>Cynoglossum officinale</i>	1110 bp	AJ704840.1	(Reimann et al. 2004)
Solanaceae				
DHS	<i>Nicotiana tabacum</i>	1140 bp	AJ242017.1	(Ober und Hartmann 1999a)
Fabaceae				
DHS	<i>Crotalaria retusa</i>	1116 bp	AJ704838.1	(Reimann et al. 2004)
Orchidaceae				
HSS	<i>Phalaenopsis</i> sp.	1116 bp	AJ704848.1	(Reimann et al. 2004)
Asteraceae – Tribus Eupatorieae				
DHS	<i>Eupatorium cannabinum</i>	1125 bp	AJ704841.1	(Reimann et al. 2004)
HSS	<i>Eupatorium cannabinum</i>	1128 bp	AJ704842.1	(Reimann et al. 2004)
Asteraceae – Tribus Senecioneae				
DHS	<i>Petasites hybridus</i>	1098 bp	AJ704846.1	(Reimann et al. 2004)
DHS	<i>Senecio vernalis</i>	1116 bp	AJ238622.1	(Reimann et al. 2004)
HSS	<i>Petasites hybridus</i>	1110 bp	AJ704847.1	(Reimann et al. 2004)
HSS	<i>Senecio jacobaea</i>	1119 bp	AJ704850.1	(Reimann et al. 2004)
HSS1	<i>Senecio vernalis</i>	1113 bp	AJ238623.1	(Ober und Hartmann 1999b)
HSS2	<i>Senecio vernalis</i>	1113 bp	AJ704849.1	(Reimann et al. 2004)
HSS	<i>Senecio vulgaris</i>	1113 bp	AJ251500.1	(Ober et al. 2000)
Convolvulaceae				
DHS	<i>Ipomoea neei</i>	1103 bp ^{a)}		
DHS	<i>Ipomoea hederifolia</i>	1149 bp		
DHS	<i>Ipomoea meyeri</i>	1103 bp ^{a)}		
DHS	<i>Merremia quinquefolia</i>	1143 bp		
HSS	<i>Ipomoea neei</i>	1131 bp		
HSS	<i>Ipomoea hederifolia</i>	1070 bp ^{b)}		
HSS	<i>Ipomoea meyeri</i>	1070 bp ^{b)}		
HSS	<i>Merremia quinquefolia</i>	1128 bp		
Apocynaceae				
DHS	<i>Parsonsia laevigata</i>	1107 bp		
HSS	<i>Parsonsia laevigata</i>	1098 bp		

^{a)} ORF insgesamt 1149 bp, die Sequenz der Primerbindungsstelle wurde entfernt

^{b)} ORF insgesamt 1131 bp, die Sequenz der Primerbindungsstelle wurde entfernt

Mit Hilfe der heuristischen Suche wurde nach dem „Maximum Parsimony“-Kriterium (MP-Kriterium) ein Stammbaum ermittelt, der die wenigsten Merkmalsänderungen erfordert. Dabei entspricht jede Sequenzposition einem Merkmal. In Abb. 3.11 ist das Ergebnis, ein ungewurzelter (*engl.* unrooted) MP-Baum, dargestellt, der auf den Nukleinsäure-

Sequenzen der insgesamt 28 cDNA-Sequenzen beruht (s. Tab. 3.10). Die Baumlänge beträgt in Summe 3004 Schritte bei einem „Consistency index“ (CI) von 0,4501 und „Retention index“ (RI) von 0,6323 berechnet. Beide Indices dienen zur Quantifizierung von Homoplasie im Datensatz. Dabei gilt, dass Merkmale ohne Homoplasie einen CI von 1 besitzen und der RI in diesem idealen Fall ebenfalls 1 beträgt (Knoop und Müller 2006).

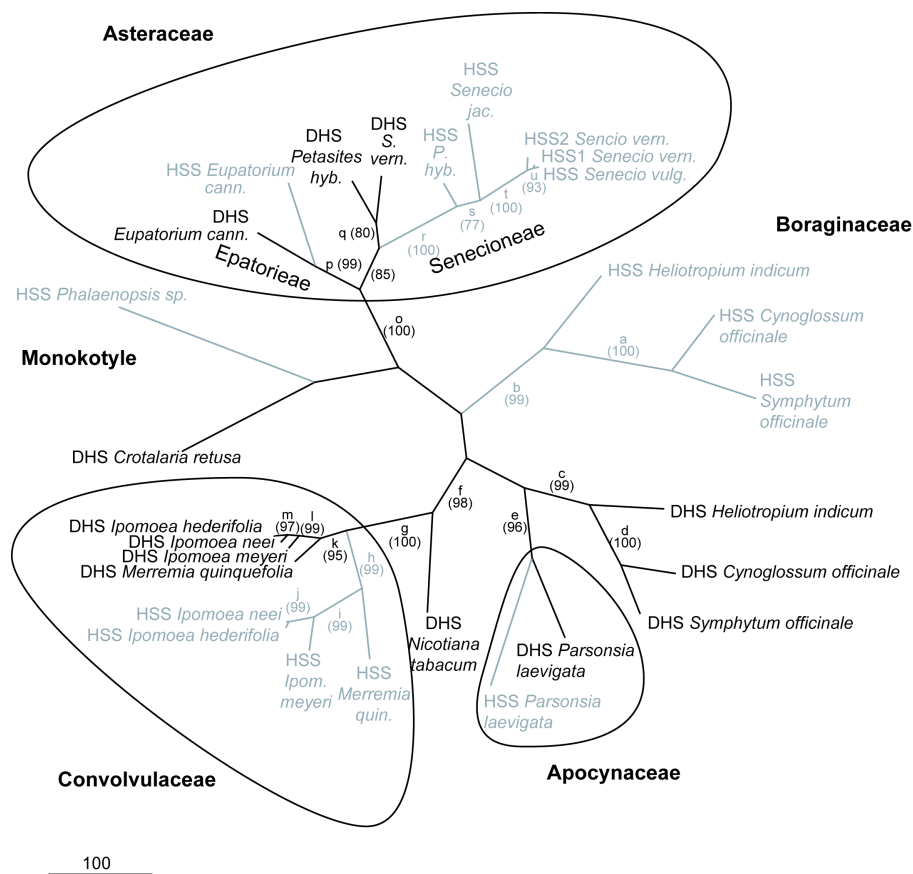


Abb. 3.11 Ungewurzelter Maximum Parsimony-Baum, basierend auf 28 HSS- und DHS-kodierenden cDNA-Sequenzen aus verschiedenen Angiospermen. Die Bootstrap-Werte aus 10.000 Bootstrap-Wiederholungen sind in Klammern unterhalb der Bezeichnung der Zweige a - u angegeben. Bootstrap-Unterstützungen für Zweige unter 50% wurden nicht angegeben. HSS-kodierende cDNA-Sequenzen sind in grau dargestellt, DHS-kodierende cDNA-Sequenzen in schwarz. Die Zweiglängen entsprechen der Anzahl der Merkmalsänderungen bezogen auf die Gesamtsequenz. Folgende Abkürzungen wurden verwendet: *Eupatorium cann.* *Eupatorium cannabinum*; *Petasites hyb.* und *P. hyb.* *Petasites hybridus*; *Senecio vern.* und *S. vern.* *Senecio vernalis*; *Senecio jac.* *Senecio jacobaea*, *Senecio vulg.* *Senecio vulgaris*, *Merremia quin.* *Merremia quinquefolia*.

Neben dieser MP-Analyse wurde auch ein „Maximum Likelihood“-Baum (ML-Baum) erstellt. Bei der ML-Methode können unterschiedliche Substitutionsmodelle zum Verlauf der DNA-Sequenzentwicklung berücksichtigt werden. Es existieren hier eine Reihe von

Modellen mit zunehmend komplexen Annahmen. Das für die hier verwendeten Daten am besten geeignete Modell wurde mit Hilfe der Software „Modeltests“ (Posada und Crandall 1998) ermittelt. Es hilft, das einfachste Modell zu finden, mit dem bei einem gegebenen Datensatz und einem gegebenen Baum die wenigsten Modellannahmen gemacht werden müssen (Knoop und Müller 2006). Dazu vergleicht es 56 Modelle zur Sequenzevolution und bestimmt mit Hilfe des „hierarchical Likelihood Ratio Tests“ (hLRTs) und des „corrected Akaike Information Criterion“ (AICc) das beste Modell (Knoop und Müller 2006).

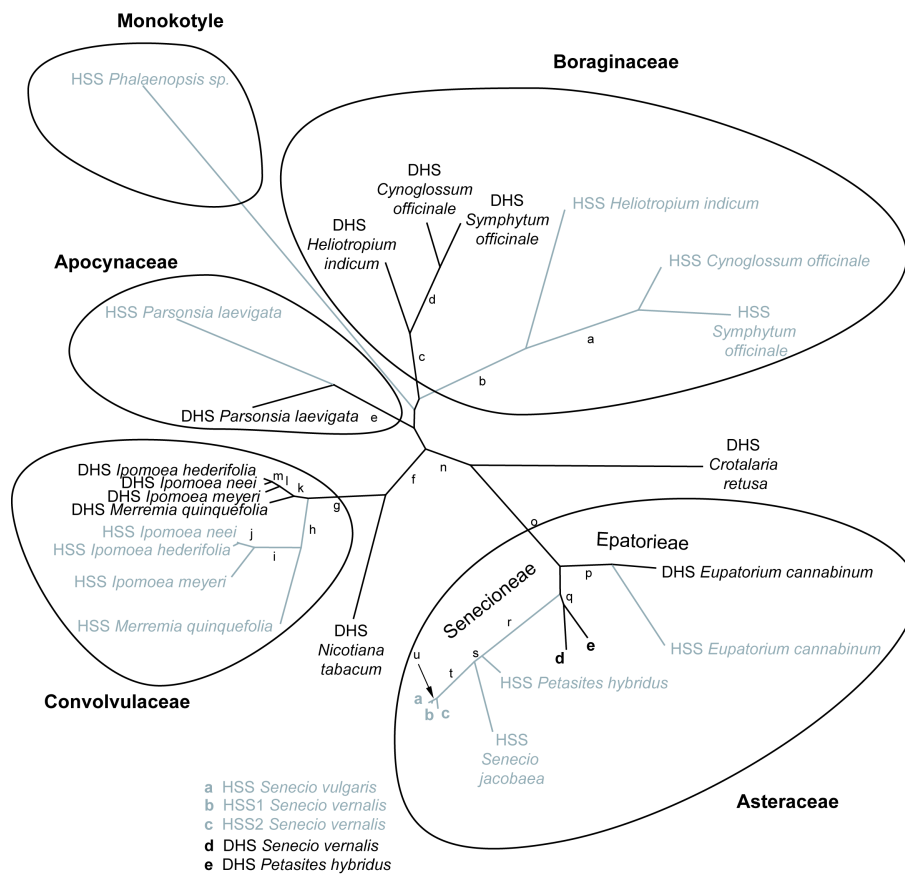


Abb. 3.12 Ungewurzelter Maximum Likelihood-Baum, basierend auf 28 HSS- und DHS- kodierenden cDNA-Sequenzen aus verschiedenen Angiospermen. Den Zweigen sind die Kleinbuchstaben *a - u* zugeordnet. Die HSS- kodierenden cDNA-Sequenzen sind in grau dargestellt, HSS- kodierenden in schwarz. Die Zweiglängen entsprechen der Anzahl der Substitutionen pro Sequenzposition.

Für diesen Datensatz wurde als Ergebnis des hLRTs das GTR+G+I Modell vorgeschlagen mit relativen Substitutionsraten für (A-G) von 2,8758 und (C-T) von 3,3745. Laut dem AICc wurde ebenfalls das GTR+G+I Modell empfohlen mit relativen Substitutionsraten für (A-C) von 2,5995, (A-G) von 5,2271, (A-T) von 1,9576, (C-G) von 2.0132 und (C-T) von

6,5085. Für beide Substitutionsraten wurden mittels einer heuristischen Suche mit der Software PAUP Stammbäume ermittelt. Diese unterscheiden sich in ihrer Topologie nicht voneinander. In Abb. 3.12 ist stellvertretend der ML-Baum basierend auf dem Modell des hLRTs dargestellt.

Die statistische Unterstützung der Knoten wurde mit Hilfe der „Tree-Puzzle“ Software (Schmidt et al. 2002), die auf der Quartett-Methode basiert, für beide Stammbäume ermittelt und ist in Tab. 3.11 zusammengefasst. Diese Tabelle enthält auch die Bootstrap-Werte des MP-Baumes.

Tab. 3.11 Statistische Unterstützung für die Zweige a – u in den ML- und MP-Stammbäumen (s. dazu Abb. 3.11 und Abb. 3.12). Bei den ML-Stammbäumen werden die beide Modelle der Sequenzevolution, die die hLRTs und des AICcs

Zweig	ML-Baum(nach dem hLRT des Modeltests) ^{a)}	ML-Baum (nach dem AICc des Modeltests) ^{a)}	MP-Baum ^{b)}
a	94	94	100
b	82	82	99
c	88	88	99
d	96	97	100
e	66	65	96
f	99	99	98
g	99	99	100
h	100	100	99
i	100	100	99
j	100	100	99
k	99	99	95
l	100	100	99
m	100	100	97
n	58	56	-
o	81	80	100
p	89	89	99
q	90	92	80
r	96	96	100
s	74	62	77
t	99	99	100
u	100	100	93

^{a)} die statistische Unterstützung wurde mit Hilfe der Quartett-Methode berechnet

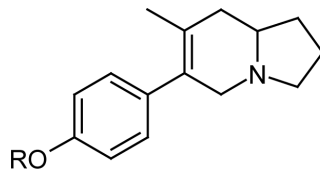
^{b)} Bootstrap-Werte basierend auf 10.000 Bootstrap-Wiederholungen

Mit Ausnahme der Gruppierung der DHS aus *Crotalaria retusa* unterscheiden sich die beiden Bäume aus der MP- und ML-Analyse nicht hinsichtlich des Verzweigungsmusters. Diese gut unterstützte Topologie der Stammbäume bestätigt einerseits die bereits bekannten, unabhängigen Ursprünge der HSS-kodierenden Sequenzen durch Duplikation des ursprünglichen *dhs*-Genes innerhalb der Monokotylen, den Familien der Boraginaceae und den Triben der Senecioneae und Eupatorieae der Asteraceae (Reimann et al. 2004). Zusätzlich spre-

chen diese phylogenetischen Analysen für zwei weitere unabhängige Rekrutierungen der HSS-kodierenden Sequenzen: eine in den Convolvulaceae und ebenfalls eine in der Familie der Apocynaceae. Die Convolvulaceae sind wie bereits eingangs erwähnt besonders durch das verstreute und isolierte Vorkommen der PAs in wenigen Arten interessant. Nach den hier präsentierten Analysen scheint die HSS durch ein einmaliges Duplikationsereignis in der frühen Evolution dieser Familie entstanden zu sein. In Anbetracht dieser Phylogenie ergab sich die Frage nach dem Verbleib der durch die Duplikation entstandenen Kopie des ursprünglichen *dhs*-Genes in weiteren Arten, auch jenen, die keine PAs akkumulieren. Durch eine weitere Suche, beschrieben unter Kap. 3.9, konnten zusätzlichen Sequenzen identifiziert werden. Diese waren Gegenstand weiterer phylogenetischer Analysen, die unter Kap. 3.11 beschrieben sind.

3.9. *dhs*- und *hss*- Gene in nicht PA-produzierenden Convolvulaceen Arten

Am Beginn dieser Arbeit lag ein Hauptaugenmerk in der Untersuchung der Evolution der HSS in PA-produzierenden Arten der Familie der Convolvulaceae. Unter Berücksichtigung der vermutlichen Entstehung des *hss*-Gens aus dem *dhs*-Gen durch eine einmalige Genduplikation in der frühen Evolution dieser Familie (s. Kap. 3.8) stellte sich jedoch auch die Frage nach dem evolutiven Schicksal der Genkopie in anderen, heute nicht PA-produzierenden Arten. Besitzen auch diese Arten noch eine Kopie des duplizierten Gens bzw. findet man Spuren davon? Um diese Frage zu klären, wurden durch einen PCR-Ansatz zum *dhs*-Gen homologe Sequenzen in der genomischen DNA aus den PA-freien Arten *Ipomoea alba* L., *Ipomoea purpurea* L., *Convolvulus arvensis* L. und *C. tricolor* L. gesucht. Diese Arten wurden ausgewählt, um eine möglichst große taxonomische Bandbreite der Convolvulaceae zu untersuchen. Mit Ausnahme von *I. alba* wurden bisher keine Alkaloide in den genannten Arten detektiert (Prof. Dr. Eich, Institute of Pharmacy, Freie Universität Berlin, mündliche Kommunikation und Eich (2007)). *I. alba* akkumuliert Alkaloide, allerdings keine PAs, sondern Indolizidin-Alkaloide wie etwa Ipalbidin, welches in Abb. 3.13 dargestellt ist (Gourley et al. 1969; Eich 2007). Über die Biosynthese des Indolizidin-Grundkörpers mit 9 Kohlenstoffatomen, der aus einem bizyklischen System besteht und der entfernte Ähnlichkeit zu dem der PAs hat, ist nichts bekannt. Jedoch erscheint ein Biosyntheseweg mit Homospermidin als Vorstufe als möglich.



- 1 lpalbidin (R = H)
- 2 lpalbin (R = D-Glucose)

Abb. 3.13 Indolizidin-Alkaloide aus *Ipomoea alba*.

Die Verwendung der genomischen DNA im Gegensatz von cDNA in diesem Ansatz brachte zwei Vorteile. Zum einen konnten dadurch auch nicht exprimierte Gene, sogenannte stille Gene, entdeckt werden. Zum anderen konnten auch eventuell Reste eines durch Mutationen zerstörten Genduplikates identifiziert werden. Für die Suche nach diesen weiteren Genen wurden zum Teil degenerierte Primer (P45 – P48) verwendet. Diese wurden anhand eines Nukleinsäure-Alignments aller bis zu diesem Zeitpunkt bekannter HSS- und DHS-kodierender cDNA-Sequenzen aus den Convolvulaceae entworfen. Zusätzlich wurden die DHS-kodierenden Sequenzen aus *Nicotiana tabacum* L. und *Solanum lycopersicum* L. syn. *Solanum lycopersicum* (Solanaceae) in das Alignment als Außengruppe (engl. outgroup) aufgenommen. Dadurch konnten familienspezifische Consensus-Sequenzen ermittelt werden. Die Bindungsstellen der Primer sind in Abb. 3.14 schematisch dargestellt. Daraus wird ersichtlich, dass je nach Primerkombination interne Fragmente vervielfacht wurde, die eine unterschiedliche Zahl an Exons und Introns enthielten.

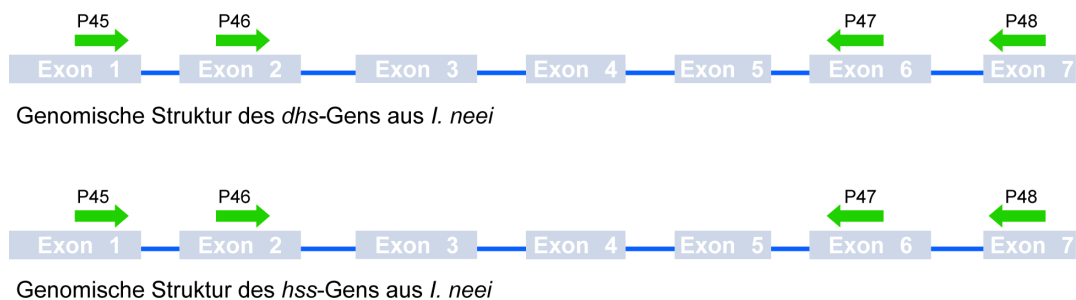


Abb. 3.14 Schematische Darstellung des *dhs*- und *hss*-Gens aus *I. neei*. Eingezeichnet sind die Bindungsstellen der degenerierten Primer P45-P48.

Aufgrund der hohen Sequenzidentität der *hss*- und *dhs*-Gene führte in manchen Fällen auch eine PCR mit den Primern für die Expression der HSS aus *I. neei* (P30+P31) und DHS

aus *I. hederifolia* (P7+P8) zu einem positiven PCR Produkt für homologen Sequenzen aus verwandten Convolvulaceae-Arten. Dadurch konnte für einige Arten auch die gesamte Sequenz der homologen Gene vom Start- bis zum Stoppcodon aufgeklärt werden, hingegen bei einer PCR mit degenerierten Primer konnte nur ein internes Fragment vervielfacht werden (s. Abb. 3.14). In Tab. 3.12 sind die erfolgreichen Primerkombinationen, PCR-Parameter sowie die Länge der PCR-Produkte zusammen gefasst. Zur Sequenzierung wurden die PCR-Produkte in den pGEM-T[®] Easy Vector oder pCR[®]-XL-TOPO[®] Vector kloniert. Die identifizierten Sequenzen wurden auf der Basis von Sequenzvergleichen mit den bereits biochemisch charakterisierten Genen aus *I. neei* als vermutliche *dhs-* oder *hss-*Gene klassifiziert.

Mit degenerierten Primern konnte bei *I. purpurea* (*ipurp-1*) sowie *C. tricolor* (*itri-1*) jeweils ein internes Fragment von einer zur DHS und HSS homologen Sequenz identifiziert werden. Durch die Amplifizierung mit unterschiedlichen degenerierten Primer unterscheiden sich diese Fragmente in ihrer Länge und enthalten dem entsprechend auch eine unterschiedliche Zahl an Introns (s. Abb. 3.14). Im Falle von *ipurp-1* umfasst das Fragment einen Abschnitt der vier Introns beinhaltet und bei *itri-1* umfasst der Abschnitt sechs Introns. In ihrer Position und Phase gleichen diese Introns der typischen genomischen Struktur der bereits bekannten *hss-* und *dhs-*Gene aus den Convolvulaceae. Zusätzlich gelang es in *I. purpurea* mit den für die DHS aus *I. hederifolia* spezifischen Primern P7+P8 eine weitere Sequenz, *ipurp-2*, zu amplifizieren. *ipurp-2* enthält den gesamten ORF eines vermutlich DHS-kodierenden Gens und weist zu *ipurp-1* eine Nukleinsäureidentität von 97,8 % auf. Vermutlich stellen beide Sequenzen Allele des *dhs-*Gens in *I. purpurea* dar. Die Sequenzdaten sprechen in beiden Fällen für funktionsfähige Gene. Die Exonsequenzen beider Gene zeigen auf Nukleinsäureebene eine Identität von 99,3% und auf Aminosäureebene 98,98 %.

Tab. 3.12 PCR-Amplifizierung der *hss* und *dhs* Gene aus *I. alba*, *I. purpurea*, *C. arvensis* und *C. tricolor*. Aufgelistet sind die PCR-Parameter, die verwendeten Primer, Vektor und die Länge des erhaltenen Produktes. Als Template wurde 200 ng genomische DNA eingesetzt und als Enzym wurde die AccuTaq™ LA DNA-Polymerase verwendet.

Art PCR-Produkt (Gen)	Primer	PCR Parameter ^{a)}	Vektor	Fragmentgröße
<i>I. alba</i> <i>ialb-1 (dhs)</i>	P7/P8	Annealing-Temp. 58°C 40 Zyklen	pGEM-T® Easy Vector	3066 bp ^{b)}
<i>I. alba</i> <i>ialb-2 (hss)</i>	P30/P31	Annealing-Temp. 58°C 40 Zyklen	pGEM-T® Easy Vector	4490 bp ^{b)}
<i>I. purpurea</i> <i>ipurp-1 (dhs)</i>	P46/P47	Annealing-Temp. 58°C 40 Zyklen	pCR®-XL- TOPO® Vector	1919 bp
<i>I. purpurea</i> <i>ipurp-2 (dhs)</i>	P7/P8	Annealing-Temp. 58°C 40 Zyklen	pGEM-T® Easy Vector	2732 bp ^{b)}
<i>C. arvensis</i> <i>carv-1 (dhs)</i>	P45/P48	Annealing-Temp. 60°C 40 Zyklen	pCR®-XL- TOPO® Vector	2894 bp
<i>C. arvensis</i> <i>carv-2 (hss)</i>	P46/P48	Annealing-Temp. 60°C 40 Zyklen	pCR®-XL- TOPO® Vector	1639 bp
<i>C. arvensis</i> <i>carv-3 (hss)</i>	P30/P31	Annealing-Temp. 58°C 40 Zyklen	pGEM-T® Easy Vector	6688 bp ^{b)}
<i>C. tricolor</i> <i>ctri-1 (dhs)</i>	P45/P48	Annealing-Temp. 60°C 40 Zyklen	pCR®-XL- TOPO® Vector	2018 bp

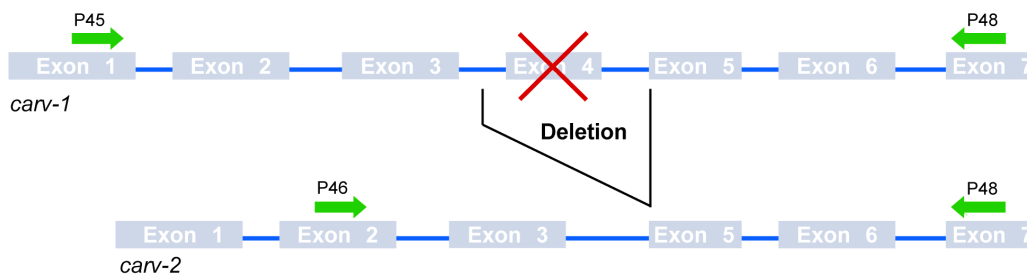
^{a)} Temperaturprogramm s. Kap. 2.2.15

^{b)} ohne Stoppcodon, da dieses durch den Einsatz der Primer P8 und P29 nicht amplifiziert wurde

Die Sequenz *ialb-1* aus *I. alba* wurde mit den Expressionsprimern für die DHS-kodierende cDNA-Sequenz aus *I. hederifolia* amplifiziert (P7+P8). Auch hier sind Position und Phase der Introns identisch zu denen bereits charakterisierter *dhs*- und *hss*-Gene. In Sequenzvergleichen der Exon-Sequenzen auf Nukleinsäureebene zeigen diese drei Gensequenzen, *ipurp-1*, *ipurp-2* und *ialb-1*, mit 93-97 % eine hohe Identität zu bereits bekannten DHS-kodierenden cDNA-Sequenzen. Damit sprechen diese Daten relativ deutlich für die Identifikation weiterer *dhs*-Gene. Interessanterweise gelang allerdings die Amplifikation zusätzlicher homologer Sequenzen in den Arten *C. arvensis* und *I. alba*. Aus *C. arvensis* wurden in einem PCR-Ansatz mit den degenerierten Primern P46+P48 zwei Sequenzen gemeinsam amplifiziert. Unterschieden wurden beide nach der Klonierung in den pCR®-XL-TOPO® Vector durch Restriktionsanalysen der Plasmid-DNA. In Sequenzanalysen zeigten diese Sequenzen zueinander nur eine Identität von 78 % auf Nukleinsäureebene. Es handelte sich demnach um zwei verschiedene Gene. Da degenerierte Primer in der PCR eingesetzt worden waren, fehlten aber das 5'- sowie das 3'-Ende. Einen Versuch, diese Bereiche aufzuklären, stellte eine PCR mit Primern für die Expression der HSS aus *I. neei* (P30+P31) und DHS aus *I. hederifolia* (P7+P8) dar. Während die PCR mit den Primer P7 und P29 zu keinem Ergebnis führte, konnte mit den Primern P30 und P31 ein deutliches Produkt amplifiziert werden. Überraschenderweise zeigte dieses 6688 bp lange Fragment, *carv-3*, aller-

dings nur eine Identität auf Nukleinsäureebene von 86 % zu *carv-2* und 83,7 % zur *carv-1*. Somit wurde durch diesen Versuchsansatz eine dritte homologe Sequenz in *C. arvensis* identifiziert. Vergleiche der Sequenzen zeigten, dass in *carv-2* Exon 4 vollständig fehlt. *carv-3* besitzt dieses Exon, allerdings ist die korrekte Erkennungsstelle für das Spleißen im 5'-Bereich des darauf folgenden Introns 5 durch Mutationen, die sowohl Deletionen wie Insertionen umfassen, zerstört. Beide Sequenzen scheinen damit nicht mehr funktional und somit Pseudogene zu sein. In Abb. 3.15 ist die genomische Organisation der Sequenzen *carv-1*, *carv-2* und *carv-3* durch eine schematischen Darstellung der Exon-Intron-Strukturen veranschaulicht. Die Bindungsstelle der in der PCR eingesetzten Primer sind eingezeichnet. Daraus wird ersichtlich, welche Exons und Introns die amplifizierten Sequenzen enthielten. *carv-1* entspricht Sequenzvergleichen zufolge dem *dhs*-Gen, *carv-2* sowie *carv-3* sind vermutlich Kopien diese *dhs*-Gens, entstanden durch Genduplikation. Im Laufe der Evolution akkumulierten diese Tochtergene nonsense-Mutationen an. Beide Sequenzen sind dadurch nicht mehr funktional.

A Genomische Struktur des Pseudogenes *carv-2* im Vergleich zum *dhs*-Gens *carv-1*



B Genomische Struktur des Pseudogenes *carv-3* im Vergleich zum *dhs*-Gen *carv-1*

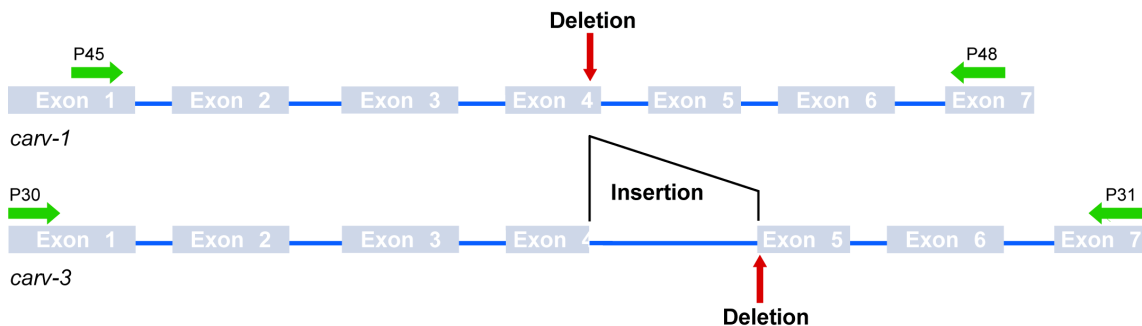


Abb. 3.15 Genomische Organisation der Sequenzen *carv-1* (2894 bp), *carv-2* (1639 bp) und *carv-3* (6688 bp) aus *C. arvensis*.

In *I. alba* stellte sich die Situation jedoch völlig anders dar. Wie bereits erwähnt, konnte mit den Expressionsprimern für die DHS aus *I. hederifolia* (P7/P29) ein vermutliches *dhs*-Gen (*ialb-1*) identifiziert werden. Zusätzlich gelang die Amplifizierung einer weiteren Sequenz (*ialb-2*) mit Hilfe der Expressionsprimer für die HSS aus *I. neei*. Diese 4490 bp lange Sequenz zeigt die für *hss*- und *dhs*-Gene charakteristische Organisation in 7 Exons und entsprechend 6 Introns, wobei auch die Phase der Introns identisch zu denen der anderen bekannten *hss*- und *dhs*-Gene ist. In diesem Fall lassen die Sequenzdaten allerdings keine offensichtlichen nonsense-Mutationen erkennen. Sequenzvergleiche der Exonsequenzen auf Nukleinsäureebene ergaben 87 % Identität zu den Exonsequenzen des vermutlichen *dhs*-Gens aus *I. alba*, jedoch 95 % Identität zu Exonsequenzen des *hss*-Gens aus *I. neei*. Diese Sequenzdaten legen den Schluss nahe, dass die PA-freie Art *I. alba* möglicherweise ein funktionales *hss*-Gen besitzt. Um dies zu überprüfen, musste zuerst geklärt werden, ob *ialb-2* ein aktives Gen darstellt. Dazu wurde der Nachweis der mRNA-Transkripte mit Hilfe der RT-PCR gewählt (s. Kap. 3.10).

Abschließend zu diesem Kapitel sind in Tab. 3.13 die Längen der Exons und Introns der Convolvulaceae Gene zusammen mit den Genen aus *P. laevigata* und *N. tabacum* aufgelistet. Deutlich wird dadurch der hohe Grad an Ähnlichkeit der Gene innerhalb einer Familie bezüglich der Intron-Exon-Struktur. Zusätzlich veranschaulicht der Vergleich mit dem humanen *dhs*-Gen die hohe Konservierung der genomischen Struktur.

Tab. 3.13 Genomische Organisation der *hss*- und *dhs*-Gene. Aufgeführt sind die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Sequenzen sowie zum Vergleich die *dhs*-Gene aus *Nicotiana tabacum* (Solanaceae) und *Homo sapiens*. Die Pseudogene *carv-2* und *carv-3* sind grau schattiert. Aufgelistet sind die Exons (E1-E7) und Introns (I1-I6) mit ihrer jeweiligen Länge (bp). In der humanen DHS finden sich zwei zusätzliche Introns (I, nicht nummeriert), die in Pflanzen nicht auftreten. Exons der Convolvulaceae-Sequenzen mit variablen Längen sind grau eingrahmt.

Gen/Art	Sequenz	E1	I1	E2	I2	E3	I	E3	I3	E4	I4	E5	I5	E6	I	E6	I6	E7	
Convolvulaceae																			
<i>dhs/I. neei</i>		219	358	168	588	122	0	97	293	87	176	133	76	110	0	126	117	87	
<i>dhs/I. alba</i>	<i>ialb-1</i>	219	369	168	794	122	0	97	422	87	338	133	78	110	0	126	96	87	
<i>dhs/I. purpurea</i> ^{c)}	<i>ipurp-1</i>	<i>a)</i>	<i>a)</i>	<i>a)</i>	630	122	0	97	405	87	176	130	80	110	0	<i>a)</i>	<i>a)</i>	<i>a)</i>	
<i>dhs/I. purpurea</i> ^{c)}	<i>ipurp-2</i>	216	443	168	227	122	0	97	407	87	163	130	79	110	0	126	223	87	
<i>dhs/I. hederifolia</i> ^{b)}		219		168		122		97		87		133		110		126		87	
<i>dhs/I. meyeri</i> ^{b)}		219		168		122		97		87		133		110		126		87	
<i>dhs/M. quinquefolia</i> ^{b)}		213		168		122		97		87		133		110		126		87	
<i>dhs/C. tricolor</i> ^{c)}	<i>ctri-1</i>	<i>a)</i>	105	168	291	122	0	97	340	87	109	133	76	110	0	126	192	<i>a)</i>	
<i>dhs/C. arvensis</i> ^{c)}	<i>carv-1</i>	<i>a)</i>	300	168	593	122	0	97	432	87	343	133	85	110	0	126	236	<i>a)</i>	
<i>C. arvensis</i>	<i>carv-2</i>	<i>a)</i>	<i>a)</i>	<i>a)</i>	582	122	0	97	160	x	x	133	80	110	0	126	405	<i>a)</i>	
<i>C. arvensis</i>	<i>carv-3</i>	213	1319	168	1001	122	0	97	139	67	2948	132	80	110	0	126	91	78	
<i>hss/I. neei</i>		210	2736	168	538	122	0	97	76	87	943	133	82	110	0	126	118	78	
<i>hss/I. hederifolia</i>		210	2971	168	521	122	0	97	77	87	584	133	82	110	0	126	114	78	
<i>hss/I. alba</i>	<i>ialb-2</i>	210	1164	168	756	122	0	97	78	87	1158	133	85	110	0	126	121	78	
<i>hss/M. quinquefolia</i> ^{b)}		201		168		122		97		87		133		110		126		78	
Solanaceae																			
<i>dhs/N. tabacum</i> ^{e)}		201	778	168	522	122	0	97	270	87	897	133	85	110	0	126	474	96	
Apocynaceae																			
<i>hss/P. laevigata</i>		207	103	168	86	122	0	97	292	87	110	109	186	110	0	126	120	72 ^{d)}	
<i>dhs/P. laevigata</i>		207	165	168	208	122	0	97	590	87	1089	106	141	110	0	126	180	84	
<i>dhs/H. sapiens</i> ^{d)}		207	1233	165	238	122	80	97	79	87	2060	106	79	104	965	126	83	96	

^{a)} durch die PCR-Amplifizierung mit degenerierten Primern sind die Sequenzen im 5'- sowie 3'-Bereich nicht vollständig

^{b)} die Lage der Introns wurde anhand von Vergleichen in der cDNA-kodierenden Sequenz postuliert

^{c)} diese Sequenzen sind auf Basis von Sequenzvergleichen als *dhs*-Gene identifiziert worden (s. Kap. 3.11), eine biochemische Charakterisierung erfolgte nicht

^{d)} Länge des Exons anhand der Position des Stopcodons in der Sequenz *parslaev_2** verwendet wird, s. Kap. 3.4

^{e)} GenBank Akzessionsnummer AJ242017

^{f)} GenBank Akzessionsnummer NC_000019.8

3.10. Charakterisierung der putativen HSS und DHS aus *Ipomoea alba*

3.10.1. RT-PCR

Zur Überprüfung der Expression der unter Kap. 3.9 identifizierten Gene aus *I. alba* wurde die RT-PCR gewählt. Analog zu den bereits beschriebenen RT-PCR Experimenten (s. Kap. 3.7.1) wurde Gesamt-RNA aus den Pflanzenorganen Wurzel, Sprossachse, Blatt und junge Sprossspitze isoliert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Die RT-PCR wurde mit den gleichen Primern durchgeführt, die bereits erfolgreich für die Amplifikation der genomischen Sequenzen angewendet wurden: P7/29 für *ialb-1* und P30/31 für *ialb-2*. Um die PCR-Produkte direkt zur Klonierung in Expressionsvektoren und anschließende heterologer Expression in *E. coli* (s. Kap. 3.10.2) verwenden zu können, wurden für die RT-PCR proof-reading Polymerasen eingesetzt.

Tatsächlich wurden mit diesem Ansatz die cDNAs beider Genen in den Sprossachsen nachgewiesen. Die PCR-Parameter für die erfolgreiche Amplifizierung sind in Tab. 3.14 zusammengefasst. In den weiteren Pflanzenorganen jedoch misslang der Nachweis. Da aber vordergründig das Vorhandensein oder nicht Vorhandensein der Genprodukte überprüft werden sollte, wurde die RT-PCR nicht weiter dahingehend optimiert, die cDNA des *dhs*-Genes in allen Pflanzenorganen nachzuweisen (s. Kap. 3.7.1).

Tab. 3.14 Amplifizierung des ORF vermutlicher HSS- und DHS-kodierender cDNAs aus *I. alba*.

Sequenz	Primer	Pflanzenorgan zur cDNA Synthese	PCR Parameter	Länge des ORF ^{c)}
ipomalba_1 DHS ^{b)}	P7 for P29 rev	Sprossachse ^{a)}	<i>Pfx</i> DNA-Polymerase TD 62-52 °C -0,5°C pro Zyklus 40 Zyklen	1146 bp
ipomalba_2 HSS ^{b)}	P30 for P31 rev	Sprossachse ^{a)}	AccuTaq DNA-Polymerase Annealing-Temp. 58°C 40 Zyklen	1128 bp

^{a)} Isolierung der Gesamt-RNA mit Hilfe des TRIzol reagent; cDNA-Synthese mit der Superscript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen)

^{b)} die Klassifizierung erfolgte nachträglich aufgrund der biochemischen Charakterisierung der Gesamtsequenz (s. Kap. 3.10.3)

^{c)} ohne Stoppcodon, da dieses durch den Einsatz der Primer P29 rev und P31 rev nicht amplifiziert wurde

Die PCR-Produkte wurden zur Überprüfung der Sequenzen in den pGEM-T® Easy Vektor kloniert. In Sequenzvergleichen zeigten beide cDNAs, ipomalba_1 und ipomalba_2, eine 100 %ige Identität zu den Exonsequenzen der entsprechenden Gene, *ialb-1* und *ialb-2*.

Somit scheinen beide Gene aktiv zu sein. Sie kodieren Proteine mit einer molaren Masse von 42,3 und 41,5kDa.

3.10.2. Heterologe Expression

Für die biochemische Charakterisierung wurden wie bereits unter Kap. 3.3 und 3.4 beschrieben, die beiden cDNA-Sequenzen aus *I. alba* heterolog exprimiert. Für die Umklonierung der cDNA-Sequenzen aus den pGEM-T[®] Easy-Plasmiden (s. Kap. 3.10.1) in den Expressionsvektor pET22b/23a erfolgte eine Reamplifizierung der Sequenzen mit der *Pfx* DNA-Polymerase bei einer konstanten Annealingtemperatur von 60°C. Dabei wurden die pGEM-T[®] Easy-Konstrukte als Vorlage (1,0 µl) in einer 1:10 bis 1:100 Verdünnung eingesetzt, entsprechend einer Menge von 5 – 50 ng pro PCR-Reaktion, und die Primer P7/P29 und P30/P31 verwendet. Für die Klonierung in den Expressionsvektor wurden wieder die Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *XhoI* benützt, wodurch ein 6xHis-Tag an den C-Terminus der Sequenzen geknüpft wurde, analog zu Kap. 3.3.

Zwei ausgewählte positive Konstrukte wurden zur Überprüfung sequenziert und anschließend im *E. coli* BL21-Zellen unter Standardbedingungen zur Expression gebracht. Die Reinigung der überexprimierten Proteine erfolgte nach dem Standardprotokoll über Ni-NTA-Affinitätschromatographie (s. Kap. 3.4). Die Expression der „ipomalba_1“-Sequenz war sehr schwach und im SDS-Gel zur Überwachung der Expression kaum erkennbar. Dennoch reichte die Menge an heterolog exprimierten Protein für die Reinigung und die anschließende biochemische Charakterisierung.

3.10.3. Biochemische Charakterisierung

Die gereinigten rekombinanten Proteine aus *I. alba* wurden, wie bereits unter Kap. 3.5 beschrieben, biochemisch charakterisiert. Interessanterweise zeigten beide Proteine sowohl mit Putrescin als auch den eIF5A als Aminobutyl-Akzeptor eine deutliche Aktivität. Anhand der biochemischen Eigenschaften konnten damit die Enzyme, und dabei insbesondere das durch die Sequenz ipomalba_2 kodierte Enzym, nicht eindeutig als typische DHS oder HSS klassifiziert werden (s. Kap. 3.5). Laut den phylogenetischen Analysen (s. Kap. 3.11) stellt jedoch die Sequenz ipomalba_1 die eigentliche DHS-kodierende cDNA dar. Das kodierte Protein besitzt auch eine zu anderen DHS-Proteinen vergleichbare spezifische

Aktivität mit dem eIF5A und Putrescin. Ipomalba_2 gruppiert mit den HSS-kodierenden Sequenzen der Convolvulaceae. Das kodierte Protein besitzt im Unterschied zu anderen HSS-Enzymen jedoch auch eine deutliche Aktivität mit dem eIF5A (s. Tab. 3.6 und Tab. 3.8). Hervorzuheben ist dabei, dass *I. alba* nach dem derzeitigen Stand des Wissens keine PAs produziert. Demnach ist auch die Funktion des durch ipomalba_2 kodierten Enzyms vollkommen offen. Anhand der phylogenetischen Stellung wird im Folgenden diese Enzym allerdings als HSS klassifiziert und bezeichnet.

Tab. 3.15 Spezifische Aktivität der gereinigten, rekombinanten Proteine, kodiert durch die identifizierten cDNA-Sequenzen ipomalba_1 und ipomalba_2 aus *I. alba*.

Sequenz	HSS-Assay	DHS-Assay	6xHis-tag
	Aminobutyl-Akzeptor Putrescin	Aminobutyl-Akzeptor eIF5A	
ipomalba_1 DHS ^{e)}	333 pkat/mg	161 pkat/mg	C-terminal
ipomalba_2 HSS ^{e)}	834 pkat/mg	38,5 pkat/mg	C-terminal

3.11. Genduplikation und evolutives Schicksal der Tochtergene in den Convolvulaceae

Die phylogenetischen Untersuchungen zur Evolution der *hss*-Gene innerhalb der Angiospermen belegten einen unabhängigen Ursprung innerhalb der Convolvulaceae (s. Kap. 3.8). Wie kann man sich nun in dieser Familie, die sich durch ein sehr sporadisches Vorkommen von PAs in wenigen, isolierten Arten auszeichnet, das Schicksal des duplizierten Genes vorstellen? Zum einen erfolgte eine Rekrutierung der Kopie für eine neue Funktion als Enzym des sekundären Stoffwechsels – sichtbar durch die Akkumulation der PAs. Was aber erfolgte mit dieser Kopie in den Linien, die heute keine PAs akkumulieren? Um diese Frage zu untersuchen, mussten vorerst weitere homologe Sequenzen identifiziert werden. Durch den unter Kap. 3.9 beschriebenen Ansatz konnten insgesamt acht weitere Sequenzen aus den PA-freien Arten *Ipomoea alba* L., *Ipomoea purpurea* L., *Convolvulus arvensis* L. und *C. tricolor* L. amplifiziert werden. Auf der Basis dieser Sequenzdaten wurden erneut phylogenetische Analysen durchgeführt. Neben den Convolvulaceae-Sequenzen wurden dabei DHS-Sequenzen von *N. tabacum* und *L. esculentum* aus der nah verwandten Familie der Solanaceae als Außengruppe in die Berechnungen miteinbezogen. Die Primerbindungsstellen der degenerierten Primer wurden aus den Sequenzdaten entfernt. Ebenso wurden die Primerbindungsstellen entfernt, wenn nicht genspezifische Primer für die Amplifikation ver-

wendet wurden (s. Kap. 3.6 und 3.9). Aus den genomischen Sequenzen wurden die Introns entfernt, sodass nur die Exonsequenzen in die Analysen mit einfließen. Diese modifizierten Sequenzen sind mit dem Zusatz „ORF“ gekennzeichnet, wie z.B. *carv-1* ORF. Bei den Pseudogenen *carv-2* ORF und *carv-3* ORF musste das den phylogenetischen Untersuchungen zugrunde liegende Alignment hinsichtlich der fehlenden Exonsequenzen zum Teil manuell verbessert werden. Die Tab. 3.16 fasst die verwendeten Daten zusammen.

Tab. 3.16 HSS- und DHS-kodierende cDNA Sequenzen sowie homologe Sequenzen aus den Convolvulaceae, die für phylogenetische Analysen herangezogen wurden.

Sequenz	Art	Länge der Sequenz
Convolvulaceae		
DHS	<i>Ipomoea neei</i>	1103 bp ^{a)}
DHS	<i>Ipomoea hederifolia</i>	1149 bp
DHS	<i>Ipomoea meyeri</i>	1103 bp ^{a)}
DHS	<i>Merremia quinquefolia</i>	1143 bp
DHS	<i>Ipomoea alba</i>	1103 bp ^{a)}
DHS	<i>carv-1</i> ORF	855 bp
DHS	<i>ctri-1</i> ORF	855 bp
DHS	<i>ipurp-1</i> ORF	591 bp
DHS	<i>ipurp-2</i> ORF	1101 bp
HSS	<i>Ipomoea neei</i>	1131 bp
HSS	<i>Ipomoea hederifolia</i>	1070 bp ^{b)}
HSS	<i>Ipomoea meyeri</i>	1070 bp ^{b)}
HSS	<i>Merremia quinquefolia</i>	1128 bp
HSS	<i>Ipomoea alba</i>	1070 bp ^{b)}
	<i>carv-2</i> ORF	648 bp
	<i>carv-3</i> ORF	1053 bp
Solanaceae		
DHS	<i>Nicotiana tabacum</i>	1140 bp ^{c)}
DHS	<i>Solanum lycopersicum</i>	1148 bp ^{d)}

^{a)} ORF insgesamt 1149 bp, Sequenz der Primerbindungsstelle entfernt

^{b)} ORF insgesamt 1131 bp, Sequenz der Primerbindungsstelle entfernt

^{c)} GenBank Akzessionsnummer AJ242017.1

^{d)} GenBank Akzessionsnummer AF296077.1

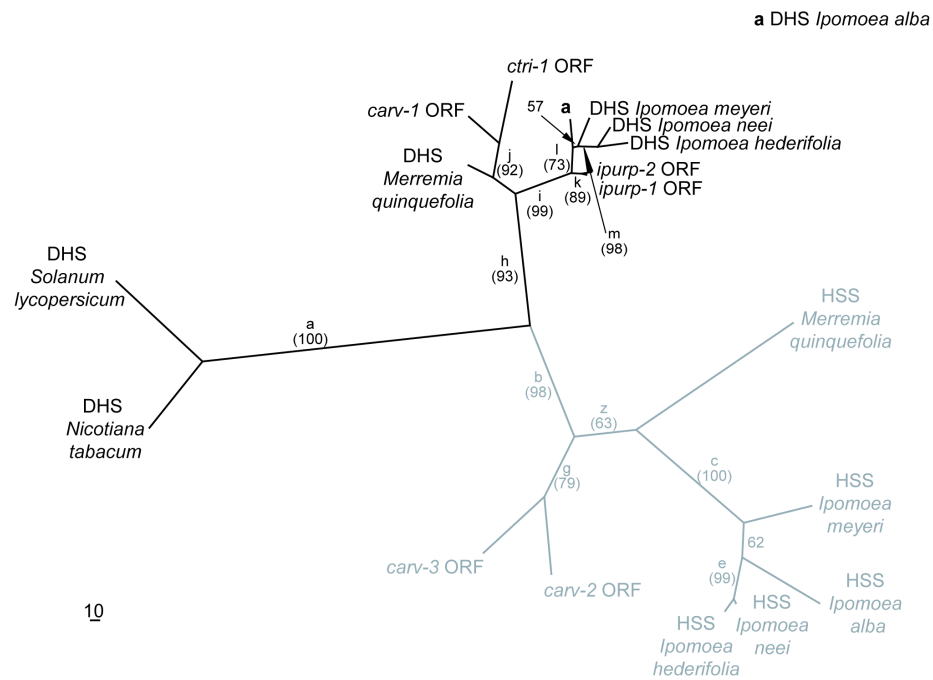
Aus der obigen Tabelle wird die unterschiedliche Länge der bekannten Sequenzabschnitte ersichtlich. Durch den im Kap. 3.9 vorgestellten Versuchsansatz mit degenerierten Primern konnte von den Sequenzen *carv-1* ORF, *ctri-1* ORF, *ipurp-1* ORF und *carv-2* ORF nur ein interner Bereich aufgeklärt werden, der in der Länge variiert. Dabei stellt *ipurp-1* ORF die kürzeste Sequenz mit 591 bp dar. Diese Teilsequenzen sind in Tab. 3.16 grau schattiert. Nur in diesem Sequenzbereich von 591 bp waren somit Daten von allen Sequenzen vorhanden. In die phylogenetischen Analysen floss jedoch jeweils die Gesamtlänge der Sequenz ein. Die fehlenden 5'- und 3'-Bereiche der Teilsequenzen wurden von PAUP als „missing data“, also nicht vorhandene Daten, gewertet. Hervorzuheben ist, dass die identifi-

zierten genomischen Sequenzen, beschrieben im Kap. 3.9, nicht biochemisch charakterisiert wurden.

Für die phylogenetischen Analysen wurden wiederum MP- und ML-Stammbäume berechnet, die in den Abbildungen bb. 3.16 und Abb. 3.17 dargestellt sind. Laut MP-Analyse wurden zwei alternative Topologien vorgeschlagen. Beide Bäume erforderten 841 Schritte und unterscheiden sich nur hinsichtlich der Gruppierung der DHS-kodierenden Sequenz aus *M. quinquefolia* und den Sequenzen *carv-1* ORF und *ctri-1* ORF (s. bb. 3.16, **A** und **B**). Für beide Bäume wurde ein „Consistency index“ (CI) von 0.7432 und „Retention index“ (RI) von 0.7548 berechnet (Vergleich Kap. 3.8).

Für die ML-Analysen wurden die Parameter für die heuristische Suche inklusive dem Substitutionsmodell wieder mit der Modeltest-Software ermittelt (s. Kap. 3.8). Als Ergebnis des hLRTs wurde das TrN+G Modell mit relativen Substitutionsraten für (A-G) = 3.2026 und (C-T) = 4.5466 vorgeschlagen, hingegen vom AICc das GTR+G mit (A-C) = 2.4036, (A-G) = 5.1286, (A-T) = 1.2702, (C-G) = 2.0364, (C-T) = 7.4605. Berechnungen basierend auf diesen Modelle ergaben jeweils zwei optimale Bäume mit alternativen Topologien bezüglich der DHS-kodierenden Sequenz aus *M. quinquefolia*, dargestellt in Abb. 3.17. Vorgeschlagen wurde von beiden Modellen entweder eine Polytomie bei der Verzweigung zu den Ästen *i*, *j* und der DHS-Sequenz aus *M. quinquefolia* (Abb. 3.17 A) oder ein gemeinsamer Ursprung von *carv-1* ORF, *carv-2* ORF und der DHS-Sequenz aus *M. quinquefolia* (Abb. 3.17 C). Die Hauptaussage der phylogenetischen Analysen, nämlich die eindeutige Aufteilung der DHS- und HSS-kodierenden Sequenzen sowie deren Homologe in eindeutig zwei Gruppen und damit der Beleg für ein ursprüngliches Duplikationsereignis, wird durch diese beiden alternativen Topologien nicht beeinträchtigt.

A Maximum Parsimonie Baum



B Alternative Topologie der DHS-Sequenzen

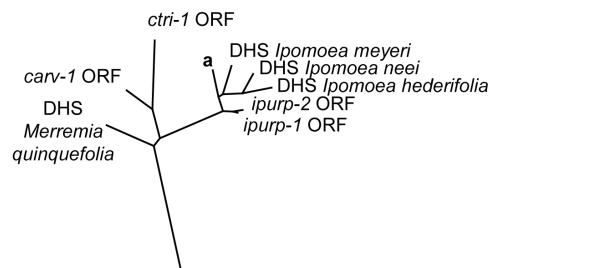
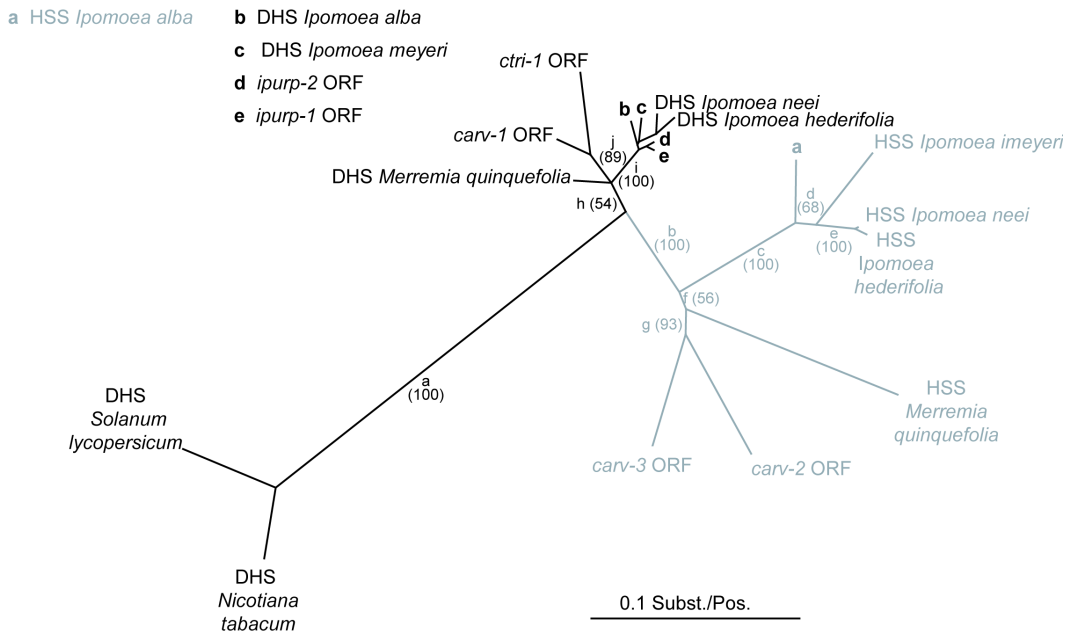
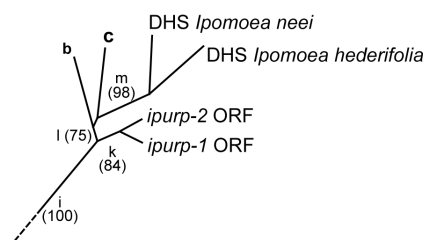


Abb. 3.16 Ungewurzelter Maximum Parsimony-Baum, basierend auf 16 HSS- und DHS-kodierenden cDNA-Sequenzen aus der Familie der Convolvulaceae sowie den DHS-Sequenzen aus *N. tabacum* und *L. esculentum* als Außengruppe. Die Bootstrap-Werte aus 10.000 Bootstrap-Wiederholungen sind in Klammern unterhalb der Bezeichnung der Zweige *a – m* und *y - z* angegeben. HSS-kodierende cDNA-Sequenzen sind in grau dargestellt, DHS-kodierende in schwarz. Die Zweiglängen entsprechen der Anzahl der Merkmalsänderungen. **A** und **B** zeigen unterschiedliche Topologien hinsichtlich der Sequenzen DHS aus *M. quinquefolia*, *carv-1* ORF und *tri-1* ORF

A Maximum Likelihood Tree



B Vergrößerung aus A



C Alternative Topologie innerhalb der DHS Sequenzen

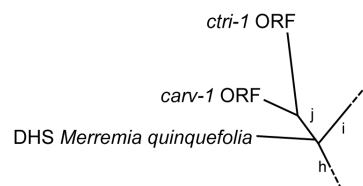


Abb. 3.17 Ungewurzelter Maximum Likelihood-Baum, basierend auf 16 HSS- und DHS- kodierenden cDNA-Sequenzen aus der Familie der Convolvulaceae sowie den DHS-Sequenzen aus *N. tabacum* und *L. esculentum* als Außengruppe. Verwendet wurde das aus dem hLRT des Modelltest empfohlene Modell, wobei zwei Topologien vorgeschlagen wurden (A und C). Auch nach dem AICc vorgeschlagenen Modell wurden zwei optimale Bäume berechnet, die im Verzweigungsmuster den hier gezeigten Bäumen entsprechen. Bootstrap-Werte aus 100 Bootstrap-Wiederholungen sind in Klammern unterhalb der Bezeichnung der Zweige a - m angegeben. HSS-kodierende cDNA-Sequenzen sind in grau dargestellt, DHS-kodierende in schwarz. Die Zweiglängen entsprechen der Anzahl der Substitutionen pro Sequenzposition.

Die Unterstützung der Knoten der ML-Bäume, berechnet nach dem hLRT-Modell, wurde vergleichend mit Hilfe der Quartett-Methode sowie der Bootstrap-Methode (100 Wiederholungen) berechnet. In Abb. 3.18 sind Phylogramme der Stammbäume mit der statistischen Unterstützung der Verzweigungen dargestellt. In beiden Ansätzen wurden Knoten mit Werten <50 kollabiert. Deutlich wird bei beiden Verfahren die unklare Stellung der DHS-kodierenden Sequenzen aus *M. quinquefolia*. Die Verzweigung ist unaufgelöst und es findet sich an dieser Stelle eine Polytomie. Insgesamt sind die Ergebnisse zur statistischen Unterstützung zwar kongruent, doch durch die Quartett-Methode wurden niedrigere Werte berechnet und die Auflösung der Stammbäume ist geringer. Zusammenfassend sind in Tab. 3.17 nochmals die Werte zur statistischen Unterstützung der Knoten sowohl aus der MP-Analyse als auch der ML-Analyse vergleichend aufgelistet.

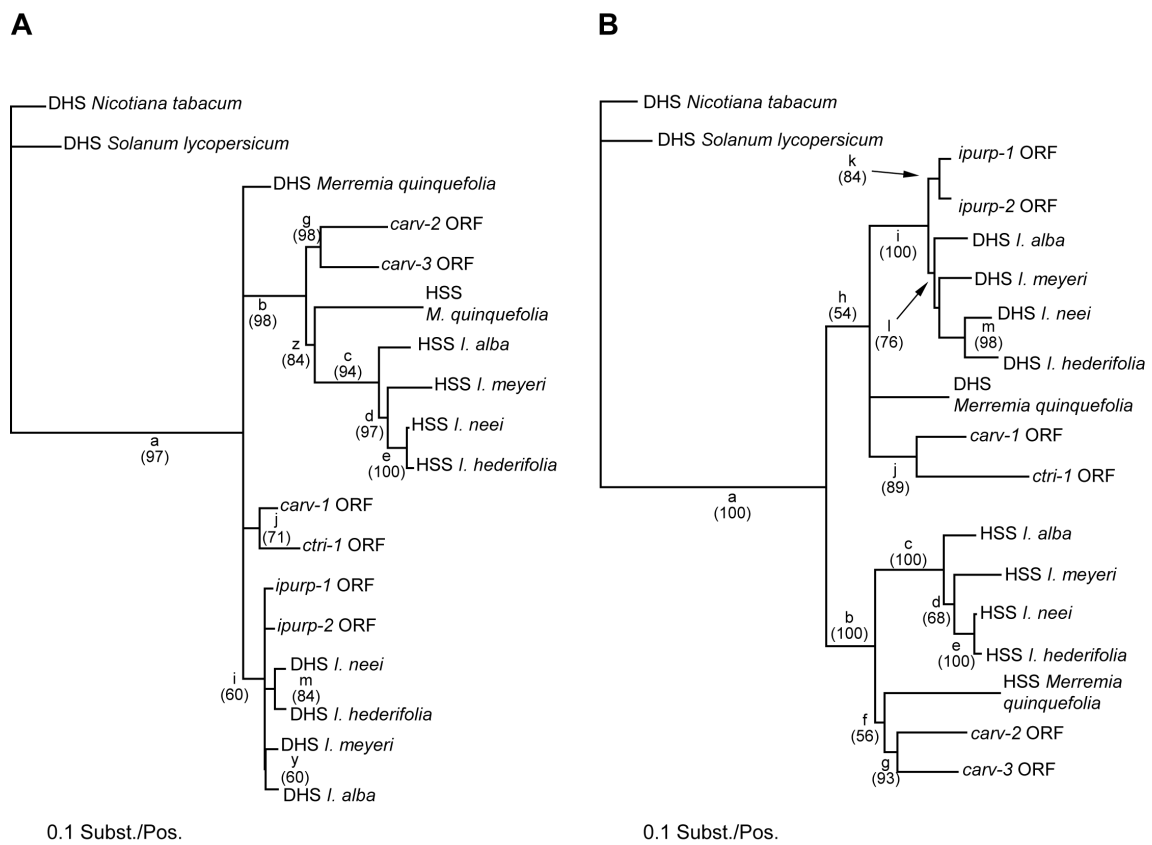


Abb. 3.18 ML-Phylogramme der 16 HSS- und DHS-kodierenden cDNA-Sequenzen aus der Familie der Convolvulaceae sowie den DHS-Sequenzen aus *N. tabacum* und *L. esculentum* als Außengruppe. Verwendet wurde das aus dem hLRTs empfohlene Modell. **A**. Phylogramm mit Angaben zur statischen Unterstützung der Knoten nach der Quartett-Methode, erstellt mit Hilfe von Tree-Puzzle. **B** Ein Bootstrap-Phylogramm basierend auf 100 Bootstrap-Wiederholungen, erstellt mit Hilfe von PAUP. Die Bootstrap-Werte entsprechen denen in Abb. 3.17 A.

Tab. 3.17 Statistische Unterstützung der Zweige a – m zu den Abbildungen Abb. 3.16, Abb. 3.17 und Abb. 3.18.

Zweig	Bootstrap-Werte für die Knoten ^{a)} der ML-Bäume nach dem hLRT- Modell	Statistische Unterstützung nach der Quar- tett-Methode für die Knoten der ML-Bäume nach dem hLRT- Modell		Bootstrap-Werte für die Knoten ^{b)} der MP-Bäume
			nach dem AICc Mo- dell	
a	100	97	97	100
b	100	98	98	98
c	100	93	94	100
d	68	96	97	-
e	100	100	100	99
f	56	-	-	-
g	93	77	98	78
h	54	-	-	93
i	100	58	60	99
j	89	71	71	92
k	84	-	-	89
l	75	-	-	73
m	98	85	84	98
y		60	60	-
z		83	84	63

^{a)} berechnet aus 100 Bootstrap-Wiederholungen

^{b)} berechnet aus 10.000 Bootstrap-Wiederholungen

Zusammenfassend zeigen beide angewandte Methoden zur Rekonstruktion der Phylogenie, die MP- sowie die ML-Analyse, eine eindeutige Zweiteilung der Convolvulaceae-Sequenzen und belegen damit das frühe Duplikationsereignis des *dhs*-Gens in dieser Familie. Interessanterweise konnten Hinweise auf eine weitere, nachfolgende Duplikationen gefunden werden. So entstanden auch die Pseudogene *carv-2* ORF und *carv-3* ORF durch Genduplikation. Beide finden sich mit eindeutiger statistischer Unterstützung in der Gruppe der HSS-Sequenzen (Zweige *b* und *g*, s. Tab. 3.17). Unklar ist, ob diese Duplikation vor oder nach der Pseudogenisierung stattfand. Das bei beiden Pseudogenen unterschiedliche Ursachen zur Pseudogenisierung führten, spricht für eine Duplikation vor der Pseudogenisierung (s. Kap. 3.9, Abb. 3.15). Die im ML-Baum zuvor abzweigende HSS-kodierende Sequenz aus *M. quinquefolia* (s. Abb. 3.17) allerdings kodiert ein funktionelles Enzym. Demzufolge könnte auch *C. arvensis* eine funktionelle HSS besessen haben.

Die vermutlichen Allele *ipurp-1* und *ipurp-2* aus *I. purpurea* (s. Kap. 3.9) finden sich nur mit einer relativ niedrigen statistischen Unterstützung aus den Bootstrap-Berechnungen von 84 % und 89 % als Gruppe in den Stammbäumen wieder (Zweig *k*, Tab. 3.17), wobei die statistische Unterstützung nach der Quartett-Methode sogar unter 50% fällt und somit im Phylogramm als Polytomie dargestellt wird (s. Abb. 3.18). Dadurch wird fraglich, ob es sich

bei diesen beiden Sequenzen tatsächlich um Allele handelt oder ob sie doch zwei unterschiedliche Gene darstellen.

Hervorzuheben ist die phylogenetische Stellung der HSS-kodierenden Sequenz aus *I. alba*. Sie fällt eindeutig in die Gruppe der HSS-kodierenden Sequenzen. Aufgrund der biochemische Charakterisierung jedoch kodiert diese Sequenz ein Enzym, das sowohl Putrescin als auch das eIF5A-Vorstufenprotein als Substrat umsetzen kann und zeigt somit nicht die bisher beschriebenen Eigenschaften der funktionellen HSS-Enzyme. Dabei darf nicht außer acht gelassen werden, dass *I. alba* keine PAs akkumuliert und die biologische Funktion dieses Enzymes unbekannt ist. Letztlich ging diese Sequenz jedoch auch eindeutig aus dem ursprünglichen Duplikationsereignis in der Familie der Convolvulaceae hervor.

Abschließend betrachtet fällt auf, dass die Gruppierung der DHS- und HSS-kodierenden Sequenzen eine deutliche Übereinstimmung zu der systematischen Gruppierung der hier untersuchten Convolvulaceae-Arten zeigt. *I. neei* und *I. hederifolia* aus Sektio Mina stellen nach den derzeitigen systematischen Befunden sehr nah verwandte Arten dar (Miller et al. 2004; Eich 2007). Auch die DHS- und HSS-kodierenden Sequenzen aus diesen beiden Arten bilden jeweils eine Gruppe (Zweige *m* und *e*, Tab. 3.17). Die DHS-Sequenzen aus *I. meyeri* und *I. purpurea*, die nach der auf morphologischen Merkmalen basierenden Einteilung von Austin (Austin 1979, 1980; Austin und Huaman 1996; Austin 1997; Austin und Bianchini 1998) zur Sektio Pharbitis zählen, zweigen im Stammbaum früher ab, bilden aber keine Gruppe. Hier ist zu erwähnen, dass die Sektio Pharbitis nach phylogenetischen Untersuchungen basierend auf der Variation von Restriktionsschnittstellen in der Chloroplasten-DNA (McDonald und Mabry 1992) eine polyphyletische Gruppe darstellt. Diese Annahme wurde durch weitere Arbeiten basierend auf ITS-Sequenzen (Miller et al. 2004) bestätigt. Insbesondere die Serie Tyrianthinae, zu der *I. meyeri* nach Austin zählt, und die Serie Pharbitis, zu der *I. purpurea* zählt, stellt nach den erwähnten Arbeiten keine monophyletischen Gruppe dar. Diese Stellung findet sich auch im Verzweigungsmuster des auf den DHS- und HSS-Sequenzen beruhenden Stammbaumes wieder. Insgesamt bilden die DHS- und HSS kodierenden Sequenzen aus der Gattung *Ipomoea* jeweils eine gut unterstützte Gruppe im MP- sowie ML-Stammbaum (s. Tab. 3.17, Zweig *c* und *i*). Ebenso bilden die beiden DHS-kodierenden Sequenzen aus den *Convolvulus*-Arten eine Gruppe mit einer guten statistischen Unterstützung (s. Tab. 3.17, Zweig *j*). Somit sind die Sequenzen innerhalb einer Gat-

tung in den rekonstruierten Gen-Stammbäumen, basierend auf den HSS- und DHS-kodierenden Sequenzen, als Gruppe wieder zu finden.

3.12. Positive Selektion

Der Mechanismus zur Aktivierung des eIF5A, in dem die DHS den ersten Schritt katalysiert, ist sehr hoch konserviert. Der eIF5A selbst kommt ubiquitär in Eukaryoten (Gordon et al. 1987) und Archeabakterien vor (Bartig et al. 1990). Auch die Sequenzen der DHS aus so verschiedenen Organismen wie dem Menschen und z.B. *S. vernalis* zeigen eine 65%ige Identität auf Nukleinsäureebene. Der eIF5A und seine korrekte Aktivierung sind essentiell für die Zellteilung der Eukaryoten und die Entwicklung (Park et al. 1997). Mutationen des eIF5A oder der DHS besitzen starke negative Effekte auf den Organismus. So führten Versuche mit Hefe-Mutanten zu letale Phenotypen (Schnier et al. 1991; Sasaki et al. 1996; Park et al. 1998). Dadurch liegt die Vermutung nahe, dass auch eine Duplikation des *dhs*-Gens nachteilige Auswirkungen mit sich bringt. Eine zusätzliche, aktive Kopie der DHS mit den gleichen Aktivitäten könnte die Regulation der Aktivierung des eIF5A empfindlich stören. Interessanterweise wurde mit Ausnahme von *Crotalaria* sp., in der zwei homologe Enzyme mit deutlicher Aktivität mit dem eIF5A zeigen gefunden wurden (Nurhayati und Ober 2005), und *I. alba*, in der ebenfalls beide identifizierte homologe Enzyme eine Aktivität mit dem eIF5A besitzen (s. Kap. 3.10.3), in den bisher untersuchten Arten nur jeweils ein funktionelles DHS-Enzym nachgewiesen. Die weiteren bekannten HSS-Enzyme haben eindeutig die Fähigkeit, den eIF5A zu binden, verloren. Dies nährt die Annahme, dass gewissermaßen ein metabolisches Erfordernis besteht bzw. bestand, um die Kopie des *dhs*-Gens so zu verändern, sodass das Genprodukt nicht mehr das eIF5A-Vorstufenprotein binden kann und somit die eigentliche DHS-Aktivität unterbunden wird. In dem Zusammenhang ist die Tatsache, dass in den bereits vollständig sequenzierten Pflanzengenomen die DHS immer von einem einzelnen Gen kodiert wird, interessant. Bezüglich der wirkenden Evolutionsmechanismen nach der Duplikation stellte sich nun die Frage, ob möglicherweise positive Selektion mit dazu beitrug, dass die eigentliche DHS-Aktivität der Tochter-Gene verloren ging. Bezüglich der Evolution eines duplizierten Genes wird generell angenommen, dass eine Kopie unter einem niedrigeren Selektionsdruck steht. Im englischen spricht man von „relaxed evolutionary constraints“. Mutationen können in dem Fall häufiger stattfinden. Im Falle der positiven Selektion würden aber bestimmte Mutationen favorisiert oder insgesamt

erhöhte Mutationsraten bevorzugt. In phylogenetischen Analysen wäre dies durch erhöhte Raten von nicht-synonymen zu stillen oder synonymen Substitutionen erkennbar (Yang et al. 2000; Yang und Nielsen 2002; Zhang et al. 2005). Dieses Verhältnis, die d_N/d_S Ratio, auch als ω bezeichnet, wurde für die Convolvulaceae-Sequenzen berechnet. Dabei sprechen Werte von $\omega = 1$ für neutrale Selektion, $\omega < 1$ für stabilisierende Selektion und $\omega > 1$ für positive Selektion. Für die Berechnungen wurden die Sequenzen verwendet, die in Tab. 3.16 aufgelistet sind, jedoch wurden die Pseudogene *carv-2* und *carv-3* sowie die HSS-kodierende Sequenz aus *I. alba* ausgeschlossen. Die Solanaceae-Sequenzen der DHS aus *N. tabacum* und *L. esculentum* wurden miteinbezogen. Berechnet wurde die positive Selektion mit Hilfe der PAML Software von Yang (2007). Das für die Berechnung benötigte Alignment der Nukleinsäure-Sequenzen wurde mit dem ClustalW-Algorithmus erstellt. Gaps bzw. Lücken, vor allem auch die der Teilsequenzen im 5'- und 3'-Bereich, wurden von der PAML Software aus dem Alignment entfernt. Dadurch wurde das 1158 bp umfassende Alignment auf 588 bp gekürzt. Auf diesen Bereich des Alignments, welches durch PAML entsprechend der Codons in ein Aminosäure-Alignment umgewandelt wurde, bezieht sich die Nummerierung der Aminosäurepositionen, die in Tab. 3.18 verwendet wird. Der ebenfalls benötigte Stammbaum wurde mit der ML-Methode in PAUP berechnet. Verwendet wurde das nach dem hLRT vorgeschlagene TrN+G Substitutionsmodell mit Substitutionsraten von (A-G) = 3,1867 und (C-T) = 4,7923. Dargestellt ist dieser Stammbaum in Abb. 3.19. Die Berechnung der positiven Selektion erfolgte nach dem branch-site Modell A, das die ω -Werte für jede Nukleinsäure-Position berechnet. Zusätzlich erfordert dieses Modell die Einteilung der Äste im Stammbaum *a priori* in sogenannte „foreground“ und „background“ branches, wobei per Definition nur in den foreground branches positive Selektion ($\omega > 1$) möglich ist. Am Stammbaum in Abb. 3.19 sind die Äste gekennzeichnet, die in unterschiedlichen Berechnungen als foreground branches definiert wurden. Die Tab. 3.18 fasst die verwendeten Datensätze und die berechneten Parameter zusammen. Neben den Parametern des Evolutionsmodell wurde jeweils der „log-likelihood“-Wert (lnL-Wert) als Maß der Wahrscheinlichkeit für das Zutreffen des Modells berechnet. Mit anderen Worten wurde die Wahrscheinlichkeit berechnet, bei den kalkulierten ω -Werten eine durch das Modell vorausgesagte Base an der Position x vorzufinden.

Tab. 3.18 Parameter und Ergebnisse der Berechnungen zur positiven Selektion. Die Aminosäurepositionen beziehen sich auf das 588 bp lange Alignment, welches der Berechnung zu Grunde liegt.

Datensatz	lnL (log-likelihood)	berechnete Parameter	Positionen unter positiver Selektion (BEB) ^{b)}
branch-site Modell A			
clade A ^{a)}	-2233,096	$p_0 = 0,869; \omega_0 = 0,063;$ $p_1 = 0,043; \omega_2 = \mathbf{1,379}$	47P (mit $P > 0,95$) 8T 16H 63L 74D 77I 134L 147D 148P 176G
Ast a ^{a)}	-2238,559	$p_0 = 0,807; \omega_0 = 0,068;$ $p_1 = 0,072; \omega_2 = \mathbf{1,000}$	13V 49A 154N 165I 169N
Ast b ^{a)}	-2237,468	$p_0 = 0,907; \omega_0 = 0,074;$ $p_1 = 0,073; \omega_2 = \mathbf{16,491}$	8T 47P 63L 181G 195C
clade B ^{a)}	-2239,353	$p_0 = 0,915; \omega_0 = 0,085;$ $p_1 = 0,073; \omega_2 = \mathbf{1,000}$	
branch-site Modell A, mit $\omega_2 = 1$			
clade A ^{a)}	-2233,344	$p_0 = 0,845; \omega_0 = 0,0599;$ $p_1 = 0,043$	nicht erlaubt
Ast a ^{a)}	-2238,559	$p_0 = 0,807; \omega_0 = 0,068;$ $p_1 = 0,072$	nicht erlaubt
Ast b ^{a)}	-2238,343	$p_0 = 0,853; \omega_0 = 0,068;$ $p_1 = 0,074$	nicht erlaubt
clade B ^{a)}	-2239,353	$p_0 = 0,915; \omega_0 = 0,073;$ $p_1 = 0,085$	nicht erlaubt
site Modell MIA			
-	-2239,353	$p_0 = 0,915; \omega_0 = 0,073$	nicht erlaubt

^{a)} a priori definierter foreground branch, s. dazu Abb. 3.19

^{b)} „Bayes empirical Bayes“-Analysen (BEB) nach Zhang et al. (2005), Aminosäurepositionen mit über 50% statistischer Unterstützung ($P > 0,50$) für positive Selektion sind aufgelistet.

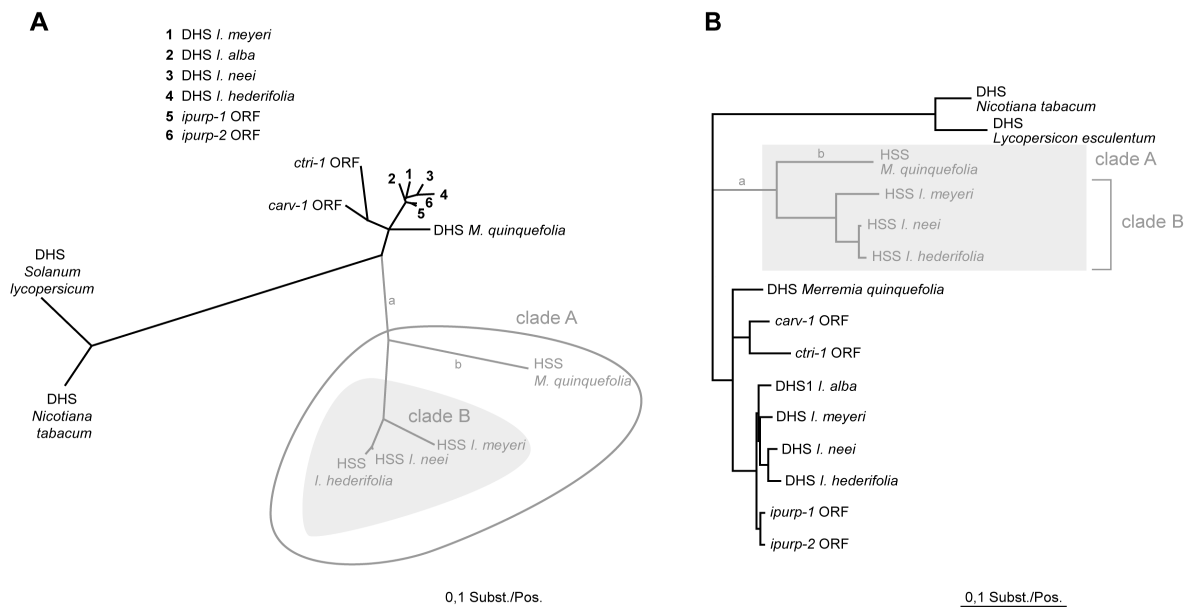


Abb. 3.19 ML-Stammbaum der HSS- und DHS-Sequenzen aus Convolvulaceae, der den Berechnungen zur positiven Selektion als Grundlage diente. **A.** Darstellung als ungewurzelter Baum. **B.** Darstellung als Phylogramm. HSS-kodierende Sequenzen sind in grau dargestellt, DHS-kodierende in schwarz. Die Zweige mit der Bezeichnung a und b wurden als foreground branches definiert, ebenso die Gruppen A und B (s. Tab. 3.18).

In einem ersten Ansatz wurden alle HSS-kodierenden Sequenzen als foreground branches definiert (clade A). Anschließend wurde der Datensatz der foreground branches auf verschiedene Abschnitte im clade A reduziert. Interessanterweise wurde der höchste ω -Wert für den Ast *b* bzw. für die HSS-Sequenz aus *M. quinquifolia* mit 16,491 berechnet. Die log-likelihood-Werte liegen bei allen Modelle in einer vergleichbaren Größenordnung. Insgesamt schlug das branch-site Modell A einige Nukleinsäure-Positionen unter positiver Selektion in den foreground branches vor. Wie gut dieses Modell auf die Daten erklärt bzw. die Signifikanz des Modells wurde durch Vergleiche mit anderen Modellen, den sogenannten Nullmodellen, in „log-likelihood ratio Tests“ (LRT) überprüft. Nach Yang et al. (2000) kann, wenn zwei zu vergleichende Modelle in einander verschachtelt sind bzw. aufeinander aufbauend, der verdoppelte Unterschied derer „log-likelihood“-Werte ($2 \Delta \ln L$) mit einer Chi-Quadrat-Verteilung verglichen werden. Dabei entsprechen die Freiheitsgrade der Chi-Quadrat-Verteilung der Anzahl der unterschiedlichen Parametern in den beiden zu vergleichenden Modellen. Der kritische Wert (P-Wert) der Chi-Quadrat-Verteilung gibt Aufschluss über die Signifikanz des Vergleiches. Bei hohen P-Werten entspricht das zu testende Modell den Datensatz im Vergleich zum Nullmodell nicht besser und ist abzulehnen.

Für diese LRT-Tests kam in erster Linie das branch-site Modell A mit fixierten ω -Wert ($\omega = 1$) in den foreground branches als Nullmodell (Test 1). Unter diesem Modell wird keine positive Selektion erlaubt, jedoch können Nukleinsäuren, die in den background branches unter stabilisierender Selektion stehen, in den foreground branches neutral evolvieren und somit einen verminderten Selektionsdruck tragen. Durch diesen Test kann direkt positive Selektion durch Signifikanz im LRT nachgewiesen werden (Zhang et al. 2005). Verwendet man als Nullmodell jedoch ein Modell, das über den ganzen Stammbaum ohne Veränderung in den background und foreground branches nur neutrale und stabilisierende Selektion erlaubt ($0 < \omega_0 < 1$ und $\omega_0 = 1$), wie das site Modell M1a von Yang (2002), kann sowohl ein vermindertes Selektionsdruck also auch positive Selektion zu einer Signifikanz im LRT führen (Test 2) (Zhang et al. 2005). Insgesamt ergab der LRT-Test 1 keine statistisch signifikante Unterstützung für positive Selektion (s. Tab. 3.19). Der LRT-Test 2 spricht jedoch für einen reduzierten Selektionsdruck, vor allem wenn der gesamte clade der HSS-Sequenzen (clade A) in die Berechnung einfließt. Der LRT-Test 2 ergab einen Wert von 12,515. Bei einer Chi-Quadrat-Verteilung mit zwei Freiheitsgraden ergibt das einen P-Wert von 0,002, der damit weit unter dem gängigen Signifikanzniveau von 5 % liegt.

Tab. 3.19 LRT-Statistik ($2 \Delta \ln L$) und kritische Werte (P-Werte) für die Berechnung der positiven Selektion.

Datensatz	LRT-Test 1 ^{a)}	LRT-Test 2 ^{b)}
clade A	0,496 (P = 0,481))	12,515 (P = 0,002)
Ast a	0	1,588 (P = 0,452)
Ast b	1,75 (P = 0,186)	3,77 (P = 0,152)
clade B	0	0

^{a)} df = 1^{b)} df = 2

4. Diskussion

Einen zentralen Aspekt dieser Arbeit stellte die Untersuchung der molekularen Mechanismen der Evolution von Biosynthesewegen des pflanzlichen Stoffwechsels dar. Dabei wurde die Evolution der Pyrrolizidin-Alkaloide (PAs) als Modellsystem gewählt. PAs, die als typische Sekundärstoffe der Pflanzen gelten und vermutlich zur Verteidigung gegen Fraßfeinde dienen, sind in verschiedenen Angiospermen-Familien zu finden (s. Kap. 1.1). Generell können die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen zur Evolution dieser Verteidigungsstoffe der Pflanze erst durch die Identifizierung und Charakterisierung an der Biosynthese beteiligter Enzyme untersucht werden. Von der PA-Biosynthese wurde bereits ein Schlüsselenzym, die Homospermidin-Synthase (HSS, s. Kap. 1.2), identifiziert. Am Beispiel dieses Schlüsselenzyms wurden im Rahmen dieser Arbeit die molekularen Mechanismen die zur Entstehung der HSS führten in zwei Familien, den Convolvulaceae und Apocynaceae, näher beleuchtet. In vorhergehenden Arbeiten konnten bereits vier unabhängige Ursprünge der HSS innerhalb der Angiospermen nachgewiesen werden (Anke et al. 2004; Reimann et al. 2004; Nurhayati et al. 2009). Die HSS entstand in den Monokotylen, den Boraginaceae sowie in zwei Triben der Asteraceae durch unabhängige Duplikationsereignisse aus dem zum Primärstoffwechsel zählenden Enzym Desoxyhypusin-Synthase (DHS). Damit scheint das oben erwähnte und in der Einleitung genauer ausgeführte verstreute Vorkommen der PAs innerhalb des Pflanzenreichs Resultat konvergenter Evolution zu sein. Nun zeigen interessanterweise die PAs auch innerhalb der Familie der Convolvulaceae ein sehr verstreutes Verbreitungsmuster in dem sie nur in wenigen und isolierten Arten vorkommen. Wie kann man sich diese Verteilung erklären? War in dieser Familie die Fähigkeit, PAs zu produzieren, auch mehrfach durch unabhängige Genduplikationen in einzelnen Vertretern entstanden? Oder liegt hier ein monophyletischer Ursprung zugrunde und in vielen Arten wurde sekundär die Fähigkeit der PA-Biosynthese verloren? Nach Wink (2003) könnte ein verstreutes Vorkommen von Sekundärstoffen in nah verwandten Arten auch durch eine differentielle Expression der korrespondierenden Gene resultieren. Insbesondere da in den Convolvulaceae unterschiedliche Strukturtypen an PAs vorkommen (s. Kap. 1.4.1), lag die Vermutung jedoch nahe, dass es mehrfache und unabhängige Ursprünge gibt, vergleichbar zu den Asteraceae mit den unabhängigen Ursprüngen in den Triben Eupatorieae und Senecioneae (Anke et al. 2004). Ein auffälliger Unterschied der Convolvulaceae

zu anderen PA-akkumulierenden Familien ist die Tatsache, dass die Mehrzahl der PAs eine ungesättigte Necinbase besitzen (Jenett-Siems et al. 1993; Eich 2007). Nur die Lycopsamin-Typ PAs in *M. quinquefolia* (Mann 1997) weisen die sonst für PAs charakteristische 1,2-ungesättigte Necinbase auf. Bezüglich der Toxizität unterscheiden sich die gesättigten Derivate deutlich von den ungesättigten Derivaten. Für letztere wurde eine hepatotoxische Wirkung bewiesen, die auf einer P-450-Monooxygenasen-katalysierten Transformation der PAs in toxische Pyrrol-Derivate beruht (Hartmann und Witte 1995). Die gesättigten Derivate hingegen, die durch das Fehlen der Doppelbindung in der Necinbase nicht zu aktiven Pyrrolen transformiert werden können (Fu et al. 2002; Fu et al. 2004), besitzen eine fraßhemmende Aktivität (Reina et al. 1997). Der Wirkungsmechanismus dieser Derivate ist jedoch ungeklärt. Für die Verteidigung der Pflanze sind wohl beide Typen der PAs, gesättigte sowie 1,2-ungesättigte, von Vorteil wie bei Frölich zusammengefasst wird (Frölich et al. 2006). Unter anderem wird durch speziell angepasste Motten wie *Estigmene acrea* (Hartmann et al. 2005), deren polyphage Larven sowohl gesättigte als auch 1,2-ungesättigte PAs aus Pflanzen zur eigenen Verteidigung verwenden, die Bedeutung als Verteidigungsstoffe indirekt belegt. Zudem akkumulieren neben den Convolvulaceae auch verschiedene *Phalaenopsis*-Arten aus der Familie der Orchidaceae gesättigte Derivate (Hartmann und Ober 2000; Frölich et al. 2006; Anke et al. 2008; Nurhayati et al. 2009), wobei die höchsten Konzentrationen an PAs in jungen Geweben und in Blütenknospen zu finden sind (Frölich et al. 2006). Dieses Vorkommen in Geweben, die naturgemäß am besten verteidigt werden müssen, spricht ebenfalls für eine ökologische Bedeutung dieser bezüglich ihrer biologischen Aktivität noch nicht genau charakterisierten Alkaloide. Das in den Convolvulaceae nun gesättigte sowie 1,2-ungesättigte Alkaloide vorkommen, machte diese Familie zudem zu einem interessanten Untersuchungsobjekt. Auch hier stellte sich die Frage, ob beide Typen auf einen oder mehrere Ursprünge der PA-Biosynthese zurückgehen. Das zweite Untersuchungsobjekt, die Familie der Apocynaceae, war durch das Vorkommen von Lycopsamin-Typ-PAs spannend. Dieser Struktur-Typ wurde auch in der Familie der Asteraceae, Tribus Eupatorieae und auch in den Convolvulaceae, Gattung *Merremia* nachgewiesen. Vermutlich entstand die Fähigkeit zur Synthese dieser Alkaloidgruppe in diesen phylogenetisch nicht nah verwandten Familien durch konvergente Evolution. Dies konnte im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden (s. Kap. 3.8., Abb. 3.11 und Abb. 3.12). Insgesamt wurden mit den Ergebnissen dieser Arbeit zu den vier bereits bekannten noch zwei zusätzliche, unabhängige Duplikationsereignisse, die zu funktionellen HSS-Enzymen führten, nachgewiesen. Als

Mechanismus der Evolution rückte damit die Genduplikation in der Vordergrund des Interesses.

4.1. Genduplikation als molekularer Mechanismus der Evolution

Durch die Identifikation und biochemische Charakterisierung von HSS- und DHS-kodierenden Sequenzen in den Convolvulaceen-Arten *I. neei*, *I. hederifolia*, und *I. meyeri* und anschließende phylogenetische Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass entgegen der ursprünglich vermuteten mehrfachen Duplikationsereignisse innerhalb dieser Familie tatsächlich nur eine unabhängige Genduplikation des *dhs*-Gens in der frühen Geschichte der Convolvulaceae stattgefunden hat. Dies spiegelt sich in den zwei deutlichen Gruppen bzw. clades der Convolvulaceae-Sequenzen in den Stammbäumen der Angiospermen-Sequenzen (s. Kap. 3.8., Abb. 3.11 und Abb. 3.12) wieder. Die HSS-kodierenden Sequenzen sind eindeutig aus einer Duplikation hervorgegangen. Die statistische Unterstützung für diese Verzweigung ist sowohl in den MP-Analysen sowie den ML-Analysen sehr hoch. Zusätzlich konnte eine weitere unabhängige Duplikation in den Apocynaceae nachgewiesen werden, wie oben bereits angedeutet. Untersuchungen der genomischen Organisation bestätigten die unabhängigen Duplikationen innerhalb beider Familien (s. Kap. 3.7.3). Damit konnte mit dieser Arbeit die Bedeutung der Genduplikation als Mechanismus zur Evolution neuer Funktionen am konkreten Beispiel der HSS belegt werden. Genduplikation gilt heute als einer der häufigsten Mechanismen, der zur Entstehung neuer Enzyme führt (Hughes 1994; Zhang 2003; Bridgham et al. 2008). Genduplikationen treten geschätzt mit einer Rate von 0,01 pro Gen pro 100 Millionen Jahren etwa gleich häufig wie Nukleotid-Substitutionen mit einer Rate von 0,1-0,5 pro Positionen pro 100 Millionen Jahren auf (Lynch und Conery 2000; Zhang 2003). Insgesamt scheint in pflanzlichen Genomen der Prozess der Genduplikation ein elementarer Weg zu sein, um biochemische Flexibilität zu erlangen. So sind z. B. viele Enzyme des Sekundärstoffwechsels von kleinen Genfamilien kodiert, die durch Duplikationen im Laufe der Evolution entstanden (Durbin et al. 2000). Sie entstehen durch sogenannte „repeated cycles of duplication“ (Pichersky und Gang 2000; Zhang 2003; Ober 2005). Ein Beispiel für diese „repeated evolution“ stellt die Chalkonsynthase-Familie dar, die auch in Gattung *Ipomoea* charakterisiert wurde (Durbin et al. 2000). Hier wird ein Unterschied zum Modellsystem HSS/DHS deutlich. Es gibt keine Hinweise, dass *hss*- und *dhs*-Gene in Genfamilien organisiert sind oder dass mehrere Genkopien für DHS oder HSS

in einer Art existieren. Das *dhs*-Gen wurde in den bisher vollständig sequenzierten Pflanzengenomen immer nur als sogenanntes „single copy gene“ nachgewiesen. Die einzige bisher bekannte Ausnahme bildet *Crotalaria juncea*, aus der zwei funktionale DHS-Enzyme charakterisiert wurden (Nurhayati und Ober 2005).

Generell betrachtet, liefern Genduplikationen gewissermaßen zusätzliches genetisches Material. Bezüglich des Schicksals der duplizierten Gene geht man von mehreren Szenarien aus. Nach der Genduplikation können etwa homogenisierende Effekte wie „gene conversion“, die auch als „concerted evolution“ bezeichnet wird, wirken, die durch eine Abgleichung zwischen beiden Genkopien zur Konservierung der ursprünglichen Funktion führen (Liao 1999; Zhang 2003). Ein weiteres Szenario ist die Pseudogenisierung oder Nonfunktionalisierung. Durch eine Reduzierung des Selektionsdrucks auf die Tochterkopie kann diese degenerative Mutationen oder „loss-of-function“ Mutationen ansammeln und so zu einer funktionslosen oder nicht exprimierten Kopie werden (Zhang 2003; Bridgham et al. 2008). Das für die Evolution neuer Enzyme bzw. neue Funktionen wichtigste Szenario umfasst jedoch die nachfolgende Differenzierung eines der Tochtergene, die zu Proteinen mit neuen Eigenschaften führt. Durch sogenannte „gain-of-function“ Mutationen (als Gegensatz zu den „loss-of-function“ Mutationen), kann sich z.B. die Substratspezifität verändern und damit eine neue Eigenschaft entstehen. Im klassischen Modell von Ohno (1973) wird dieses Szenario als „Neofunktionalisierung“ bezeichnet. Eine Weiterentwicklung dieser klassischen Theorie geht von einer Phase bifunktionaler Enzyme aus. Nach einer Duplikation können die Funktionen auf die Tochtergene aufgeteilt werden und eine Spezialisierung wird ermöglicht (Hughes 1994). Dieser Mechanismus wird als Subfunktionalisierung bezeichnet. Hierfür stellen DHS und HSS ein klassisches Beispiel dar, wobei die DHS gewissermaßen noch ein bifunktionelles Enzym darstellt, da die DHS sowohl die Aktivierung des eIF5A-Vorstufen Proteins aber auch die Bildung von Homospermidin katalysieren kann. Die HSS jedoch hat die Fähigkeit verloren, den eIF5A – das eigentliche Substrat der DHS - als Substrat zu verwenden (Ober et al. 2003b). Die Substratspezifität veränderte sich und es erfolgte damit eine funktionelle Differenzierung. Diese Rekrutierung erfolgte nun mehrfach in der Evolution der Angiospermen. Weitere Beispiele für diese wiederholte und unabhängige Evolution neuer Funktionen sind bekannt, wie etwa die Stilbensynthase, die durch unabhängige Duplikationen aus der Chalkonsynthase mehrfach im Laufe der Angiospermen-Evolution entstand (Tropf et al. 1994). Es bleibt jedoch die Frage, mit welchen mechanistischen

Prinzipien während der Evolution tatsächlich neue Funktionen hervorgebracht werden. Wie entgeht das duplizierte Gen der Gefahr degenerative Mutationen anzusammeln und zum Pseudogen zu werden? In der Tat sind degenerative bzw. „loss-of-function“ Mutationen im Vergleich zu „gain-of-function“ deutlich häufiger (Kimura 1983; Sanjuan et al. 2004). Nach dem klassischen Modell von Ohno (1970) verschwindet die Mehrzahl der duplizierten Gene wieder nach dem Prinzip der Nonfunktionalisierung, und zwar bereits in Zeiträumen, die als zu kurz angesehen werden, als das neue Funktionen evolvieren können (Lynch und Conery 2000). Die Plausibilität dieses klassischen Modells als generelle Erklärungsmöglichkeit der Evolution neuer Funktionen wurde deshalb in Frage gestellt (Bergthorsson et al. 2007). Mögliche Erklärungen liefert zum einen Bergthorsson (2007) mit seinem „innovation, amplification, and divergence“ (IAD)-Modell oder das von DePristo (2007) vorgeschlagene Modell zur adaptiven Evolution. In letzterem Modell werden als Grundlage von Innovation promiskuitive Enzyme postuliert, die neben der Hauptaktivität mit ihrem nativen Substrat auch andere, nicht-native Substrate in geringen Raten umsetzen können. De Pristo geht weiter davon aus, dass Selektion zur Etablierung dieser Promiskuität führt, indem Mutationen, welche die nicht-native Aktivität des Enzyms fördern ohne jedoch die native Aktivität negativ zu beeinflussen, fixiert werden. Der zugrunde liegende Evolutionsvorteil wäre, dass diese promiskuitiven Enzyme für eine Subfunktionalisierung durch adaptive Mutationen sehr gut positioniert wären. (DePristo 2007). Im Grunde entspricht dieses Modell dem IAD-Modell von Bergthorsson. Auch er geht als Voraussetzung für Innovation von einem Protein aus, das neben der eigentlich selektierten Funktion auch Nebenaktivitäten besitzt. Bei Veränderung der ökologischen Nische könnte eine dieser Nebenaktivitäten Vorteile bringen und dadurch ein Selektionsdruck zur Verbesserung dieser Nebenaktivität entstehen. Ein Weg zur Optimierung könnte über Genduplikation führen. Letztlich gehen beide Modelle von multifunktionalen Proteinen als Grundlage für die Evolution neuer Funktionen aus. Übertragen auf das DHS-HSS-Modell könnte man die Nebenaktivität der DHS mit Putrescin, die auch nach Duplikation und Subfunktionalisierung bestehen blieb, als Beleg für die postulierte Promiskuität bzw. Multifunktionalität interpretieren. Auch in vielen anderen Arten besitzt die DHS offenbar diese Promiskuität. Spuren von Homospermidin wurden in zahlreichen Angiospermen-Arten aber auch in Moosen nachgewiesen (Ober et al. 2003a). Sogar in bestimmten Säugetiergeweben wurde Homospermidin gefunden. Darüber hinaus wurde am Beispiel der humanen DHS eine Reihe weiterer Substrate, die als Donor-Amine fungieren können, identifiziert (Park et al. 2003). Dazu zählen unter anderen 1-Methylspermidin,

N¹-Ethylspermidine sowie cis- und trans-ungesättigtes Spermidin. Damit wird deutlich, dass selbst ein sehr konserviertes Enzym des Primärstoffwechsels über eine gewisse Substrat-Promiskuität verfügt.

4.2. Evolutives Schicksal der Tochtergene nach der Duplikation in den Convolvulaceae

Durch den belegten einmaligen Ursprung der HSS (s. Kap. 3.8) innerhalb den Convolvulaceae in Verbindung mit dem verstreuten Vorkommen der PAs in wenigen isolierten Arten dieser Familie wurde die Frage nach dem molekularen Hintergrund für dieses Verbreitungsmuster in eine neue Richtung gelenkt. Hinweise für den in dieser Familie vermuteten mehrfachen Ursprung der PAs konnte hinsichtlich der HSS nicht gefunden werden. Wurde somit die Fähigkeit zur PA-Biosynthese in vielen Arten der Convolvulaceae sekundär wieder verloren? Das verstreute Verbreitungsmuster der PAs, das für viele sekundäre Inhaltsstoffe bezeichnend ist, könnte auch Resultat einer unterschiedlichen Expression von entsprechenden Genen des Biosyntheseweges sein (Wink 2003). Sehr nahe liegend war damit die Frage nach dem Verbleib des duplizierten Tochtergens in den heute nicht PA-produzierenden Vertretern der Convolvulaceae. Durch eine Suche nach zu *dhs*- und *hss*-Genen homologen Sequenzen in PA-freien Arten mit anschließender phylogenetischer Analyse konnten interessanterweise in *C. arvensis* zwei Pseudogene, *carv-2* und *carv-3*, nachgewiesen werden, die deutlich im clade der HSS-kodierenden Sequenzen liegen (s. Kap. 3.11). Das belegt zum einen nochmals das ursprüngliche Duplikationsereignis des *dhs*-Gens, zum anderen stellt es ein Beispiel für die Pseudogenisierung eines duplizierten Genes dar. Interessant ist diese Beobachtung, weil Reste dieser Pseudogene tatsächlich bis heute im Genom erhalten blieben. Man kann hierbei spekulieren, ob durch die einst duplizierten Gene möglicherweise bereits aktive Vorstufen der PAs gebildet, jedoch im Laufe der Evolution nicht weiter optimiert wurden, sodass die Gene letztlich unter keinen Selektionsdruck standen und sich degenerative Mutationen ansammeln konnten. Vielleicht war auch die Fähigkeit zur Biosynthese von PAs zu einem früheren Zeitpunkt der Evolution weiter verbreitet innerhalb der Convolvulaceae und wurde sekundär wieder verloren. In diesem Zusammenhang besonders spannend ist die Tatsache, dass die beiden Pseudogene *carv-2* und *carv-3* durch ein zusätzliches und unabhängiges Duplikationsereignis auseinander hervorgehen (s. Abb. 3.16 und Abb. 3.17). Da unterschiedliche degenerative Mutationen in den Pseudogenen nachzuweisen sind

(s. Abb. 3.15), scheinen beide Kopien diese Mutationen erst nach der Duplikation angesammelt zu haben. Ob und welchen Vorteil die Pflanze durch diese Duplikation gewann, kann nur spekuliert werden. Einmal mehr wird jedoch durch dieses Beispiel die Häufigkeit, mit der Duplikationsereignisse stattfinden, belegt.

Auf der Suche nach homologen Sequenzen wurden auch in der PA-freien Art *I. alba* zwei Sequenzen identifiziert. Beide Sequenzen werden in der Pflanze exprimiert und bilden funktionale Genprodukte. In der Phylogenie gruppieren die Sequenzen deutlich im HSS- bzw. DHS-clade. Anhand der biochemische Charakterisierung konnte das von der im DHS-clade liegenden Sequenz kodierte Protein eindeutig als DHS klassifiziert werden. Das Genprodukt der zweiten, im HSS-clade liegenden Sequenz, besitzt im Vergleich zu anderen HSS-Enzymen jedoch eine hohe Aktivität mit dem eIF5A (s. Tab. 3.6, Tab. 3.8 und Tab. 3.15). Dies ist eine interessante Beobachtung, gibt aber keinen Hinweis auf die biologischen Funktion dieses putativen HSS-Enzymes in *I. alba*. Man kann über eine Rolle in der Biosynthese der in dieser Art vorkommenden Indolizidin-Alkaloide spekulieren (s. Abb. 3.13). In diesem Zusammenhang könnten weitere biochemische Untersuchungen des rekombinanten Enzymes mit Hinblick auf weitere mögliche Substrate viel versprechend sein. Insbesondere unter Berücksichtigung der verschiedenen Donor-Amine, welche die humane DHS umsetzen kann (Park et al. 2003), erscheint eine Beteiligung an der Indolizin-Alkaloid-Biosynthese zumindest möglich. Zudem spricht die Tatsache, dass diese putative HSS-Sequenz bis heute in *I. alba* vorhanden ist und offensichtlich vor degenerativen Mutationen geschützt wurde, für einen Selektionsvorteil, der mit dem Besitz dieser Sequenz einhergeht, zumal das Gen exprimiert wird. Durch den zeitlich begrenzten Rahmen dieser Arbeit bleiben allerdings diese Fragen offen. Damit bietet dieses Beispiel für die Zukunft noch viele spannende Möglichkeiten um weitere Einblicke in die Evolution durch Genduplikation zu gewinnen.

4.3. Fixierung duplizierter Gene im Genom und Einfluss positiver Selektion

Damit duplizierte Gene im Laufe der Evolution im Genom fortbestehen, müssen diese der Pflanze Vorteile bringen. Solch ein Vorteil kann etwa in der genetischen Redundanz liegen, die zu einer erhöhten Produktion eines limitierenden Produkts führt (Lynch et al. 2001). Beim Beispiel DHS/HSS könnte jedoch auch genau das Gegenteil der Fall sein. Da der von der DHS katalysierte Mechanismus zur Aktivierung des eIF5A von essentieller Bedeutung für den Organismus ist, könnte eine zweite Kopie mit gleichen biochemischen

Eigenschaften negative Effekte für den Organismus mit sich bringen. Dabei gilt es auch molekulare Interaktionen zu berücksichtigen. Schon Hughes und Hughes (1993) erkannten die Bedeutung der korrekten Wechselwirkungen zwischen Proteinen. Mutationen, welche die Struktur eines duplizierten Proteins verändern und somit auch dessen Wechselwirkungen beeinflussen, können oft negativere Auswirkungen auf den Organismen zeigen als Nullmutanten (Hughes und Hughes, 1993). Dabei ist am Modellsystem der HSS/DHS zu berücksichtigen, dass DHS sowie HSS in der Zelle in ihrer aktiven Form als Homotetramer vorliegen (Liao et al. 1998; Ober et al. 2003b). Nach der Duplikation des ursprünglichen Gens könnten die Produkte beider Tochterkopien vermutlich anfänglich gemischte Tetramere bilden, wie Bridgham (2008) das allgemein für multimere Enzyme postulierte. Erlangt eine Tochterkopie Nonsense-Mutationen und die Produkte dieses Gens gehen trotzdem in die Tetramere als Bindungspartner ein, können diese in Ihrer Funktion eingeschränkt bis funktionslos werden. Das könnte dazu führen, dass beide Tochtergene weiterhin unter stabilisierender Selektion stehen und somit das Zeitfenster länger wird, in dem beide Tochtergene im Genom erhalten bleiben. Dadurch wachsen die Chancen einer Neo- oder Subfunktionalisierung (Bridgham et al. 2008). Voraussetzung der Interaktion ist natürlich die Expression der duplizierten Gene im gleichen Gewebe. In diesem Zusammenhang wird die Bedeutung einer getrennten Expression der Tochtergene deutlich, auf die im Kap. 4.4 näher eingegangen wird. Um negative Effekte durch eine zweite Kopie der DHS zu verringern, könnte allerdings auch positive Selektion auf eine Tochter-Kopie gewirkt und somit zur Anhäufung von Veränderungen geführt haben. Damit würden die Interaktionen der Genprodukte rasch reduziert. Tatsächlich geht Neo- bzw. Subfunktionalisierung oft mit erhöhten Substitutionsraten und auch einer erhöhten Anzahl an Aminosäureaustauschen einher (Rodriguez-Trelles et al. 2003; Zhang 2003). Auch beim Beispiel der HSS und DHS gibt es Hinweise auf erhöhte Substitutionsraten, die sich in größeren Astlängen im ML-Stammbaum äußern (s. Abb. 3.12 und Abb. 3.17). Die Astlänge entspricht hier der Anzahl der Substitutionen pro Sequenzposition. Auffällig sind die deutlich längeren Äste in der Gruppe der HSS-kodierenden Sequenzen im Vergleich zu den Ästen, die zu den DHS-kodierenden Sequenzen führen. Auch in der vorhergehenden Arbeit von Reimann (2004) konnten zum einen diese längeren Äste im Stammbaum beobachtet werden, zum anderen wurden auch leicht erhöhte nicht-synonyme Substitutionsraten für die HSS-kodierenden cDNA-Sequenzen berechnet. Diese erhöhten Substitutionsraten der HSS-kodierenden Sequenzen in den verschiedensten Linien der Angiospermen können zum einen durch „relaxed functional con-

straints“ erklärt werden (Lynch und Conery 2000), die auf eine Tochterkopie allein durch die Redundanz der Funktion wirken. Zum anderen führt auch positive Selektion zu einer Erhöhung der Substitutionsraten. In beiden Fällen würde eine Kopie nach der Duplikation insgesamt schneller evolvieren. Unter Berücksichtigung funktionaler Aspekte könnte es von Vorteil sein, wenn bestimmte Sequenzabschnitte bzw. Motive im Enzym, z.B. die Substratbindungsstelle, besonders schnell evolvieren. In dem Fall würde positive Selektion nicht auf die Gesamtsequenzen, sondern auf einzelne Aminosäuren wirken. Nachgewiesen wurde dieser Mechanismus etwa im Fall der Aldehyd-Oxidase, die zweimal unabhängig in der Evolution der Eukaryoten durch Genduplikation aus der Xanthin-Dehydrogenase entstand. Nach jeder Duplikation erfuhren beide Duplikate eine Periode schneller Evolution in der identische Positionen Gegenstand positiver Selektion waren. Diese Positionen befinden sich dabei in der FAD- und in der Substratbindungsstelle der Enzyme (Rodriguez-Trelles et al. 2003). Am Beispiel der DHS/HSS ist in dem Zusammenhang auffällig, dass bei der Hauptzahl der charakterisierten HSS-Enzyme durch den Verlust der Fähigkeit, den eIF5A zu binden und umzusetzen, eine Veränderung der Substratspezifität erfolgte. Damit lag die Vermutung nahe, dass möglicherweise speziell die an der Bindung des eIF5A beteiligten Aminosäuren bzw. Nukleotide unter positiver Selektion stehen könnten. Durch die Anwendung der unter Kap. 3.12 beschriebenen Analysen wurden vier biochemisch eindeutig charakterisierte HSS-kodierende Sequenzen, die mit dem eIF5A eine sehr niedrige Aktivität zeigten, bezüglich positiver Selektion untersucht. Durch die Berechnungen gingen mehrere Aminosäuren hervor, die möglicherweise unter positiver Selektion gestanden haben könnten. Abhängig von den Abschnitten bzw. Zweigen im Gen-Stammbaum, für die positive Selektion angenommen wurde, variierten diese Positionen allerdings. Auch der berechnete ω -Wert als Maß der positiven Selektion (s. Kap. 2.2.21, 3.12) zeigte in den verschiedenen Berechnungen erhebliche Unterschiede, wobei der höchste ω -Wert für den Ast *b*, der zur HSS-Sequenz aus *M. quinquifolia* führt, zu beobachten war. Die statistische Unterstützung aus den „log-likelihood ratio“-Tests (LRTs) für positive Selektion (s. Tab. 3.19, Kap. 3.12) war insgesamt gering und bei einem Signifikanzniveau von 5 % als nicht signifikant einzustufen. Das jedoch eine verminderte negative Selektion bestand, ergab ein weiterer „log-likelihood ratio“-Tests (s. Tab. 3.19, Kap. 3.12). Trotz der schwachen statistischen Unterstützung für positive Selektion war es interessant zu überprüfen, ob die vorgeschlagenen Positionen in hoch konservierten Bereichen der DHS liegen. Herangezogen wurde dazu das Aminosäure-Alignment, welches den Untersuchungen zur positiven Selektion zu Grunde lag. Zusätzlich

enthält das in Abb. 4.1 dargestellte Alignment die Aminosäure-Sequenz der humanen DHS. Aufgrund der hohen Ähnlichkeit der DHS-Enzyme diente die humane DHS dazu, bereits charakterisierte Motive wie die Spermidin- und NAD-Bindungsstelle (Liao et al. 1998; Lee et al. 2001) in den homologen Sequenzen der Pflanzen zu lokalisieren. Dabei ist hervorzuheben, dass die DHS-Enzyme aus den unterschiedlichsten Organismen nicht nur eine hohe Sequenz-Identität auf Nukleinsäure- und Aminosäureebene aufweisen, sie besitzen durch die Organisation als Tetramere aus vier gleichen Untereinheiten mit einer molaren Masse von 40-42 kDa (Joe et al. 1995; Kang et al. 1995; Tao und Chen 1995; Wolff et al. 1995; Liao et al. 1998; Ober et al. 2003b) auch eine hohe Ähnlichkeit in der räumlichen Struktur. Mit Hinblick auf diese Ähnlichkeit können charakterisierte Motive der humanen DHS auf pflanzlichen Enzymen übertragen werden. In diesem Vergleich ergaben sich keine Überschneidungen zwischen den Positionen, die laut den Berechnungen möglicherweise unter positiver Selektion stehen, und jenen, die an der Spermidin- oder NAD-Bindung beteiligt sind (s. Abb. 4.1). Da auch die bekannten HSS-Enzyme sowohl Spermidin und NAD für ihre native Aktivität benötigen, ist dieser Befund wenig überraschend. Er dient jedoch indirekt zur Bekräftigung der Ergebnisse aus den Berechnungen zur positiven Selektion.

Bei einigen Positionen, die laut den Berechnungen unter positiver Selektion standen (s. Tab. 3.18), zeigte der nähere Blick auf das Alignment, dass sowohl DHS als auch HSS die gleichen Aminosäuren aufweisen. Bei drei vorgeschlagenen Positionen besitzen jedoch alle untersuchten HSS-Enzyme eine von den DHS-Enzymen abweichende Aminosäure. Es sind dies die Positionen 154N (Asparagin), 165I (Isoleucin) und 169N (Asparagin) in der Aminosäure-Sequenz der DHS-Enzyme, die in der Abb. 4.1 mit einem gelben Balken hervorgehoben sind. Interessanterweise sind auch in den als Außengruppe verwendeten DHS-Sequenzen aus *N. tabacum* und *L. esculentum* in diesen Positionen Asparagin und Isoleucin zu finden. Alle untersuchten HSS-Enzyme der Convolvulaceae hingegen besitzen an diesen Stellen Histidin (154H), Valin (165V) und Aspartat (169D). Betrachtet man diese Veränderungen im Detail, so kommt es beim Austausch von Asparagin (154N) zu einer deutlichen Veränderung der Seitenkette durch die Einführung von Histidin (154H) mit dem Imidazolring. Ähnliches trifft für den Austausch von Asparagin (169N) gegen Aspartat (169D) zu, die sich durch eine hydrophile ungeladene Seitenkette im Fall von Asparagin und einer geladenen Seitenkette bei Aspartat unterscheiden. Hingegen sind die physikalisch-chemischen Eigenschaften der Aminosäuren Isoleucin (165I) und Valin (165V) sehr ähnlich. Beide

zeichnen sich durch eine aliphatische Seitenkette aus. Ob diese Veränderungen ausreichen, um die diskutierte Bindungsfähigkeit des eIF5A zu verlieren oder zumindest stark zu reduzieren, darüber kann derzeit nur spekuliert werden, insbesondere da über die an der Bindung des eIF5A beteiligten Positionen noch keine Daten verfügbar sind. Einen interessanten Ansatz würde hier die zielgerichtete Einführung von Mutationen, die sogenannte „site-directed Mutagenesis“, bieten. Würde man in den DHS-kodierenden Sequenzen die entsprechenden Aminosäuren tauschen, könnten anschließende biochemische Untersuchungen dieser veränderten Enzyme Aufschluss über deren Aktivität mit dem eIF5A liefern. Damit bieten sich auch hier noch spannende Möglichkeiten für weiterführende Forschungen.

Zu beachten bleibt, dass die oben genannten Positionen in den Berechnungen vorgeschlagen wurden, wenn der basale Ast *a*, der zu den HSS-Sequenzen führt (s. Abb. 3.19) als foreground branch definiert wurde. Dieser Ast *a*, der die Evolution direkt nach der Duplikation beinhaltet, stellt dabei vielleicht den interessantesten Kandidat für die Untersuchung positiver Selektion dar. Störende Interaktionen der Genprodukte nach der Duplikation des *dhs*-Gens, wie etwa die Konkurrenz um das native Substrat eIF5A, sollten möglichst rasch nach dem Duplikationsereignis beseitigt worden sein. Andererseits korreliert positive Selektion auch immer mit erhöhten Substitutionsraten – diese scheinen, wenn man die Astlängen betrachtet, besonders bei der HSS-kodierenden Sequenz aus *M. quinquefolia* erhöht zu sein. Interessanterweise wurde mit 16,491 für Ast *b* der höchste ω_2 -Wert berechnet, allerdings sind nur 2% der Positionen unter positiver Selektion (p_2). Anders bei Ast *a*, hier unterliegen laut den Analysen 12% der Positionen in den foreground branches bei einem ω_2 -Wert von 1 zumindest einen deutlich reduzierten Selektionsdruck.

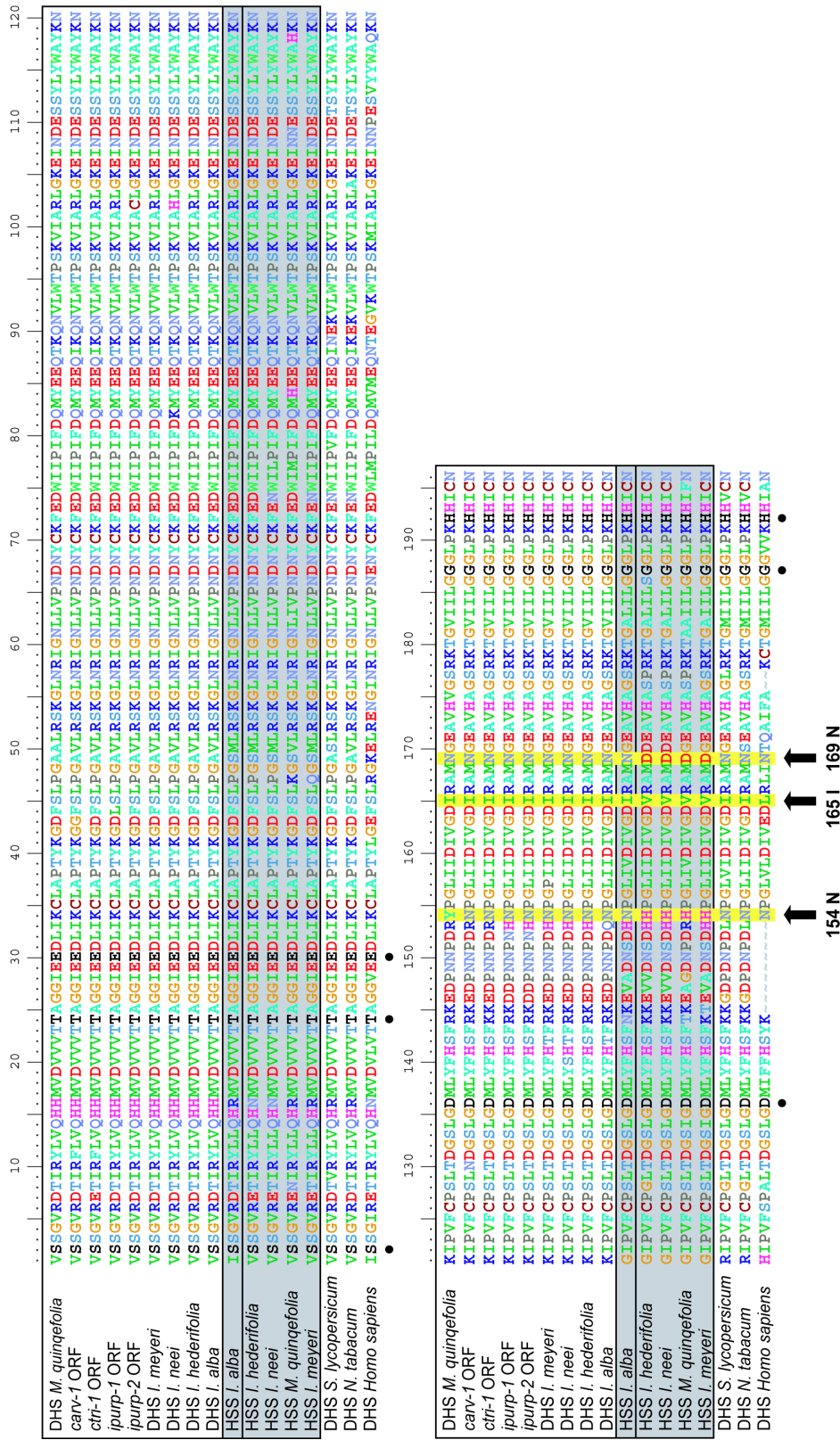


Abb. 4.1 Aminosäure-Alignment (Einbuchstabencode) der DHS- und HSS-kodierenden Sequenzen aus den Convolvulaceae sowie der DHS-kodierenden Sequenzen aus *Solanum lycopersicum*, *Nicotiana tabacum* und *Homo sapiens* und die putative HSS-kodierende Sequenz aus *I. alba*. Die Positionen 154N, 165I und 169N, die möglicherweise unter positiver Selektion stehen, sind mit gelben Balken hervorgehoben. Positionen, die bei der humanen DHS an der Bindung von NAD und Spermidin beteiligt sind, sind mit einem schwarzem Punkt gekennzeichnet und in schwarzer Schrift. Es betrifft dies die Positionen 2S, 24T, 30E, 131D, 187G und 192H (Lee et al. 2001).

Eine weitere, vielleicht interessante Beobachtung ergibt sich bei einem Vergleich mit der Aminosäuresequenz der putativen HSS aus *I. alba*, die mit 38 pkat/mg eine deutliche spezifische Aktivität mit dem eIF5a zeigte. Im Alignment (s. Abb. 4.1) zeigen die biochemisch eindeutigen klassifizierten HSS-Sequenzen auffällige Übereinstimmungen mit der putativen HSS Sequenz aus *I. alba*. Es sind dies die Positionen 13V, 49A, 121K, 147D und 148P, die mit Ausnahme von 121K bei den Berechnungen zur positiven Selektion vorgeschlagen wurden, allerdings bei unterschiedlichen, als foreground definierten Abschnitten. Daraus lassen sich Hinweise ableiten, dass auch dieses Enzym unter einem reduzierten Selektionsdruck steht bzw. stand. In den zuvor besprochenen Positionen 154N, 165I und 169N besitzt diese putative HSS allerdings die Aminosäuren, die für die DHS-Enzyme charakteristisch sind. Insbesondere im Zusammenhang mit der hohen Aktivität mit dem eIF5a unterstreicht dies die vermutliche Bedeutung dieser Positionen für die Bindung des eIF5a.

Zusammenfassend betrachtet ergaben sich interessante Hinweise hinsichtlich möglicher positiver Selektion bei der Evolution der HSS-kodierenden Sequenzen, auch wenn in den Berechnungen keine statistisch signifikante Unterstützung für eine positive Selektion gefunden werden konnte. Die Aussagekraft der „log-likelihood ratio“-Tests (LRTs) und insgesamt der Berechnungsmethode ist nicht als absolutes Maß zu betrachten. Zwar konnten die Modelle und auch die LRTs verbessert werden, allerdings sind die Raten zur Detektion positiver Selektion in computersimulierten Datensätzen mit 7,5 bis 17% relativ niedrig (Zhang et al. 2005). Besonders wenn man bedenkt, dass die HSS mehrfach unabhängig in verschiedenen Familien der Angiospermen entstand und immer eine Abschaltung der DHS-Aktivität stattfand, also die Bindungsfähigkeit des eIF5A verloren ging, dann scheint es sehr unwahrscheinlich, dass eine zufällige Akkumulation von neutralen Substitutionen zu Paralogen führte, die im Laufe der Evolution die gleiche Funktion bei der PA-Biosynthese erwarben. Auch für das bereits beschriebene Beispiel der Aldehyd-Oxidase wurde ähnlich argumentiert (Rodriguez-Trelles et al. 2003). Ein weiterer lohnender Ansatz, vor allem mit Blick auf die im Rahmen dieser Arbeit bereits durchgeführten Analysen, wäre die Ausweitung der Untersuchung hinsichtlich der Wirkung positiver Selektion auf weitere bekannte HSS-kodierende Sequenzen aus den verschiedenen Linien der Angiospermen.

4.4. Differenzierung der Expression als Mechanismus zur Fixierung duplizierter Gene im Genom

Bisher wurden hauptsächlich funktionelle Differenzierungen als Mechanismus zur Erhaltung der Tochtergene nach einer Duplikationen betrachtet. Von enormer Bedeutung ist jedoch auch die regulatorische Differenzierung, die zu einer unterschiedlichen Expression der Tochtergene führt (Force et al. 1999; Zhang 2003). Eine getrennte Expression der Kopien würde, da keine Interaktionen der Genprodukte stattfinden können, den Vorteil bringen, dass der Selektionsdruck für eine rasche Veränderung sinkt und gleichzeitig auch der Effekt der stabilisierenden Selektion entkräftet wird (Bridgham et al. 2008), wie bereits im Kap. 4.3 erwähnt. Tatsächlich zeigten Untersuchungen in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*, dass sich nach Genduplikation beide Kopien relativ rasch nach dem Duplikationsereignis hinsichtlich ihrer Expression differenzieren (Wagner 2000; Gu et al. 2002). Ein konkretes Beispiel aus dem Sekundärstoffwechsel stellt die Chalkon-Synthase (CHS) dar. Die CHS ist durch eine Genfamilie, die durch zahlreiche Genduplikationen entstand, kodiert. Die duplizierten Kopien dieser Gene zeigen erhebliche Unterschiede hinsichtlich der Expression in Geweben aber auch in Bezug auf die Entwicklungsphase (Durbin et al. 2000; Durbin et al. 2003). Auch DHS und HSS sind unterschiedlich exprimiert, wobei sowohl eine räumliche als auch eine zeitliche bzw. entwicklungsabhängige Trennung zu beobachten ist (Moll et al. 2002; Anke et al. 2004; Niemüller 2007; Anke et al. 2008). Insgesamt gelten Veränderungen der Expression als wichtiger Mechanismus zur Erhaltung duplizierter Gene (Zhang 2003). Ungeklärt ist jedoch, welcher Mechanismus als erstes zum Tragen kommt. Erfolgt zuerst eine funktionelle oder eine regulatorische Differenzierung? Vor diesem Hintergrund stellt die Untersuchung der Expression von DHS und HSS aus *I. alba* eine weiterführende, spannende Arbeit dar. Beide zeigen noch keine deutliche funktionelle Trennung. Möglicherweise stellen sie ein Beispiel dar, bei dem zumindest eine räumliche oder zeitliche Differenzierung der Expression auftrat und so zur Erhaltung des duplizierten Gens führte. Dies zu überprüfen könnte Ziel weitergehender Forschung sein. Ein ähnliches Beispiel wurde bereits aus *Crotalaria juncea* beschrieben. Es wurden zwei funktionelle und aktive *dhs*-Gene mit unterschiedlichen Expressionsmuster nachgewiesen (Nurhayati und Ober 2005). Beide Tendenzen, funktionelle Differenzierung und Veränderung der Genexpression, muß man möglicherweise aber als parallel wirkende Mechanismen ansehen. Papp (2003) hat nachgewiesen, dass sich mit zunehmender Zeit nach dem Duplikationsereignis die gemeinsamen regulatori-

schen Elemente der Tochtergene reduzieren und so möglicherweise eine sukzessive Veränderung der Expression zustande kommt.

Bei den hier untersuchten Arten konnte vor allem auf Proteinebene eine deutlich Trennung der Expression nachgewiesen werden. In *I. neei* konnte in Wurzelquerschnitten durch *in situ*-Immunolokalisation nur in wenigen Zellen eine HSS-Expression nachgewiesen werden. Zudem scheint die Expression nur auf bestimmte Entwicklungsphasen begrenzt zu sein. Die Ergebnisse aus RT-PCR-Versuchen bestätigen grundsätzlich die räumliche Expression der HSS in den Wurzeln, wobei allerdings auch in anderen Pflanzenteilen Transkripte des *hss*-Gens nachgewiesen wurden. Es zeigte sich jedoch, dass in *I. neei* und in *I. hederifolia* die HSS-Expression ähnlich reguliert ist. Das kann als weiterer Beleg für den gemeinsamen Ursprung des *hss*-Gens und der PA-Biosynthese in den Convolvulaceae interpretiert werden, allerdings sind beide Arten nah verwandt. Ein nächster Schritt wäre die Untersuchung der Expression in der phylogenetisch distanzierten Art *M. quinquefolia*. Die HSS-kodierende Sequenz aus dieser Art zweigt sehr früh im Stammbaum von den anderen HSS-kodierenden Sequenzen ab. Möglicherweise hat die Evolution hier ein anderes Expressionsmuster geformt, durch eine unabhängige Evolution der regulatorischen Elemente. Beobachtet wurde dies bereits bei Vertretern aus der Familie der Boraginaceae. Die HSS entstand innerhalb dieser Familie durch eine einmalige Genduplikation, das Expressionsmuster der HSS unterscheidet sich jedoch deutlich in den verschiedenen Vertretern dieser Familie. So konnte in *Cynoglossum officinale* die HSS nur in der Endodermis und im Perizykel der Wurzel nachgewiesen werden. In *Symphytum officinale* zeigte die HSS eine ähnliche Expression, wurde zusätzlich jedoch in Blättern nachgewiesen und in *Heliotropium indicum* wird die HSS nur in der unteren Blattepidermis exprimiert, jedoch nicht in der Wurzel (Niemüller 2007). Offensichtlich haben sich hier in den unterschiedlichen Arten die regulatorischen Elemente unabhängig verändert. Dabei sind vor allem die Artbildungsprozesse nicht zu vergessen. Die Evolution des Enzyms in funktioneller und regulatorischer Hinsicht ist immer von der Evolution der Arten überlagert. Damit wird diese unterschiedliche Regulation als individuelle Anpassung an die jeweiligen Erfordernisse in den verschiedenen Arten erkennbar.

Bei *P. laevigata* erreichte die Arbeit nicht den Stand des Nachweises der HSS auf Proteinebene, aber es konnten durch die RT-PCR auch hier Unterschiede in der Expression des *dhs*- und *hss*-Gens festgestellt werden. Damit zeigte sich auch in *P. laevigata* neben der

funktionellen auch die regulatorische Differenzierung der duplizierten Gene. Insgesamt wurde der Schwerpunkt im Laufe der Arbeit jedoch immer mehr auf die Convolvulaceae verlegt.

Zusammenfassend betrachtet, könnte der Einfluss der regulatorischen Differenzierung erhebliche Einflüsse auf die funktionelle Differenzierung besitzen. Wenn die Produkte der duplizierten Gene aufgrund fehlender gemeinsamer Expression nicht mehr interagieren können, würde das den Selektionsdruck in Richtung Differenzierung erniedrigen. Dadurch würde letztlich die Kopie über einen längeren Zeitraum im Genom erhalten bleiben. Genau das scheint ein kritischer Punkt nach einem Duplikationsereignis. Wie lange bleibt eine Kopie erhalten? Gibt es Mechanismen die eine Pseudogenisierung verhindern oder verzögern? Durch die Charakterisierung duplizierter Gene in ihrer Funktion und Expression können Einblicke hinsichtlich ihrer Evolution gewonnen werden, die zur Beantwortung dieser Frage beitragen können. Die Duplikation, die zur HSS führte, scheint in vielen Fällen weit zurückzuliegen und die wirkenden Mechanismen sind oft durch nachfolgende Veränderungen überdeckt. Eines der spannendsten Objekte, die hier vielleicht weitere Einblicke gewähren, stellen die beiden Sequenzen aus *I. alba* dar, da hier keine eindeutige funktionelle Differenzierung zu erkennen ist. Besonders wünschenswert oder hilfreich für die Aufklärung der wirkenden molekularen und mechanistischen Prinzipien wäre allerdings ein möglichst rezentes Duplikationsereignis um die wirkenden Mechanismen gewissermaßen in Aktion untersuchen zu können (DePristo 2007).

4.5. Evolution weiterer Schlüsselenzyme des PA-Biosyntheseweges

Über die Evolution der HSS ist heute vieles bekannt. Allerdings stellt die durch HSS katalysierte Synthese von Homospermidin nur den ersten Schritt in einer Kette von Reaktionen dar, an deren Ende die komplexen Strukturen der PAs stehen. Generell entstehen sekundäre Inhaltsstoffe schrittweise durch eine aufeinanderfolgende Aktivität von Enzymen eines Biosyntheseweges (Grotewold 2005). Ein für die Zukunft sehr spannendes Forschungsfeld stellt die Suche nach weiteren, an der PA-Biosynthese beteiligten Enzymen dar. Dahinter verbirgt sich die Frage, wie man sich generell die Evolution eines Biosyntheseweges mit all seinen beteiligten Enzymen vorstellen kann. In einem Modell von Grotewold (2005) geht dieser von Duplikationen regulatorischer Elemente aus, die zu einer Anhäufung von bestimmten Stoffwechselzwischenprodukten (Intermediaten) führen. Diese Akkumulation

könnte durch promiske Enzyme anderer Stoffwechselwege zu einer neuen biochemischen Umsetzung führen, die in einer anfänglichen Phase noch ineffizient verläuft. Bei einem Selektionsvorteil durch die neuen Produkte würde dieser Weg optimiert und nach Genduplikationen Enzymvarianten selektiert, welche die Zwischenprodukte effizienter umsetzen. So könnte ein komplett neuer Biosyntheseweg entstehen. Für das Beispiel DHS/HSS ergibt sich aus diesem Modell die Frage: Reichte eine Anreicherung von Homospermidin aus, um den Biosyntheseweg der PAs zu initiieren (Ober und Kaltenecker 2009)? Durch die Duplikation des *dhs*-Gens konnte durch den Verdopplungseffekt vielleicht eine ausreichende Anhäufung an Homospermidin erreicht werden, sodass Enzyme mit einer hohen Substratbreite Homospermidin bereits zu Vorstufen der PAs umsetzten. In dem Zusammenhang ist ein Experiment zu erwähnen, bei dem aus Homospermidin in zwei Schritten, die eine Oxidation durch eine Diaminoxidase und eine anschließende Reduktion umfassten, tatsächlich Spuren von PA-Vorstufen hergestellt werden konnten (Robins 1982). Der Fund der beiden Pseudogene in *C. arvensis*, die mit den HSS-kodierenden Sequenzen in phylogenetischen Analysen eine Gruppe bilden, könnten im Hinblick dieses Experiments tatsächlich Spuren von PAs oder Vorstufen davon hervorgebracht haben (s. Kap. 4.2). In transgenen Tabakpflanzen, die das HSS-Enzym unter dem „cauliflower mosaic virus 35S“ Promotor exprimieren, konnten allerdings keine Vorstufen der PAs nachgewiesen werden (Abdelhady et al. 2009). Trotzdem könnten erhöhte Konzentrationen von Homospermidin eine wichtige Voraussetzung für die Evolution von Enzymen darstellen, die Homospermidin als Substrat verwenden (Ober und Kaltenecker 2009). Im Moment erlaubt der Stand des Wissens allerdings nur theoretische Überlegungen. Wie tatsächlich die Etablierung des PA-Biosyntheseweges mit all seinen strukturellen und regulatorischen Elementen erfolgte, ist eine herausfordernde und noch zu klärende Frage. Die Identifikation von weiteren, an der Biosynthese involvierten Enzymen stellt eine spannende Aufgabe der weiterführenden Forschung dar. Auch die Evolution der unterschiedlichen PA-Strukturtypen innerhalb der Convolvulaceae kann durch die Aufklärung späterer Enzyme der Biosynthese detailliert aufgeklärt werden. Vorerst konnte in der hier vorgestellten Arbeit ein gemeinsamer Ursprung des ersten Schrittes der PA-Biosynthese nachgewiesen werden. An der Entstehung der verschiedenen Typen sind allerdings spätere Schritte in der Biosynthese beteiligt. An diesem Punkt ist die Stereochemie und das Substitutionsmuster der Necinbase der in dieser Familie nachgewiesenen PA-Typen hervorzuheben. Es sind dies die Necinbasen Isoretronecanol, Platynecin und Trachelanthamidin, Turneforicidin, und Retronecin (s. Abb. 4.2). Diese fünf Necinbasen lassen sich

aus den beiden Isomeren Isoretronecanol (Platynecin) und Trachelanthamidin (Turneforcidin und Retronecin) ableiten. Nach Hartmann und Ober (2000) scheint eine Epimerisation von 8α - zur 8β -Isomeren nicht stattzufinden und es wird postuliert, dass die Biosynthesewege möglicherweise während bzw. durch die Zyklisierung der Iminium-Ionen divergieren.

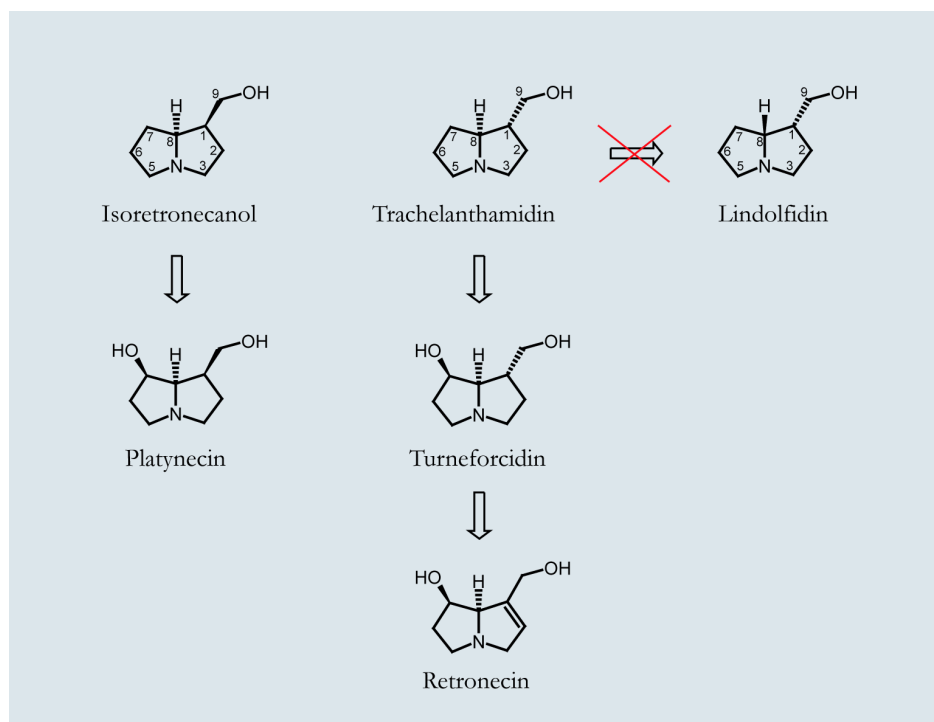


Abb. 4.2 Stereochemie der Necinbasen. In den Convolvulaceae kommen ausschließlich 8α -Isomeren vor. Eine Epimerisation zur 8β -Isomeren Form wurde bisher nicht nachgewiesen.

Das ausschließliche Vorkommen von 8α -Isomeren der Necinbase innerhalb der Convolvulaceae passt gut zum gemeinsamen Ursprung der HSS. Auch die späteren, an der Biosynthese der Necinbase beteiligten Enzyme gehen möglicherweise auf einen gemeinsamen Ursprung zurück. Nach der Zyklisierung zur Necinbase könnten sich die biogenetischen Wege allerdings trennen und zu den verschiedenen Strukturtypen führen. Vor allem in der Rekrutierung der unterschiedlichen Necinsäuren gibt es eine große Vielfalt insgesamt und auch innerhalb der Convolvulaceae. Vorstellbar ist, dass überlagert durch die Artbildungsprozesse, unterschiedliche Enzyme für die aufeinanderfolgenden Schritte des PA-Biosyntheseweges in den getrennten Arten unabhängig entstanden. Ganz allgemein gesprochen reflektiert das Vorkommen von sekundären Inhaltsstoffen Adaptionen und spezielle Überlebensstrategien der Pflanzenarten, die in ein phylogenetisches Netzwerk eingebettet sind (Wink 2003).

5. Zusammenfassung

Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgreiche Identifizierung und Charakterisierung der Homospermidin-Synthase (HSS) und Desoxyhypusin-Synthase (DHS) in Arten der Convolvulaceae und Apocynaceae ermöglichte Untersuchungen molekularer Mechanismen der Evolution. Die HSS als Schlüsselenzym der Pyrrolizidin-Alkaloid-(PA)-Biosynthese entstand durch Genduplikation aus der DHS, einem Enzym des Primärstoffwechsels, das an der Aktivierung des Initiationsfaktors 5A (eIF5A) beteiligt ist. Diese Genduplikation und Rekrutierung der HSS für eine neue Funktion erfolgte unabhängig in den Convolvulaceae und Apocynaceae. Das verstreute Vorkommen sehr unterschiedlicher PA-Strukturen in isolierten Arten der Convolvulaceae ist hinsichtlich der HSS auf nur eine basale Genduplikation innerhalb dieser Familie zurückzuführen. Relikte dieses Duplikationsereignisses wurden als *hss*-ähnliche Pseudogene in der PA-freien Art *Convolvulus arvensis* gefunden. Auch in der PA-freien Art *Ipomoea alba* wurde ein *hss*-ähnliches Gen identifiziert, das aus dieser Genduplikation resultierte. Im Gegensatz zu den Pseudogenen in *C. arvensis* ist dieses putative *hss*-Gen funktionell und wird in der Pflanze exprimiert. Durch eine noch deutliche Aktivität mit dem vermutlich ursprünglichen Substrat des Muttergens, dem eIF5A, unterscheidet sich dieses Enzym jedoch von den bekannten HSS-Enzymen.

Die Entstehung der HSS konnte durch das Modell der Subfunktionalisierung der Tochtergene nach Genduplikation erklärt werden. Für die hier untersuchten HSS-Enzyme konnte mit Ausnahme der bereits erwähnten putativen HSS aus *I. alba* in allen Fällen eine deutliche Veränderung der Substratspezifität im Vergleich zur DHS nachgewiesen werden. Während die HSS-Enzyme mit Putrescin eine deutliche Aktivität zeigen, besitzen sie mit dem eIF5A, dem Substrat der DHS, kaum nachweisbare Aktivitäten und umgekehrt. Daraus entstand eine funktionelle Differenzierung beider Enzyme. Zudem konnten für das *hss*- und das *dhs*-Gen unterschiedliche Expressionsmuster nachgewiesen werden, wobei die Expression des *hss*-Gens nur in spezifischen Geweben erfolgt. HSS und DHS sind damit ein Beispiel für eine Subfunktionalisierung duplizierter Gene sowohl auf funktioneller sowie regulatorischer Ebene. Ob die Übereinstimmung hinsichtlich der veränderten Substratspezifität der HSS, die bei allen unabhängig in verschiedenen Familien entstandenen HSS zu beobachten ist, auf positive Selektion bestimmter biochemischer Eigenschaften zurückzuführen ist, konnte

durch statistische Analysen der in den Convolvulaceae identifizierten Sequenzen nicht signifikant belegt werden. Jedoch wurden drei potentielle Aminosäure-Positionen identifiziert, in denen sich alle HSS- von den DHS-Enzymen unterscheiden und die möglicherweise an der Bindung des eIF5A beteiligt sind.

6. Summary

The successful identification and characterisation of the homospermidine synthase (HSS) and deoxyhypusine synthase (DHS) in different species of the Convolvulaceae and Apocynaceae provided a tool to investigate molecular mechanisms of evolution. HSS, a key enzyme of pyrrolizidin alkaloid (PA) biosynthesis, originated by gene duplication from DHS, an enzyme of primary metabolism involved in the activation of the initiation factor 5A (eIF5A). This gene duplication and recruitment of the HSS for a new function occurred independently in the Convolvulaceae and Apocynaceae. In reference to the HSS, the scattered occurrence of different structural types of PAs in isolated species of the Convolvulaceae can only be attributed to one basal gene duplication within this family. Relicts of this one duplication were found as *hss*-like pseudogenes in the PA-free species *Convolvulus arvensis*. In a second PA-free species, *Ipomoea alba*, another *hss*-like gene was identified, which resulted from the basal gene duplication. Unlike the pseudogenes in *C. arvensis*, this putative *hss* gene is functional and also actively expressed in the plant. From other known HSS-enzymes, the *I. alba* HSS differs through a clearly marked activity with the eIF5A, which was presumably the substrate of the ancient gene.

The evolution of the HSS could best be explained by the model of subfunctionalisation of the daughter genes after gene duplication. Excepting the putative HSS from *I. alba*, all investigated HSS-enzymes show a distinct change of the substrate specificity compared to the DHS. Whereas HSS shows a strong activity with putrescine, the eIF5A, which is the native substrate of DHS, cannot be converted by the HSS and vice versa. With this change of substrate specificity, a functional differentiation took place. Additionally, the *hss* and *dhs* genes are differentially expressed with a restricted *hss* gene expression in specific tissues. With that, HSS and DHS are an example of subfunctionalisation of duplicated genes at the functional and regulatory level. Whether the conformity concerning the change in substrate specificity, which took place in all independently evolved HSS in different plant lineages, resulted from positive selection of specific biochemical properties, could not be significantly proven by statistical analyses of the sequences identified in the Convolvulaceae. However, three potential amino acids were identified in which all HSS-enzymes differ from the DHS leading to the hypothesis, that these sites may be involved in the binding of the eIF5A.

7. Literatur

- Abdelhady, M. I., Beuerle, T. und Ober, D. (2009). "Homospermidine in transgenic tobacco results in considerably reduced spermidine levels but is not converted to pyrrolizidine alkaloid precursors." Plant Molecular Biology **71**(1-2): 145-155.
- Abe, F., Nagao, T., Hikaru, O. und Yamauchi, T. (1991). "Macrocyclic pyrrolizidine alkaloids from *Parsonsia laevigata*." Phytochemistry **30**(5): 1737-1739.
- Anke, S., Gonde, D., Kaltenecker, E., Hansch, R., Theuring, C. und Ober, D. (2008). "Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis in *Phalaenopsis* orchids: developmental expression of alkaloid-specific homospermidine synthase in root tips and young flower buds." Plant Physiology **148**(2): 751-760.
- Anke, S., Niemuller, D., Moll, S., Hansch, R. und Ober, D. (2004). "Polyphyletic origin of pyrrolizidine alkaloids within the Asteraceae. Evidence from differential tissue expression of homospermidine synthase." Plant Physiology **136**(4): 4037-4047.
- Apostolakos, M. J., Schuermann, W. H., Frampton, M. W., Utell, M. J. und Willey, J. C. (1993). "Measurement of gene expression by multiplex competitive polymerase chain reaction." Analytical Biochemistry **213**(2): 277-284.
- Austin, D. F. (1979). "An Infrageneric Classification for *Ipomoea* (Convolvulaceae)." Taxon **28**(4): 359-361.
- Austin, D. F. (1980). "Additional comments on infrageneric taxa in *Ipomoea*." Taxon **29**: 501-502.
- Austin, D. F. (1997). "Dissolution of *Ipomoea* Series *Anisomerae* (Convolvulaceae)." Journal of the Torrey Botanical Society **124**(2): 140-159.
- Austin, D. F. und Bianchini, R. S. (1998). "Additions and Corrections in American *Ipomoea* (Convolvulaceae)." Taxon **47**(4): 833-838.
- Austin, D. F. und Huaman, Z. (1996). "A synopsis of *Ipomoea* (Convolvulaceae) in the Americas." Taxon **45**(1): 3-38.
- Bartig, D., Schümann, H. und Klink, F. (1990). "Posttranslational modification leading to deoxyhypusine or hypusine is a general feature of the archaeobacterial kingdom." Systematic and Applied Microbiology **13**: 112-116.
- Bergthorsson, U., Andersson, D. I. und Roth, J. R. (2007). "Ohno's dilemma: evolution of new genes under continuous selection." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(43): 17004-17009.
- Bernard, P., Gabant, P., Bahassi, E. M. und Couturier, M. (1994). "Positive-selection vectors using the F plasmid ccdB killer gene." Gene **148**(1): 71-4.
- Bertani, G. (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*." Journal of Bacteriology **62**(3): 293-300.
- Bertani, G. (2004). "Lysogeny at mid-twentieth century: P1, P2, and other experimental systems." Journal of Bacteriology **186**(3): 595-600.
- Böttcher, F., Adolph, R.-T. und Hartmann, T. (1993). "Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme in pyrrolizidine alkaloid biosynthesis." Phytochemistry **32**(3): 679-689.
- Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Analytical Biochemistry **72**: 248-254.

- Bridgham, J. T., Brown, J. E., Rodriguez-Mari, A., Catchen, J. M. und Thornton, J. W. (2008). "Evolution of a New Function by Degenerative Mutation in Cephalochordate Steroid Receptors." PLoS Genetics **4**(9): e1000191.
- Calendini, F. und J.-F., M. (2005). PaupUP v1.0.3.1 A free graphical frontend for Paup* Dos software.
- Chen, K. Y. und Liu, A. Y. (1997). "Biochemistry and function of hypusine formation on eukaryotic initiation factor 5A." Biological Signals **6**(3): 105-109.
- Cseke, L., Dudareva, N. und Pichersky, E. (1998). "Structure and evolution of linalool synthase." Molecular Biology and Evolution **15**(11): 1491-1498.
- De Luca, V. und Laflamme, P. (2001). "The expanding universe of alkaloid biosynthesis." Current Opinion in Plant Biology **4**(3): 225-233.
- DePristo, M. A. (2007). "The subtle benefits of being promiscuous: adaptive evolution potentiated by enzyme promiscuity." HFSP Journal **1**(2): 94-98.
- Don, R. H., Cox, P. T., Wainwright, B. J., Baker, K. and Mattick, J. S. (1991). "'Touchdown' PCR to circumvent spurious priming during gene amplification." Nucleic Acids Research **19**(14): 4008.
- Durbin, M. L., Lundy, K. E., Morrell, P. L., Torres-Martinez, C. L. und Clegg, M. T. (2003). "Genes that determine flower color: the role of regulatory changes in the evolution of phenotypic adaptations." Molecular Phylogenetics and Evolution **29**(3): 507-518.
- Durbin, M. L., McCaig, B. und Clegg, M. T. (2000). "Molecular evolution of the chalcone synthase multigene family in the morning glory genome." Plant Molecular Biology **42**(1): 79-92.
- Eich, E. (2007). Solanaceae and Convolvulaceae: Secondary Metabolites: Biosynthesis, Chemotaxonomy, Biological and Economic Significance (A Handbook), Springer-Verlag GmbH.
- Facchini, P. J. und St-Pierre, B. (2005). "Synthesis and trafficking of alkaloid biosynthetic enzymes." Current Opinion in Plant Biology **8**(6): 657-666.
- Force, A., Lynch, M., Pickett, F. B., Amores, A., Yan, Y. L. und Postlethwait, J. (1999). "Preservation of duplicate genes by complementary, degenerative mutations." Genetics **151**(4): 1531-1545.
- Frei, H., Luthy, J., Brauchli, J., Zweifel, U., Wurgler, F. E. und Schlatter, C. (1992). "Structure/activity relationships of the genotoxic potencies of sixteen pyrrolizidine alkaloids assayed for the induction of somatic mutation and recombination in wing cells of *Drosophila melanogaster*." Chemico-Biological Interactions **83**(1): 1-22.
- Fridman, E. und Pichersky, E. (2005). "Metabolomics, genomics, proteomics, and the identification of enzymes and their substrates and products." Current Opinion in Plant Biology **8**: 242-248.
- Frölich, C., Hartmann, T. und Ober, D. (2006). "Tissue distribution and biosynthesis of 1,2-saturated pyrrolizidine alkaloids in *Phalaenopsis* hybrids (Orchidaceae)." Phytochemistry **67**(14): 1493-1502.
- Fu, P. P., Xia, Q., G., L. und Chou, M. W. (2002). "Genotoxic Pyrrolizidine Alkaloids — Mechanisms Leading to DNA Adduct Formation and Tumorigenicity." International Journal of Molecular Sciences **3**: 948-964.
- Fu, P. P., Xia, Q., Lin, G. und Chou, M. W. (2004). "Pyrrolizidine alkaloids--genotoxicity, metabolism enzymes, metabolic activation, and mechanisms." Drug Metabolism Reviews **36**(1): 1-55.
- Gordon, A. H. (1975). Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Amsterdam - London, North Holland Publishing Co.

- Gordon, E. D., Mora, R., Meredith, S. C., Lee, C. und Lindquist, S. L. (1987). "Eukaryotic initiation factor 4D, the hypusine-containing protein, is conserved among eukaryotes." The Journal of Biological Chemistry **262**(34): 16585-16589.
- Gourley, J. M., Heacock, R. A., McInnes, A. G., Nikolin, B. und Smith, D. G. (1969). The structure of Ipalbine, a new hexahydroindolizine alkaloid, isolated from *Ipomoea alba* L. Chemical Communications. 709-710.
- Grisebach, H. (1981). Lignins. The Biochemistry of Plants. Secondary Plant Products. E. E. Conn. New York, Academic Press. **7**: 457-478.
- Grotewold, E. (2005). "Plant metabolic diversity: a regulatory perspective." Trends in Plant Science **10**(2): 57-62.
- Gu, Z., Nicolae, D., Lu, H. H. und Li, W. H. (2002). "Rapid divergence in expression between duplicate genes inferred from microarray data." Trends in Genetics **18**(12): 609-613.
- Gygi, S. P., Rochon, Y., Franza, B. R. und Aebersold, R. (1999). "Correlation between protein and mRNA abundance in yeast." Molecular and Cellular Biology **19**(3): 1720-1730.
- Hahlbrock, K. (1981). Flavonoids. The Biochemistry of Plants. Secondary Plant Products. E. E. Conn. New York, Academic Press. **7**: 425-456.
- Hall, T. A. (1999). "BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT." Nucleic Acids Symposium Series **41**: 95-98.
- Hancock, K. und Tsang, V. C. W. (1983). "India Ink Staining of Proteins of Nitrocellulose Paper." Analytical Biochemistry **133**: 157-162.
- Harborne, J. B. (1993). Introduction to Ecological Biochemistry, Elsevier Academic Press.
- Harlow, E. und Lane, D. (1988). Antibodies - A Laboratory Manual. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Hartmann, T. (2007). "From waste products to ecochemicals: fifty years research of plant secondary metabolism." Phytochemistry **68**(22-24): 2831-2846.
- Hartmann, T. und Ober, D. (2000). Biosynthesis and Metabolism of Pyrrolizidine Alkaloids in Plants and Specialized Insect Herbivores. Topics in Current Chemistry. F. J. Leeper and J. C. Vederas. Berlin, Heidelberg, Springer. **209**: 207-244.
- Hartmann, T. und Ober, D. (2008). Defense by Pyrrolizidine Alkaloids: Developed by Plants and Recruited by Insects. Induced Plant Resistance to Herbivory. A. Schaller. Stuttgart, Germany, Springer Science+Business Media B.V.: 213-231.
- Hartmann, T., Theuring, C., Beuerle, T., Klewer, N., Schulz, S., Singer, M. S. und Bernays, E. A. (2005). "Specific recognition, detoxification and metabolism of pyrrolizidine alkaloids by the polyphagous arctiid *Estigmene acrea*." Insect Biochemistry and Molecular Biology **35**(5): 391-411.
- Hartmann, T., Theuring, C., Witte, L., Schulz, S. und Pasteels, J. M. (2003). "Biochemical processing of plant acquired pyrrolizidine alkaloids by the neotropical leaf-beetle *Platyphora boucardi*." Insect Biochemistry and Molecular Biology **33**(5): 515-523.
- Hartmann, T. und Witte, L. (1995). Chemistry, Biology und Chemoecology of the Pyrrolizidine Alkaloids. Alkaloids: Chemical and Biological Perspectives. S. W. Pelletier. Oxford, Pergamon Press. **Vol. 9**: 155 - 233.
- Holmes, D. S. und Quigley, M. (1981). "A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids." Analytical Biochemistry **114**(1): 193-197.

- Hughes, M. K. und Hughes, A. L. (1993). "Evolution of Duplicate Genes in a Tetraploid Animal, *Xenopus laevis*." Molecular Biology and Evolution **10**(6): 1360-1369.
- Hughes, A. L. (1994). "The evolution of functionally novel proteins after gene duplication." Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing papers of a Biological character. Royal Society (Great Britain) **256**(1346): 119-124.
- Ikeda, Y., Nonaka, H., Furumai, T. und Igarashi, Y. (2005). "Cremastrine, a pyrrolizidine alkaloid from *Cremastra appendiculata*." Journal of Natural Products **68**(4): 572-573.
- Jenett-Siems, K., Kaloga, M. und Eich, E. (1993). "Ipangulines, the first pyrrolizidine alkaloids from the Convolvulaceae." Phytochemistry **34**(2): 437-440.
- Jenett-Siems, K., Ott, S. C., Schimming, T., Siems, K., Muller, F., Hilker, M., Witte, L., Hartmann, T., Austin, D. F. und Eich, E. (2005). "Ipangulines and minalobines, chemotaxonomic markers of the infrageneric *Ipomoea* taxon subgenus Quamoclit, section Mina." Phytochemistry **66**(2): 223-231.
- Jenett-Siems, K., Schimming, T., Kaloga, M., Eich, E., Siems, K., Gupta, M. P., Witte, L. und Hartmann, T. (1998). "Pyrrolizidine alkaloids of *Ipomoea hederifolia* and related species." Phytochemistry **47**(8): 1551-1560.
- Joe, Y. A., Wolff, E. C. und Park, M. H. (1995). "Cloning and expression of human deoxyhypusine synthase cDNA: structure-function studies with the recombinant enzyme and mutant proteins." Journal of Biological Chemistry **270**: 22386-22392.
- Kang, K. R., Wolff, E. C., Park, M. H., Folk, J. E. und Chung, S. I. (1995). "Identification of YHR068w in *Saccharomyces cerevisiae*. Chromosome VIII as a gene for deoxyhypusine synthase: expression and characterization of the enzyme." Journal of Biological Chemistry **270**: 18408-18412.
- Kimura, M. (1983). The Neutral Theory of Molecular Evolution. Cambridge, Cambridge University Press.
- Knoop, V. und Müller, K. (2006). Gene und Stammbäume. München, Elsevier GmbH, Spektrum Akademischer Verlag.
- Koulman, A., Seeliger, C., Edwards, P. J., Fraser, K., Simpson, W., Johnson, L., Cao, M., Rasmussen, S. und Lane, G. A. (2008). "E/Z-Thesinine-O-4'-alpha-rhamnoside, pyrrolizidine conjugates produced by grasses (Poaceae)." Phytochemistry **69**(9): 1927-1932.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature **227**(5259): 680-685.
- Lee, C. H., Um, P. Y. und Park, M. H. (2001). "Structure-function studies of human deoxyhypusine synthase: identification of amino acid residues critical for the binding of spermidine and NAD." The Biochemical Journal **355**(Pt 3): 841-849.
- Liao, D. (1999). "Concerted evolution: molecular mechanism and biological implications." American Journal of Human Genetics **64**(1): 24-30.
- Liao, D. I., Wolff, E. C., Park, M. H. und Davies, D. R. (1998). "Crystal structure of the NAD complex of human deoxyhypusine synthase: an enzyme with a ball-and-chain mechanism for blocking the active site." Structure **6**(1): 23-32.
- Lynch, M. und Conery, J. S. (2000). "The evolutionary fate and consequences of duplicate genes." Science **290**(5494): 1151-1155.
- Lynch, M., O'Hely, M., Walsh, B. und Force, A. (2001). "The probability of preservation of a newly arisen gene duplicate." Genetics **159**(4): 1789-1804.

- Mann, P. (1997). Zur Phytochemie und Chemotaxonomie tropischer und mediterraner Convolvulaceen unter besonderer Berücksichtigung des Alkaloid-Vorkommens. Fachbereich Pharmazie. Berlin, Freie Universität Berlin: 198.
- Maurer, H. R. (1971). Disk electrophoresis and related techniques of polyacrylamide. Berlin - New York.
- McDonald, J. A. und Mabry, T. J. (1992). "Phylogenetic systematics of New World *Ipomoea* (Convolvulaceae) based on chloroplast DNA restriction site variation." Plant Systematics and Evolution **180**: 243-259.
- Miller, R. E., McDonald, J. A. und Manos, P. S. (2004). "Systematics of *Ipomoea* subgenus *Quamoclit* (Convolvulaceae) based on ITS sequence data and a Bayesian phylogenetic analysis." American Journal of Botany **91**(8): 1208-1218.
- Moll, S., Anke, S., Kahmann, U., Hänsch, R., Hartmann, T. und Ober, D. (2002). "Cell-specific expression of homospermidine synthase, the entry enzyme of the pyrrolizidine alkaloid pathway in *Senecio vernalis*, in comparison with its ancestor, deoxyhypusine synthase." Plant Physiology **130**: 47-57.
- Mothes, K. (1955). "Physiology of alkaloids." Annual Review of Plant Physiology **6**: 393-432.
- Murashige, T. und Skoog, F. (1962). "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures." Physiologia Plantarum **15**(3): 473-497.
- Niemüller, D. H. (2007). Vergleichende Lokalisation der Homospermidin-Synthase, Eingangsenzym der Pyrrolizidin-Alkaloid-Biosynthese, in verschiedenen Vertretern der Boraginaceae. Braunschweig, Technische Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig: 154.
- Nurhayati, N., Gonde, D. und Ober, D. (2009). "Evolution of pyrrolizidine alkaloids in *Phalaenopsis* orchids and other monocotyledons: Identification of deoxyhypusine synthase, homospermidine synthase and related pseudogenes." Phytochemistry **70**(4): 508-516.
- Nurhayati, N. und Ober, D. (2005). "Recruitment of alkaloid-specific homospermidine synthase (HSS) from ubiquitous deoxyhypusine synthase: Does *Crotalaria* possess a functional HSS that still has DHS activity?" Phytochemistry **66**: 1346-1357.
- Ober, D. (1997). Strategien zur immunologischen und molekularbiologischen Untersuchung der Homospermidin-Synthase, dem Eingangsenzym der Pyrrolizidinalkaloid-Biosynthese. Naturwissenschaftlichen Fakultät der. Braunschweig, Technischen Universität Carolo-Wilhelmina zu Braunschweig: 224.
- Ober, D. (2005). "Seeing double: gene duplication and diversification in plant secondary metabolism." Trends in Plant Science **10**(9): 444-449.
- Ober, D., Gibas, L., Witte, L. und Hartmann, T. (2003a). "Evidence for general occurrence of homospermidine in plants and its supposed origin as by-product of deoxyhypusine synthase." Phytochemistry(62): 339-344.
- Ober, D., Harms, R. und Hartmann, T. (2000). "Cloning and expression of homospermidine synthase from *Senecio vulgaris*: a revision." Phytochemistry **55**(4): 305-309.
- Ober, D., Harms, R., Witte, L. und Hartmann, T. (2003b). "Molecular evolution by change of function." Journal of Biological Chemistry **278**(15): 12805-12812.
- Ober, D. und Hartmann, T. (1999a). "Deoxyhypusine synthase from tobacco." Journal of Biological Chemistry **274**(45): 32040-32047.
- Ober, D. und Hartmann, T. (1999b). "Homospermidine synthase, the first pathway-specific enzyme of pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolved from deoxyhypusine synthase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **96**(26): 14777-14782.
- Ober, D. und Kaltenecker, E. (2009). "Pyrrolizidine alkaloid biosynthesis, evolution of a pathway in plant secondary metabolism." Phytochemistry in press.

- Ohno, S. (1970). Evolution by Gene Duplication. New York, NY: Springer-Verlag.
- Ohno, S. (1973). "Ancient Linkage groups and frozen accidents." Nature **244**: 259-262.
- Papp, B., Pal, C. und Hurst, L. D. (2003). "Evolution of *cis*-regulatory elements in duplicated genes of yeast." Trends in Genetics **19**(8): 417-422.
- Park, J. H., Wolff, E. C., Folk, J. E. und Park, M. H. (2003). "Reversal of the deoxyhypusine synthesis reaction. Generation of spermidine or homospermidine from deoxyhypusine by deoxyhypusine synthase." Journal of Biological Chemistry **278**(35): 32683-32691.
- Park, M. H., Joe, Y. A. und Kang, K. R. (1998). "Deoxyhypusine synthase activity is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." The Journal of Biological Chemistry **273**(3): 1677-1683.
- Park, M. H., Lee, Y. B. und Joe, Y. A. (1997). "Hypusine is essential for eukaryotic cell proliferation." Biological Signals **6**(3): 115-123.
- Pichersky, E. und Gang, D. R. (2000). "Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective." Trends in Plant Science **5**(10): 439-445.
- Posada, D. und Crandall, K. A. (1998). "MODELTEST: testing the model of DNA substitution." Bioinformatics **14**(9): 817-818.
- Reimann, A., Nurhayati, N., Backenkohler, A. und Ober, D. (2004). "Repeated evolution of the pyrrolizidine alkaloid-mediated defense system in separate angiosperm lineages." The Plant Cell **16**(10): 2772-2784.
- Reina, M., Gonzalez-Coloma, A., Gutierrez, C., Cabrera, R., Henriquez, J. und Villarroel, L. (1997). "Bioactive saturated pyrrolizidine alkaloids from *Heliotropium floridum*." Phytochemistry **46**: 845-853.
- Richter, G. (1996). Biochemie der Pflanzen. Stuttgart, New York, Thieme Verlag.
- Robins, D. J. (1982). "A biogenetically patterned synthesis of the pyrrolizidine alkaloid trachelanthamidine." Journal of the Chemical Society. Chemical Communications: 1289-1290.
- Rodriguez-Trelles, F., Tarrío, R. und Ayala, F. J. (2003). "Convergent neofunctionalization by positive Darwinian selection after ancient recurrent duplications of the xanthine dehydrogenase gene." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **100**(23): 13413-13417.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanjuan, R., Moya, A. und Elena, S. F. (2004). "The distribution of fitness effects caused by single-nucleotide substitutions in an RNA virus." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **101**: 8396-8401.
- Sasaki, K., Abid, M. R. und Miyazaki, M. (1996). "Deoxyhypusine synthase gene is essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS Letters **384**: 151-154.
- Schmidt, H. A., Strimmer, K., Vingron, M. und von Haeseler, A. (2002). "TREE-PUZZLE: maximum likelihood phylogenetic analysis using quartets and parallel computing." Bioinformatics **18**: 502-504.
- Schnier, J., Schwelberger, H. G., Smit-McBride, Z., Kang, H. A. und Hershey, J. W. (1991). "Translation initiation factor 5A and its hypusine modification are essential for cell viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Molecular and Cellular Biology **11**(6): 3105-14.
- Shuman, S. (1994). "Novel Approach to Molecular Cloning and Polynucleotide Synthesis Using Vaccinia DNA Topoisomerase." Journal of Biological Chemistry **269**: 32678-32684.

- Strimmer, K. und von Haeseler, A. (1996). "Quartet puzzling: A quartet maximum likelihood method for reconstructing tree topologies." Molecular Biology and Evolution **13**: 964-969.
- Studier, F. W., Rosenberg, A. H., Dunn, J. J. und Dubendorff, J. W. (1990). "Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes." Methods in Enzymology **185**: 60-89.
- Swofford, D. (1999). PAUP*. Phylogenetic analysis using maximum parsimony (* and other methods). Sunderland: Sinauer Associates.
- Tao, Y. und Chen, K. Y. (1995). "Molecular cloning and functional expression of *Neurospora* deoxyhypusine synthase cDNA and identification of yeast deoxyhypusine synthase cDNA." Journal of Biological Chemistry **270**: 23984-23987.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. und Higgins, D. G. (1997). "The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools." Nucleic Acids Research **25**(24): 4876-2882.
- Tofern, B. (1999). Neue und seltene Sekundärstoffe des Phenylpropan-, Terpen- und Alkaloid-Stoffwechsels aus tropischen Convolvulaceen. Fachbereich Biologie, Chemie, Pharmazie. Berlin, Freie Universität Wien.
- Tofern, B., Kaloga, M., Witte, L., Hartmann, T. und Eich, E. (1999). "Occurrence of loline alkaloids in *Argyrea mollis* (Convolvulaceae)." Phytochemistry **51**: 1177-1180.
- Tropf, S., Lanz, T., Rensing, S. A., Schroder, J. und Schroder, G. (1994). "Evidence that stilbene synthases have developed from chalcone synthases several times in the course of evolution." Journal of Molecular Evolution **38**(6): 610-618.
- Wagner, A. (2000). "Decoupled evolution of coding region and mRNA expression patterns after gene duplication: implications for the neutralist-selectionist debate." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **97**(12): 6579-6584.
- Wink, M. (2003). "Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective." Phytochemistry **64**(1): 3-19.
- Wolff, E. C., Lee, Y. B., Chung, S. I., Folk, J. E. und Park, M. H. (1995). "Deoxyhypusine synthase from rat testis: purification and characterization." Journal of Biological Chemistry **270**: 8660-8666.
- Yang, Z. (1998). "Likelihood ratio tests for detecting positive selection and application to primate lysozyme evolution." Molecular Biology and Evolution **15**(5): 568-73.
- Yang, Z. (2007). "PAML 4: a program package for phylogenetic analysis by maximum likelihood." Molecular Biology and Evolution **24**(8): 1586-1591.
- Yang, Z. und Nielsen, R. (2002). "Codon-substitution models for detecting molecular adaptation at individual sites along specific lineages." Molecular Biology and evolution **19**(6): 908-917.
- Yang, Z., Nielsen, R., Goldman, N. und Pedersen, A. M. (2000). "Codon-substitution models for heterogeneous selection pressure at amino acid sites." Genetics **155**(1): 431-449.
- Yang, Z. und Swanson, W. J. (2002). "Codon-substitution models to detect adaptive evolution that account for heterogeneous selective pressures among site classes." Molecular Biology and Evolution **19**(1): 49-57.
- Yang, Z., Wong, W. S. und Nielsen, R. (2005). "Bayes empirical bayes inference of amino acid sites under positive selection." Molecular Biology and Evolution **22**(4): 1107-1118.
- Zhang, J. (2003). "Evolution by gene duplication: an update." Trends in Ecology and Evolution **18**(6): 292-298.

Zhang, J., Nielsen, R. und Yang, Z. (2005). "Evaluation of an improved branch-site likelihood method for detecting positive selection at the molecular level." Molecular Biology and Evolution **22**(12): 2472-2479.

Zufall, R. A. und Rausher, M. D. (2004). "Genetic changes associated with floral adaptation restrict future evolutionary potential." Nature **428**(6985): 847-850.

8. Anhang

Tab. 8.1 Medium und Lösungen für die Pflanzensterilkultur

Murashige und Skoog Medium (MSOH), ohne Hormone ^{a)} - flüssig:			
NH ₄ NO ₃	1,650 g	Natrium-Eisen-Ethlendiamin-tetraacetat (Na-Fe-EDTA)	0,040 g
Kaliumnitrat (KNO ₃)	1,900 g	Myo-Inositol	0,100 g
Magnesiumsulfat-Heptahydrat (MgSO ₄ *7 H ₂ O)	0,370 g	Kaliumjodid-Stammlösung	1,0 ml
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	0,170 g	Spurenelemente-Stammlösung	1,0 ml
Calciumchlorid-Dihydrat (CaCl ₂ *2 H ₂ O)	0,440 g	Vitamin-Stammlösung	1,0 ml
Saccharose (3%)	30 g	Wasser	ad 1000 ml
		pH 5,8	
Spurenelemente-Stammlösung		Vitamin-Stammlösung	
Borsäure (H ₃ BO ₃)	620 mg	Nicotinsäure	0,5 g
Mangansulfat-Hydrat (MnSO ₄ *H ₂ O)	1000 mg	Thiamin-Hcl	5,0 g
Zinksulfat-Heptahydrat (ZnSO ₄ *7 H ₂ O)	860 mg	Pyridoxin-Hcl	0,5 g
Natriummolybdänoxid-Dihydrat (NaMoO ₄ *2 H ₂ O)	25 mg	Mesoinositol	50,0 g
Kupfersulfat-Pentahydrat (CuSO ₄ *5 H ₂ O)	2,5 mg	Wasser	ad 500 ml
Kobaltchlorid-Hexahydrat (CoCl ₂ *6 H ₂ O)	2,5 mg		
Wasser	ad 100 ml		
Kaliumjodid-Stammlösung			
Kaliumjodid	750 mg		
Wasser	ad 1000 ml		
Murashige und Skoog Medium (MSOH), ohne Hormone ^{a)} – fest:			
Pro Liter Medium wurden 9 g Agar zugesetzt			

^{a)} Murashige, T. und Skoog, F. (1962). „A revised medium for rapid growth and bioassays with tobaccotissue cultures”. *Physiologia Plantarum* **15** (3): 473-497

Tab. 8.2 Sequenzen, Schmelztemperatur und Grad der Degeneriertheit der verwendeten Primer.

Primer		T _m	DNA-Sequenz
P1	forward, 144-fach degeneriert	54,4°C	5'-TTH YTD GGI TTY ACD TCI AAY CT-3'
P2	reverse, 128-fach degeneriert	59,8°C	5'-ATY TTI CCC CAN GAI AYN GCY TC-3'
P3	forward, 1536-fach degeneriert	55,9°C	5'-GAR GAR GAY YTN ATH AAR TGY YT-3'
P4	reverse, 1024-fach degeneriert	62,4°C	5'-GAY GAR GCN GTN WSN TGG GG-3'
P5	forward	60,5°C	5'-GGA AAG AAA TTA ATG ATG AAA GCT CGT ATT TA-3'
P6	forward	63,4°C	5'-GCG ATT TTT CGT TAC CAG GTT CTA TGC-3'
P7	forward	62,7°C	5'-ATA TAC ATA TGG GAG AAG ATA CCA GAG ATC-3'
P8	reverse	62,9°C	5'-ATG GAT CCT ATT GAT TGC CTG TGG AAT TTT T-3'
P9	forward	64,4°C	5'-CCT GGA GCT GCA TTA CGC TCA AAG-3'
P10	forward	66,5°C	5'-TTC CTT GAA GGG ATC TGT ACT GCG CTC-3'
P11	forward	58,9°C	5'-AAG ATG TTA GAA GAA CAA TTA TCT GAG AAT T-3'
P12	forward	64,4°C	5'-TTC ATT CTT TCC GCA ATC CTG CAA GTT TAA TC-3'
P13	forward (AAP)	80,9°C	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG-3'
P14	forward (AUAP)	63,5°C	5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3'
P15	reverse	57,3°C	5'-TCT GCA CCA TTG CGC ATC AT-3'
P16	reverse	67,9°C	5'-AAG CGC TCC GGT CTT CCT AGG ACT G-3'
P17	reverse	62,4°C	5'-CTA CAA TGT CAA TGA TTA GAC CAG GAT GA-3'
P18	reverse	74,9°C	5'-CCA TTG CGC ATC ATA TT-3'
P19	reverse	66,5°C	5'-GAC GGT CTG GAT TAT CTC CAG CTT CCT-3'
P20	reverse	65,1°C	5'-CCA TTC TTG TGT GCC CAG TAT AAG TAC G-3'
P21	reverse	65,3°C	5'-CCA GGG TAA CGA TCT GGA TTA TTT GGA TC-3'
P22	reverse	66,9°C	5'-GGG CAG AAG ACA GGA ATT TTG TTC TTG TAT GC-3'
P23	reverse	53,5°C	5'-GCA CAA TAT CAA TAA CTA AAC CA-3'
P24	reverse	62,2°C	5'-AGA ATG GAA GTA TAG CAT ATC CCC CAA T-3'
P25	reverse	63,4°C	5'-TCC TTC CCA AGG CGT GAA ATC ACT TTA-3'
P26	reverse	52,5°C	5'-TGA ACA ATA TCA ACG ATT AAA CTT-3'
P27	reverse	61,3°C	5'-GAA AGA ATG AAA GTA GAG CAT ATC TCC AAT-3'
P28	reverse	66,3°C	5'-CCT TCC CAA GGC GAG CGA TTA CTC T-3'
P29	reverse	66,0°C	5'-ATA TAC TCG AGT TGA TTG CCT GTG GAA TTT TTA-3'
P30	forward	64,7°C	5'-TAT ACA TAT GGG GGA AGC CAT TAA AGA TGA GAA T-3'
P31	reverse	65,3°C	5'-ATA CTC GAG ATG AAA TTT TAT AGC TTT AGT TGC AAA TGT C-3'
P32	forward	68,3°C	5'-TAT ACA TAT GGG AGA AGC CAC GAG AGA TCA GAA C-3'
P33	reverse	70,4°C	5'-TAT ACT CGA GTA GAG TGT CGG TGG ATT TTT TAG CTA TAG TTG C-3'
P34	forward	65,5°C	5'-TAT ACA TAT GGG AGA AGT CTT CAA TGG CGC T-3'

Fortsetzung Tab. 8.2

P35	reverse	68,3°C	5'-TAT ACT CGA GGT GCC TTT TAT TAG CCT TAG CTG C-3'
P36	forward	69,5°C	5'-ATA TAC TGC AGA TGG GTG AAG CCA TGA AGC AAA ACC T-3'
P37	reverse	70,6°C	5'-ATA CTC GAG GTC TTT GGC GGA ATC ATC CCT CTT TC-3'
P38	forward	71,7°C	5'-ATA TAC TGC AGA TGG GTG ACG ACG CAA TCA GGC AGA-3'
P39	reverse	66,4°C	5'-TAT ACT CGA GAT ATA TAT ACC CAA GAT ATT TTG TCC AGG T-3'
P40	forward	67,1°C	5'-TAT AAT TAA TAT GGG TGA CGA CGC AAT CAG GCA GA-3'
P41	reverse	63,4°C	5'-TAT AGA ATT CTT AAT ATA TAT ACC CAA GAT ATT TTG TCC AG-3'
P42	forward	62,7°C	5'-GGG ACA TTA CCT TAT GAT GTG TTT TCT CTT-
P43	reverse	63,9°C	5'-AGT GTG TTG TGT GCC ATA GAA GAC CAT TA-3'
P44	reverse	58,3°C	5'-TAA CTC TAT ATG TAT TCA CAT TGT TCA AAT TTA-3'
P45	forward 8fach degeneriert	60,5°C	5'-GGC RAA GCC ATC MAA ATT GTT AAY G-3'
P46	forward 32-fach degeneriert	63,9°C	5'-CAA AAT CTT YTT RGG STT CAC RTC MAA CC-3'
P47	reverse 8-fach degeneriert	57,9°C	5'-CRC CAT TKC GCA TCA TAT TSG-3'
P48	reverse 48-fach degeneriert	61,1°C	5'-AKD GGR AAW GCA ATK GTT GCA TCA C-3'

Für die degenerierten Primer P1-P4 und P45-P47 wurde der folgende Code verwendet:

D = A + G + T; **H** = A + T + C, **K** = G + T, **M** = A + C, **N** = A + T + C + G, **R** = A + G, **S** = C + G, **W** = A + T und **Y** = C + T, **I** = Inosin

LEBENS LAUF

Persönliche Daten Mag. Elisabeth Kaltenegger
Harmsstraße 54, 24114 Kiel
Geboren am 30.06.1976, Aspang
österreichische Staatsbürgerschaft

Bildungsweg

- 1990 – 1995 Höhere Technische Bundeslehr- und Versuchsanstalt Wiener Neustadt, Ausbildungszweig Hochbau
Abschluss: Hochschulreife (bestanden mit ausgezeichnetem Erfolg)
- 1995-2003 Studium der Biologie (Studienzweig Botanik) an der Universität Wien, Schwerpunkte: Ökologischen Biochemie und Pharmakognosie
- 2001-2003 Diplomarbeit im Forschungsbereich der ökologischen Biochemie, Abteilung Vergleichende und Ökologische Phytochemie
Thema: Phytochemische Vergleiche charakteristischer *Stemona*-Alkaloide und ihre insektizide Wirkung gegenüber *Spodoptera littoralis*
20. Feb. 2003 Diplomprüfung mit ausgezeichnetem Erfolg und Verleihung des akademischen Grades „Magistra der Naturwissenschaften“
- März 2005 Beginn der Doktorarbeit am Institut für Pharmazeutische Biologie an der Technischen Universität Braunschweig finanziert durch ein DOC-ffORTE Stipendium der Österreichischen Akademie der Wissenschaften
- Sept. 2005 Nach der Berufung des Doktorvaters nach Kiel Mitwirkung bei der Organisation des Laborumzugs und anschließende Fortführung der Doktorarbeit am Botanischen Institut der Christian-Albrechts Universität zu Kiel, Abteilung Biochemische Ökologie und Molekulare Evolution