### Evolution der enzymatischen und regulatorischen Eigenschaften der C<sub>4</sub>-Phospho*enol*pyruvat-Carboxylase im Genus *Flaveria*

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

> Vorgelegt von: Oliver Ernst Bläsing aus: Neuss

> > Düsseldorf 2001

Gedruckt mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. P. Westhoff

Koreferent: Prof. Dr. H. Strotmann

Tag der mündlichen Prüfung: 23. Januar 2002

### Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	1
	1.1. C <sub>4</sub> -Photosynthese versus C <sub>3</sub> -Photosynthese	1
	<b>1.2.</b> Polyphyletische Entstehung und Evolution der C <sub>4</sub> -Photosynthese	3
	1.3. Evolution der C <sub>4</sub> -spezifischen Gene und Proteine	4
	1.4. Die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase	4
	1.4.1. Das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxylase	5
	1.4.2. Expression der PEPCase in Pflanzen: ppc-Gene	6
	1.4.3. Die PEPCase als multifunktionelles Enzym in Pflanzen	8
	1.4.4. Kontrolle der Enzymaktivität	8
	1.4.5. Funktionale Proteindomänen der PEPCase	9
	1.5. Zielsetzung der Promotionsarbeit	11
2.	Material und Methoden	12
	2.1. Material	12
	2.1.1. Medien und Reagenzien für die Bakterien- und Phagenanzucht	12
	2.1.2. Enzyme und Reagenzien für die Molekularbiologie	12
	2.1.3. Enzyme und Reagenzien für die Proteinaufreinigung und -Charakterisierung	13
	2.1.4. Pflanzenmaterial	13
	2.1.5. Bakterienstämme	14
	2.1.6. Klonierungs- und Expressionsvektoren	14
	2.1.7. Bereitgestellte ppc-cDNA-Klone	15
	2.2. Molekularbiologische Methoden	15
	2.2.1. Allgemeine Techniken	15
	2.2.2. Sequenzierung von Plasmid-DNA	15
	2.2.3. Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	16
	2.2.4. Southern-Analyse von DNA	16
	2.2.5. Northern-Analyse von RNA	16
	2.2.6. DNA-Hybridisierung und Autoradiographie	17
	2.2.7. Gerichtete Mutagenese der Expressionsplasmide Ft966 und Fp966	17
	2.2.8. Klonierung von ppc-cDNA in den Expressionsvektor pTrc99A	19

2.2.8.1. Konstruktion der Expressionsplasmide Ft966-S und Fp966-S	19
2.2.8.2. Konstruktion der Expressionsplasmide chimärer ppcA-PEPCasen	21
2.2.8.3. Klonierung der Expressionsplasmide für die pppcA-PEPCasen aus F.	
brownii und F. pubescens	23
2.2.8.4. Expressionsplasmide für die ppcB- und ppcC-PEPCasen aus F.	
trinervia	24
2.2.9. PEPCase-Komplementationsanalyse als Klonierungskontrolle	24
2.2.10. Isolierung pflanzlicher Gesamt-RNA	25
2.2.11. PolyA <sup>+</sup> -mRNA-Isolierung	26
2.2.12. Herstellung von größenfraktionierten cDNA-Büchereien	26
2.2.13. Sichtung der Phagen-cDNA-Bücherei	27
2.2.14. In vivo-Exzision der cDNA-Phagemide	28
2.2.15. PCR-Analyse von Phagen und Bakterien	28
2.2.16. Schnelle Klonierung pflanzlicher ppc-cDNA über inverse cDNA-PCR	29
2.3 Biochemische Methoden	33
2.3.1. Aufreinigung rekombinanter PEPCase aus E. coli PCR1	33
2.3.1.1. Anzucht der Bakterien zur Überexpression rekombinanter PEPCase	33
2.3.1.2. Herstellung des Enzym-Rohextraktes und Proteinfällung mit	
Polyethylenglykol 8000	33
2.3.1.3. Hydrophobe Interaktionschromatographie	34
2.3.1.4. Anionenaustausch-Chromatographie	35
2.3.1.5. Gelfiltration	35
2.3.2. Enzymatische Tests für die PEPCase	36
2.3.2.1 Messung der PEPCase-Enzymaktivität	36
2.3.2.2. Substratsättigungskinetiken	36
2.3.2.3. Messung der Malatinhibierung – I <sub>0,5</sub> -Malat	37
2.3.3. Proteinbestimmung	38
2.3.4. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese	39
2.4. Rechnergestützte Analysen	39
2.4.1. Sequenzanalyse, Sequenzvergleich und Stammbaumanalyse	39
2.4.2. Erstellung phylogenetischer Bäume - Verwandtschaftsanalyse von	39
Aminosäuresequenzen	

2.4.3. Enzymkinetik-Analyse	40
2.5. Datenbankeinträge	41
3. Ergebnisse	42
3.1. Methodische Vorarbeiten	42
3.1.1. Klonierung der ppc-cDNA in den Expressionsvektor pTrc99A	42
3.1.2. Reinigung rekombinanter PEPCasen	43
3.1.3. Charakterisierung der Enzyme durch PEP-Substratkinetiken	45
3.2. Vergleich der PEPCasen aus F. trinervia und F. pringlei	47
3.2.1. Aminosäuresequenzvergleich der PEPCasen von F. trinervia und F. pringlei	49
3.2.2. Vergleich der Enzymparameter der ppcA-, ppcB- und ppcC-PEPCasen	50
3.2.2.1. Bestimmung der Enzymparameter bei pH 8	50
3.2.2.2. Bestimmung der Enzymparameter bei pH 7,6	52
3.2.2.3. Messung der Malathemmbarkeit	53
3.3. Identifizierung C <sub>4</sub> -spezifischer Enzymdeterminanten	54
3.3.1. Aminoterminale Austausche von FP966 (C <sub>3</sub> ) gegen FT966 (C <sub>4</sub> )	54
3.3.2. Carboxyterminale Austausche von FP966 (C <sub>3</sub> ) gegen FT966 (C <sub>4</sub> )	56
3.3.3. Welche Rolle spielt die Ser/Ala-Position 774 in Region 5?	58
3.3.4. Sind die Regionen 2 und 5 bzw. die Ser/Ala-Position in Region 5 wirklich die	
entscheidenen Determinanten für die C4- bzw. Nicht-C4-Spezifität der	61
Enzyme?	
3.4. Evolution der C <sub>4</sub> -PEPCase in <i>Flaveria</i> - C <sub>3</sub> -C <sub>4</sub> -intermediäre Arten	62
3.4.1. Einteilung von Flaveria-Arten durch Expressionsanalyse der ppcA-	62
Transkripte in Blättern	
3.4.2. Isolierung von ppcA-PEPCase-Sequenzen aus F. brownii und F. pubescens	63
3.4.3. Primärstruktur-Vergleich der ppcA-PEPCasen aus F. pringlei (C <sub>3</sub> ), F.	
<i>pubescens</i> ( $C_3$ - $C_4$ ) und <i>F. trinervia</i> ( $C_4$ )	65
3.5. Ansätze zu einer Phylogenie der C <sub>4</sub> -PEPCase der Gräser	68
3.5.1. Isolierung einer PEPCase des C <sub>4</sub> -Grases Chloris gayana	68

3.5.2. Aminosäuresequenzvergleich und Verwandtschaftsanalyse der C <sub>4</sub> -PEPCasen	69
3.5.3. Etablierung einer schnellen Klonierungsmethode für ppc-cDNA	71
3.5.3.1. Anwendung der inversen-cDNA-PCR auf P. antidotale und N. munroi	72
3.5.3.2. Analyse der klonierten cDNA-Enden aus P. antidotale und N. munroi	73
4. Diskussion	75
4.1. Evolution der PEPCase-Isoformen in <i>F. trinervia</i> (C <sub>4</sub> )	76
4.2. Determinanten spezifischer C <sub>4</sub> -Eigenschaften in der ppcA-PEPCase aus <i>F. trinervia</i>	79
4.3. Intermediäre ppcA-PEPCasen in Flaveria - F. brownii und F. pubescens	83
4.4. Evolution der PEPCase im Kontext der globalen Evolution der C <sub>4</sub> -	
Photosynthese	85
5. Zusammenfassung	90
6. Literatur	91
7. Anhang	100
A: ppcA-cDNA-Klone von Flaveria brownii und Flaveria pubescens	100
B: ppc-cDNA-Klon aus <i>Chloris guyana</i>	104
C: ppc-cDNA-Klone der inversen cDNA-PCR aus Neurachne munroi und	
Panicum antidotale	106

### Abkürzungen

A, a	
Aminosäuren	

Adenosin

Aminosäuren			
	Ein-Buchstaben	Bezeichnung	Drei-Buchstaben Code
	Code		
	А	Alanin	Ala
	С	Cystein	Cys
	D	Asparaginsäure	Asp
	E	Glutaminsäure	Glu
	F	Phenylalanin	Phe
	G	Glycin	Gly
	Н	Histidin	His
	Ι	Isoleucin	Ile
	Κ	Lysin	Lys
	L	Leucin	Leu
	Μ	Methionin	Met
	Ν	Asparagin	Asn
	Р	Prolin	Pro
	Q	Glutamin	Gln
	R	Arginin	Arg
	S	Serin	Ser
	Т	Threonin	Thr
	V	Valin	Val
	W	Tryptophan	Trp
	Y	Tyrosin	Tyr
ΔTP	Adenosin-5'-ti	rinhosnhat	
RSA	englisch: bovi	ne serum albumin	e Rinderserum-Albumin
Bn	Rasennaare		
Dp C c	Cytosin		
C- c-	Carboxy-		
cDNA	englisch: com	lementary DNA	
$CO_2$	Kohlenstoffdic	oxid	
CAM	englisch: crass	ulacean acid met	abolism
dATP	Desoxyadenos	intriphosphat	
DNA	NA englisch: deoxyribonucleic acid. DNS		
DNS	DNS Desoxyribonukleinsäure (-n)		
DTT	Dithiothreitol		
EC	englisch: enzy	me comission, Ki	irzel der Enzymnomenklatı

- EC Ethylendiamintetraessigsäure EDTA
- englisch: fast performance liquid chromatography, schnelle **FPLC** Flüssigkeitschromatographie

G, g Guanosin

- Erdbeschleunigung, 9,8 m x s<sup>-2</sup>
- g G-6-P D-Glukose-6-Phosphat
- Inhibierung der Enzymaktivität um 50 %  $I_{0,5}$
- Kilodalton, 10<sup>3</sup> Dalton kDa
- K<sub>m</sub> Michaelis-Menten-Konstante

ähnlich $K_m$ : Substratkonzentration bei der Reaktionsgeschwindigkeit $v = 1/2$
X V <sub>max</sub>
β-D-Isopropylthiogalactosid
englisch: Luria Broth
Stoffmenge in Mol
Milligramm, 10 <sup>-3</sup> Gramm
Minute(-n)
Millimolar, 10 <sup>-3</sup> Molar
Mikrogramm, 10 <sup>-6</sup> Gramm
Mikromolar, 10 <sup>-6</sup> Molar
englisch: messenger RNA, Boten-RNA
Amino-
Nicotinsäureamidadenindinukleotid, reduziert
Nicotinsäureamidadenindinukleotidphosphat, reduziert
englisch: polymerase chain reaction, Polymerase-Kettenreaktion
Phenylmethylsulfonylfluorid
Polyethylenglykol
Phospho <i>enol</i> pyruvat
Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
englisch: Starter, Leitfaden
Raumtemperatur
englisch: ribonucleic acid, RNS
Ribonukleinsäure
englisch: sodium dodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat
Sekunden
Stunden
Thymidin
Umdrehungen pro Minute
Volt
Reaktionsgeschwindigkeit, V <sub>max</sub> : maximale Reaktionsgeschwindigkeit
englisch: weight per volume, Gewicht pro Volumen
englisch: volume per volume, Volumen pro Volumen

#### 1. Einleitung

#### 1.1. C<sub>4</sub>-Photosynthese versus C<sub>3</sub>-Photosynthese

Pflanzen, die das Phänomen der C<sub>4</sub>-Photosynthese aufweisen, unterscheiden sich gegenüber den meisten Pflanzen mit überwiegend konventioneller C3-Photosynthese (C3-Pflanzen) durch eine Erweiterung, dem C<sub>4</sub>-Dicarbonsäure-Stoffwechselzyklus. In der C<sub>3</sub>-Photosynthese stellt 3-Phosphoglycerat das erste greifbare Produkt der primären Fixierung von Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>) dar. Es stammt aus der Carboxylierungsreaktion des Enzyms Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RUBISCO). CO<sub>2</sub> und Ribulose-1,5-bisphosphat werden zu einem labilen Zwischenprodukt verbunden, das in zwei 3-Phosphoglycerat-Moleküle zerfällt. Im sogenannten C<sub>4</sub>-Zyklus treten dagegen die C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren L-Malat und L-Aspartat als die ersten stabilen nachweisbaren Produkte der primären Fixierung von CO2 auf (HATCH & SLACK 1966). Das Enzym RUBISCO katalysiert aber auch die zur Carboxylierung mechanistisch unvermeidbar konkurrierende Oxygenierung von Ribulose-1,5-bisphosphat. Dabei entsteht aus Sauerstoff (O<sub>2</sub>) und Ribulose-1,5-bisphosphat je ein Molekül 3-Phosphoglycerat und 2-Phosphoglykolat. Aus Letzterem wird in einem zyklischen Stoffwechselweg, unter Energieverbrauch und Abspaltung von CO<sub>2</sub>, wieder 3-Phosphoglycerat generiert (OGREN 1984). Die C<sub>4</sub>-Pflanzen unterdrücken diese sogenannte Lichtatmung (Photorespiration), indem sie das Verhältnis von O2 zu CO2 im Substratangebot der RUBISCO stark zugunsten von CO<sub>2</sub> verändern.

In der Evolution der C<sub>4</sub>-Pflanzen wurden Veränderungen in der Blattanatomie, Biochemie und Ultrastruktur bestimmter Zellen etabliert, um die CO<sub>2</sub>-Konzentration am Wirkort der RUBISCO zu erhöhen und folglich die Oxygenase-Aktivität zu unterdrücken. Blätter der C<sub>4</sub>-Pflanzen weisen eine Kranzanatomie auf und differenzieren zwei Arten morphologisch und funktional unterschiedlicher Zelltypen aus, eng benachbarte Mesophyll- und Bündelscheidenzellen (HABERLAND 1904, LANGDALE & NELSON 1991). Die Mesophyllzellen liegen der Blattepidermis, die Bündelscheidenzellen den Gefäß-Leitbündeln zugewandt. Zuerst wird in den Mesophyllzellen atmosphärisches CO<sub>2</sub> als Hydrogencarbonat (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) durch die Phospho*enol*pyruvat-Carboxylase (PEPCase) fixiert. Dieses Enzym ist ein Schlüsselenzym der C<sub>4</sub>-Photosynthese, da es sauerstoffunabhängig ist und die Substrate Phosphoenolpyruvat (PEP) und Hydrogencarbonat effektiv bindet. Die im Mesophyll gebildeten Sekundärprodukte, die C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren L-Malat und L-Aspartat, gelangen durch vielzählige Plasmodesmata in die Bündelscheidenzellen und werden dort decarboxyliert (HATCH 1987). Das freigesetzte CO<sub>2</sub> gelangt wie bei der C<sub>3</sub>-Photosynthese in den Calvin-Zyklus der Bündelscheidenzellen-Chloroplasten, ist jedoch stärker

konzentriert (**Abbildung 1**). Der C<sub>4</sub>-Zyklus arbeitet somit als  $CO_2$ -Pumpe. In der Energiebilanz verbraucht die C<sub>4</sub>-Photosynthese wegen der Regeneration von PEP durch das Enzym Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase (PPDK) zwei ATP mehr als die C<sub>3</sub>-Photosynthese.



Abbildung 1: Vereinfachtes Schema zur Fixierung von  $CO_2$  im  $C_4$ -Zyklus nach HATCH (1987). Die Mesophyllzelle sorgt für die Fixierung von atmosphärischem  $CO_2$  (in Form von Hydrogencarbonat) an PEP. Aus dem Produkt Oxalacetat werden die  $C_4$ -Dicarbonsäuren L-Malat und L-Aspartat gebildet. Diese gelangen über Plasmodesmata in die Bündelscheidenzelle. Dort werden sie zu  $CO_2$  und Pyruvat oder PEP ([C<sub>3</sub>]) decarboxyliert. Das freie  $CO_2$  wird in den Chloroplasten der Bündelscheidenzellen durch den Calvin-Zyklus refixiert und zu Kohlenhydraten (Zucker) reduziert. Pyruvat und L-Alanin gelangen in die Mesophyllzellen zurück. Der "CO<sub>2</sub>"-Akzeptor PEP wird aus den Bündelscheidenzellen in die Mesophyllzellen zuückgeführt oder dort aus Pyruvat regeneriert.

Man kennt drei Variationen der C<sub>4</sub>-Photosynthese, die nach den decarboxylierenden Enzymen in den Bündelscheidenzellen benannt sind (GUTIERREZ 1974, HATCH 1987). Das primäre Carboxylierungsprodukt Oxalacetat wird in den Mesophyllzellen entweder zu L-Malat reduziert oder zu L-Aspartat transaminiert und in die Bündelscheidenzellen überführt. Beim *NADP-Malatenzym-Typ* wird Malat im Bündelscheidenzellen-Chloroplast decarboxyliert und das gebildete Pyruvat in die Mesophyllzellen zurück transportiert. Beim *NAD-Malatenzym-Typ* wird im Bündelscheidenzellen-Mitochondrium Aspartat in Malat umgewandelt und decarboxyliert. Das entstandene Pyruvat gelangt nach Umwandlung zu L-Alanin in die Mesophyllzellen zurück. Beim *PEP-Carboxykinase-Typ* wird L-Aspartat im Bündelscheidenzellen-Cytosol zu Oxalacetat umgewandelt und decarboxyliert. Das entstandene PEP sowie von Pyruvat stammendes Alanin werden in die Mesophyllzellen zurückgeführt. Bei allen Varianten regeneriert die plastidäre Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase (PPDK) des Mesophylls unter ATP-Verbrauch den CO<sub>2</sub>-Akzeptor PEP aus Pyruvat. Bei dem *NADP-Malatenzym-Typ* der C<sub>4</sub>-Photosynthese sind die Bündelscheiden-Chloroplasten im Vergleich zu den Mesophyll-Chloroplasten in ihrer Photosystem II-Aktivität reduziert und setzen fast kein O<sub>2</sub> frei, das die Oxygenase-Reaktion der RUBISCO unterstützen könnte. Ein Teil der in den Bündelscheidenzellen fehlenden Reduktionsäquivalente kann bei der Decarboxylierung von Malat freigesetzt werden.

Pflanzen mit C<sub>4</sub>-Photosynthese spielen ihre Vorteile gegenüber C<sub>3</sub>-Pflanzen besonders in heißen, trockenen und sonnenreichen Klimaten aus, in denen es an Wasser und nicht an Sonnenenergie mangelt. Für den Gasaustausch müssen die Stomata nicht weit geöffnet sein, der Wasserverlust durch Transpiration ist gering. Die temperaturabhängige, bei Wärme höhere Photorespirationsrate wird gleichzeitig unterdrückt, da die RUBISCO der C<sub>4</sub>-Pflanzen mit CO<sub>2</sub> gesättigt wird. Der Unterschied der CO<sub>2</sub>-Konzentration zwischen Mesophyll- und Bündelscheidenzellen liegt um den Faktor 10 - 20 (EHLERINGER ET AL. 1991, HATCH 1992). Bei Lichtsättigung und genügend hoher Wasserversorgung können C<sub>4</sub>-Pflanzen im Vergleich zu C<sub>3</sub>-Pflanzen ihre Stomata weiter öffnen, und sie erzielen hohe Nettophotosyntheseraten.

#### **1.2.** Polyphyletische Entstehung und Evolution der C<sub>4</sub>-Photosynthese

Innerhalb der Angiospermen findet man mindestens 18 von über 400, zum Teil nur entfernt verwandten, Pflanzenfamilien, die das Spektrum der drei Variationen der C<sub>4</sub>-Photosynthese abdecken (EHLERINGER ET AL. 1997). Dies deutet auf die mehrfache unabhängige (polyphyletische) Entstehung der C<sub>4</sub>-Photosynthese hin (MONSON & MOORE 1989). 16 C<sub>4</sub>-Familien gehören zu den *Dicotyledonae*, von denen zwei dominieren: die *Amaranthaceae* mit 10 und die *Chenopodiaceae* mit 33 C<sub>4</sub>-Gattungen. Bei den *Monocotyledonae* dominieren die Sauergräser (*Cyperaceae*) mit 11 C<sub>4</sub>-Gattungen und die Süßgräser (*Poaceae*) mit mind. 15 C<sub>4</sub>-Gattungen in drei Unterfamilien (*Arundinoideae*, *Chloridoideae* und *Panicoideae*). Es wird geschätzt, daß ca. 50 % der Gräser C<sub>4</sub>-Spezies sind (HATTERSLEY 1987). In die Gras-Gruppe der *Panicoideae* befinden sich wichtige Kulturpflanzen, wie z.B. *Zea* (Mais), *Saccharum* (Zuckerrohr) und *Sorghum* (Mohren-Hirse), die alle zum *NADP-ME-Typ* der C<sub>4</sub>-Pflanzen gehören.

Der Selektionsdruck, der die Entwicklung der C<sub>4</sub>-Photosynthese ermöglicht hat, beruhte möglicherweise auf dem schnellen Abfall der atmosphärischen CO<sub>2</sub>-Konzentration vor über 50 Millionen Jahren auf einen dem heutigen entsprechenden Wert. Der CO<sub>2</sub>-Mangel förderte die Entwicklung der C<sub>4</sub>-Photosynthese zunächst in warmen, später in kühleren Ökosystemen (HATCH

1992, EHLERINGER 1997). C<sub>4</sub>-Gräser treten in heißen tropischen und subtropischen Regionen auf. Das Vorkommen dikotyler C<sub>4</sub>-Pflanzen korreliert dagegen mit der hohen Aridität, d.h. mit hoher Temperatur und gleichzeitiger Trockenheit (EHLERINGER ET AL. 1997).

Noch heute gibt es mindestens 20 monokotylen und dikotylen Gattungen, die neben reinen  $C_3$ und  $C_4$ -Pflanzen, anatomisch oder biochemisch  $C_3$ - $C_4$ -intermediäre Pflanzen aufweisen, z.B. in den Gattungen *Flaveria (Asteraceae), Atriplex (Amaranthaceae), Moricandia (Brassicaceae), Parthenium* und *Panicum (Poaceae)* (KU ET AL. 1983, 1991). Die an der C<sub>4</sub>-Photosynthese beteiligten Enzyme treten zudem in reinen C<sub>3</sub>-Pflanzen auf (EHLERINGER ET AL. 1991, BAUWE & CHOLLET 1986, HATCH 1987).

#### 1.3. Evolution der C<sub>4</sub>-spezifischen Gene und Proteine

Die an der Biochemie des C<sub>4</sub>-Zyklus beteiligten Enzyme entstammen dem Satz der schon vorhandenen "C<sub>3</sub>"-Enzyme. Sie mußten während der Evolution der C<sub>4</sub>-Pflanzen an neue Erfordernisse angepaßt werden (HATCH 1987). Die Anpassung erfolgte auf zwei Ebenen: auf der genetischen Ebene entwickelte sich die organ- und zellspezifische, differentielle Genexpression. Dazu wurden die regulatorischen Bereiche (Promotoren) der Gene verändert. Auf der Proteinebene mußten die kinetischen und regulatorischen Eigenschaften der Enzyme den veränderten Metabolitspiegeln angepaßt werden. Dazu wurden die proteinkodierenden Bereiche der Gene verändert. Der Erhalt der Funktion der C<sub>3</sub>-Enzyme wurde mit der Verwendung von Genkopien gesichert, die anstelle des Ur-C<sub>3</sub>-Gens verändert wurden. Bisher untersuchte Beispiele für die Evolution von C<sub>4</sub>-Genen stellen die Carboanhydrase, die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPCase) und die Pyruvat-Orthophosphat-Dikinase dar (KU ET AL. 1996). In welcher Reihenfolge die Mechanismen der Anpassung auftraten, ist bisher ungeklärt.

#### 1.4. Die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase

Am Beispiel der PEPCase, des Schlüsselenzyms der C<sub>4</sub>-Photosynthese, werden die Anpassungen der Gene und der Proteine zur Zeit intensiv in der Gattung *Flaveria* auf molekularer Ebene untersucht (HERMANS & WESTHOFF 1990). *Flaveria* gehört der Familie der *Asteraceeae* an und weist, neben C<sub>3</sub>-Pflanzen und C<sub>4</sub>-Pflanzen des NADP-Malatenzym-Typs, eine besonders große Vielfalt an C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-Zwischenformen aufweist (POWELL 1978, KU ET AL. 1983, BAUWE & CHOLLET 1986). Das legt den Verdacht nahe, daß in einigen Arten dieser Gattung die Evolution zur C<sub>4</sub>-Photosynthese noch nicht abgeschlossen ist. Die Gattung *Flaveria* stellt daher ein besonders geeignetes Versuchsmaterial für Studien zur molekularen Evolution der C<sub>4</sub>-Gene dar. Die Analyse von PEPCasen aus unterschiedlich weit entwickelten C<sub>4</sub>-Arten einer Gattung wie *Flaveria* bietet die einzige Möglichkeit, Entwicklungsstufen der PEPCase auf dem Weg zu C<sub>4</sub>-Enzymeigenschaften abzufangen.

#### 1.4.1. Das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxylase

Das Enzym Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPCase) wurde 1953 von Bandurski und Greiner entdeckt (BANDURSKI & GREINER 1953). Das Enzym kommt sowohl im Cytosol pflanzlicher Zellen als auch in Bakterien vor, fehlt aber in Tieren und Pilzen (O'LEARY 1982, CHOLLET ET AL. 1996). Kein Nachweis von PEPCase-Aktivität konnte für marine Diatomeen und Dinoflagellaten erbracht werden. Eine für C<sub>3</sub>-Pflanzen erstaunlich hohe Enzymaktivität findet man im thermogenen Gewebe der *Araceae* (LATZKO & KELLY 1983).



Abbildung 2: Enzymatische Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat durch die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase nach CHOLLET ET AL . (1996). Die Phosphatgruppe von Phosphoenolpyruvat (PEP) wird zuerst auf Hydrogencarbonat übertragen. Es entsteht enzymgebundenes Kohlendioxid (CO<sub>2</sub>-Enz.) und ein Enolat-Anion. Das CO<sub>2</sub> wird in der enzymatischen Reaktion auf das  $\beta$ -C-Atom des Enolats übertragen, wobei Hydrogenphosphat und Oxalacetat freigesetzt werden (grauer Kasten). Im Falle der Übertragung von Wasser auf das Enolat wird in einer Konkurrenzreaktion stattdessen Pyruvat und CO<sub>2</sub> freigesetzt (weißer Kasten). Das aktive Enzym besteht aus einem Homotetramer mit einem Molekulargewicht von ca. 400 KDa (ANDREO ET AL. 1987). In der Enzymreaktion werden die Substrate Phosphoenolpyruvat (PEP) und Hydrogencarbonat zu Oxalacetat und Orthophosphat umgesetzt. Eine C-C-Verknüpfung entsteht am  $\beta$ -C-Atom von PEP (**Abbildung 2**). Für die Ausbildung der enzymatischen Aktivität muß ein divalentes Kation, vornehmlich Magnesium (Mg<sup>2+</sup>), als Kofaktor anwesend sein (BANDURSKI 1955). Durch die Klassifizierung der Enzymkommission gehört die PEPCase (EC-Nummer: 4.1.1.31) als Orthophosphat:Oxalacetat-Carboxy-Lyase zu der Untergruppe der Carboxy-Lyasen der Kohlenstoff-Kohlenstoff-Lyasen, obwohl die Carboxylierung von PEP mit einem  $\Delta G^0$ -Wert von –29 kJ/mol (25° C) stark exergonisch und damit irreversibel ist (VENNESLAND ET AL. 1954).

Der katalytische Mechanismus der PEPCase ist im Detail nicht bekannt. Doch geht man davon aus, daß im ersten Schritt Orthophosphat von PEP auf Hydrogencarbonat übertragen wird und Carboxyphosphat sowie die Enolat-Form von Pyruvat gebildet wird (**Abbildung 2**). Dazu binden das zweiwertige Kation  $Mg^{2+}$ , PEP und Hydrogencarbonat in der genannten Reihenfolge an das Enzym. Das Enolat wird durch  $Mg^{2+}$  stabilisiert, welches Enolat-Sauerstoff, Carboxyl-Sauerstoff und ein Phosphat-Sauerstoff komplexiert. Carboxyphosphat wird zu enzymgebundenem CO<sub>2</sub> und Phosphat umgebaut. Das CO<sub>2</sub> reagiert anschließend irreversibel mit dem  $\beta$ -C-Atom des Enolats zu Oxalacetat. Zuletzt werden Oxalacetat und Orthophosphat entlassen (CHOLLET ET AL 1996).

#### 1.4.2. Expression der PEPCase in Pflanzen: ppc-Gene

Höhere Pflanzen enthalten mehrere PEPCase-Isoformen, die das Produkt von Genfamilien darstellen. In den monokotylen C<sub>4</sub>-Pflanzen *Sorghum bicolor* (Mohrenhirse), *Zea mays* (Mais) und in C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-Pflanzen der dikotylen Gattung *Flaveria* kennt man mehrere Gene, die mindestens drei Klassen einer ppc-Genfamilie zugeordnet werden können (HERMANS & WESTHOFF 1990/1992, SCHÄFFNER & SHEEN 1992, LEPINIEC ET AL. 1993). Die C<sub>4</sub>-Form der PEPCase in *Zea* und *Sorghum* wird von einem einzigen Gen gebildet und spezifisch in Blattmesophyllzellen exprimiert. Darüber hinaus treten PEPCasen ohne photosynthetische Funktion auf. Ihre spezifische Rolle im Metabolismus und die zeitliche bzw. räumliche bevorzugte Expression innerhalb der verschiedenen Gewebe der Pflanzenorgane ist bisher unverstanden. Die Klonierung der PEPCase aus cDNA-Büchereien für Wurzeln und die Transkriptanalyse für diese Isoform läßt auf die bevorzugte Expression des verantwortlichen Gens im Wurzelgewebe schließen (KAWAMURA ET AL. 1990, DONG ET AL. 1998).

Im dikotylen Genus *Flaveria* unterscheidet man anhand von Kreuzhybridisierungsexperimenten mit genomischer DNA vier Genklassen, ppcA bis ppcD, innerhalb der C<sub>3</sub>-Pflanze *Flaveria pringlei* und der C<sub>4</sub>-Pflanze *F. trinervia* (HERMANS & WESTHOFF 1990). Die Sequenzanalysen der Gene und Kreuzhybridisierungsexperimente bestätigen für die ppcA-Klasse von *F. trinervia* und *F. pringlei* eine höhere Ähnlichkeit als zu den anderen Klassen innerhalb einer Pflanze selbst. Daher kann man für jede Genklasse einen gemeinsamen Vorläufer in einem gemeinsamen Vorfahr von *F. trinervia* und *F. pringlei* annehmen (Orthologie, siehe **Abbildung 3**).



Abbildung 3: Evolution orthologer ppc-Genklassen in der Gattung *Flaveria*. Für die C<sub>3</sub>-Pflanze *F. pringlei* und die C<sub>4</sub>-Pflanze *F. trinervia* wird ein gemeinsamer Vorfahr mit C<sub>3</sub>-Photosynthese (gelb) angenommen. Dieser enthielt bereits alle Genklassen (kursiv), wie sie heute in der C<sub>3</sub>- und der C<sub>4</sub>-Pflanze existieren. Die C<sub>4</sub>-PEPCase entwickelte sich nach dem letzten gemeinsamen Vorfahr der modernen C<sub>4</sub>-Pflanze (grün) und wird von der ppcA-Genklasse (fett) gebildet. Die ppcD-Genklasse wird durch ein inaktives Pseudogen (\*) gebildet. Nach HERMANS & WESTHOFF (1990).

Die ppcA-Klasse in *F. trinervia* (C<sub>4</sub>) wird blattspezifisch und stark in den Mesophyllzellen exprimiert. Sie kodiert das C<sub>4</sub>-Enzym. Die orthologe ppcA-Klasse in *F. pringlei* (C<sub>3</sub>) wird dagegen nur schwach in allen Pflanzenorganen exprimiert. Die ppcB- und ppcC-Gene in *F. trinervia* werden relativ gleichmäßig in den Blättern, im Sproß und in den Wurzeln exprimiert. Dort findet man in *F. pringlei* ebenfalls ppcB- und ppcC-Transkripte, aber besonders große Mengen für die ppcC-Transkripte in Wurzeln und nur geringe Mengen in den Blättern (ERNST & WESTHOFF 1997). Reportergenkonstrukte mit den 5'-ppcB-Promotorsequenzen aus *F. trinervia* und *F. pringlei* in Tabak (C<sub>3</sub>) zeigten eine Präferenz für das Wurzel- und das Phloemgewebe (ERNST & WESTHOFF 1997). Die Klasse ppcD stellt eventuell ein Pseudogen dar, für das bisher keine Expression nachgewiesen werden konnte.

#### 1.4.3. Die PEPCase als multifunktionelles Enzym in Pflanzen

Die PEPCase der Pflanzen tritt als vielfältiges Enzym mit mindestes 11 beschriebenen Funktionen auf (LATZKO & KELLY 1983). In C<sub>4</sub>-Pflanzen stellt die PEPCase bekanntlich das Schlüsselenzym des Photosynthese-Metabolismus dar (HATCH 1992). Dies gilt auch für CAM-Pflanzen ("Crassulacean Acid Metabolism"), die eine Variante des C<sub>4</sub>-Dicarbonsäurezyklus zur nächtlichen Fixierung von CO<sub>2</sub> nutzen. Die nichtphotosynthetischen PEPCase-Isoformen der C<sub>4</sub>- und C<sub>3</sub>-Pflanzen sorgen wahrscheinlich gewebe- und zellkompartimentspezifisch für die Wiederauffüllung des Zitronensäurezyklus mit C<sub>4</sub>-Dicarbonsäuren, für die Bildung von NADPH aus NADH, für die Bereitstellung von Substraten der symbiotischen Stickstoffixierung und der Assimilation von Ammoniumionen. Weitere Funktionen liegen in der Fixierung des respiratorischen CO<sub>2</sub>, der Kontrolle der photonastischen Spaltöffnungsbewegung, der Kontrolle des intrazellulären pH-Wertes und des Ionengleichgewichtes (LATZKO & KELLY 1983).

#### 1.4.4. Kontrolle der Enzymaktivität

Die Enzymaktivität pflanzlicher PEPCasen wird hauptsächlich durch Metaboliten (z. B. Glukose-6-Phosphat (G-6-P), Glycin, L-Malat und Aspartat) und über die lichtabhängige posttranslationale Modifikation am N-Terminus durch eine Serin-Kinase bestimmt. Die Faktoren pH, Ionenstärke und Temperatur beeinflussen ebenfalls die Enzymatik der PEPCase. Glukose-6-Phosphat (G-6-P), Fruktose-6-Phosphat und Triosephosphate wirken als allosterische Aktivatoren für C<sub>4</sub>-PEPCasen (TING & OSMOND 1973, UEDAN & SUGIYAMA 1976, DONCASTER & LEEGOOD 1987). Diese Metaboliten erniedrigen  $K_m$ -PEP, aber erhöhen die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $v_{max}$ ) nur geringfügig. Die Aminosäure Glycin stellt für C<sub>4</sub>-PEPCasen monokotyler Pflanzen einen Aktivator dar, der nur v<sub>max</sub> betrifft und nicht bei PEPCasen dikotyler Pflanzen wirkt (O'LEARY 1982, WEDDING ET AL. 1989, RAJAGOPALAN ET AL. 1994). L-Malat, L-Aspartat und Citrat treten als Folgeprodukte der PEPCase-Reaktion auf und stellen kompetitive und allosterische Inhibitoren ("feedback-Inhibitoren") dar. Ihre Wirkung hängt von dem pH und der Phosphorylierung des aminoterminalen Serins ab (WEDDING ET AL. 1990, DUFF ET AL. 1995). G-6-P erhöht die Inhibitor-Bindekonstante (K<sub>i</sub>-Malat) der monokotylen C<sub>4</sub>-PEPCasen und schützt sie so vor der Inaktivierung (ANDREO ET AL. 1987, DONG ET AL. 1998). Die Enzymaktivität wird damit über ein Gleichgewicht von Malat und G-6-P pH-abhängig reguliert (ECHEVARRIA ET AL. 1994). Eine pH-Regulation der Enzymparameter wurde bisher in vitro gezeigt. Für die Enzyme verschiedener

Pflanzen liegt die maximale Enzymaktivität und Substrataffinität bei pH 8 in einem Optimum (TING & OSMOND 1973, ANDREO 1987).

Die regulatorische Phosphorylierung/Dephosphorylierung eines Serins am N-Terminus der PEPCase moduliert die Effekte von Malat und G-6-P (RAJAGOPALAN ET AL. 1994, VIDAL & CHOLLET 1997, NIMMO 2000). Das phosphorylierte Enzym ist weniger sensitiv gegenüber Malatinhibierung und sensitiver für G-6-P-Aktivierung (NIMMO ET AL. 1987, DUFF ET AL. 1995). Der synergistische Effekt von mehreren Aktivatoren und die aminoterminale Phosphorylierung verhindert effektiv die Inhibierung der C4-PEPCase durch hohe cytosolische Malatkonzentrationen (GAO & WOO 1996). Die Phosphorylierung wird durch eine spezifische PEPCase-Kinase in C<sub>3</sub>-, C<sub>4</sub>- und CAM-Pflanzen ausgeführt, welche die Konsensussequenz (Lys/Arg-X-X-Ser-Ile-Asp-Ala-Gln) erkennt (JIAO & CHOLLET 1989, 1991). Die PEPCase-Kinase wurde erstmals aus der CAM-Pflanze Kalanchoë feldtschenkoi molekular charakterisiert. Sie stellt eine kleine, monomere, kalziumunabhängige Serin/Threonin-Kinase dar, deren Aktivität durch Synthese und Abbau reguliert wird (HARTWELL ET AL. 1999). Weitere Gensequenzen für homologe Kinasen kennt man für Mesembryanthemum crystallinum (CAM) und Arabidopsis thaliana (C<sub>3</sub>) (TAIBY ET AL. 2000, NIMMO 2000). Die Molekulargewichte der Kinase liegen um 31 KDa. Die Dephosphorylierung des Serins durch eine PEPCase-Phosphatase wird einer Typ 2A Proteinphosphatase (PP2A) zugeschrieben (CARTER ET AL. 1990).

#### 1.4.5. Funktionale Proteindomänen der PEPCase

Bisher wurden anhand des Vergleichs der Aminosäuresequenzen aller bekannten PEPCasen stark konservierte Sequenzmotive und Aminosäuren gefunden, die mit der Katalyse und der Regulation der Enzymaktivität in Zusammenhang gebracht werden. Sie wurden durch chemische Modifizierung und Punktmutagenese analysiert (RAJAGOALAN ET AL. 1994, GAO & WOO 1995/1996, YANO & IZUI 1997, DONG ET AL. 1997). Das katalytische Zentrum und die beteiligten Aminosäuren sind nicht genau bekannt, da bisher keine Kristallstruktur einer PEPCase mit dem komplexierten Substrat PEP oder einem Substratanalogon existiert. Die Kristallisierung des bakteriellen Enzyms aus *Echerischia coli* mit dem allosterischen Inhibitor L-Aspartat führte zum ersten Strukturmodell und zur Identifizierung von vier inhibitorbindenden Aminosäuren (KAI ET AL. 1999). **Abbildung 4** zeigt das Enzymmonomer. Es umfaßt acht  $\beta$ -Faltblätter, die eine Faßstruktur bilden und von  $\alpha$ -Helices umgeben sind. Das Zentrum der Katalyse wurde anhand dieser Struktur am Carboxyterminus der  $\beta$ -Faßstruktur vorausgesagt. Zwei flexible, glycinreiche Aminosäure-Schlaufen spielen wahrscheinlich für den katalytischen Mechanismus eine Rolle. Eine der Schlaufen enthält ein Arginin587, das mit drei anderen Aminosäuren des Carboxyterminus (Lys773, Arg832 und Asn881) den Inhibitor (L-Aspartat) bindet. Die weitere Kristallisierung der *E. coli*-PEPCase mit  $Mn^{2+}$  wies auf weitere Aminosäuren für die Bindung eines divalenten Kations (Glu506 und Asp543) und für die Substratbindung (Arg396, Arg581 und Arg713) hin (MATSUMURA ET AL. 1999).



Abbildung 4: Struktur der PEPCase aus *E. coli* nach KAI ET AL. (1999). Die Faßstruktur der  $\beta$ -Faltblätter (grün) und die  $\alpha$ -Helices (rot) des Enzymmonomers sind räumlich dargestellt. Der Aminoterminus (N) und der in der Struktur eingebettete Carboxyterminus (C) sind angezeigt. Der Inhibitor L-Aspartat (gelb) ist als Molekül strukturiert wiedergegeben. Die Abbildung wurde mit Swiss-PDB-Viewer (*http://www.expasy.ch*) aus den Daten der kristallisierten *E. coli*-PEPCase (Nr. 1FIY in der PDB-Datenbank: http://www.rcsb.org/pdb/; BERMAN ET AL. 2000) erstellt.

#### 1.5. Zielsetzung der Promotionsarbeit

In der Dissertationsarbeit sollten Erkenntnisse zur molekularen Evolution spezifischer Enzymeigenschaften der C<sub>4</sub>-PEPCase aus der dikotylen C<sub>4</sub>-Pflanze *Flaveria trinervia* (*Asteraceae*) gewonnen werden. Im Zentrum standen folgende drei Fragestellungen:

# a) Welche der nichtphotosynthetischen ( $C_3$ ) PEPCasen stellen die Ausgangsformen für die Evolution der $C_4$ -Isoform dar?

Um diese Frage zu beantworten sollten die Sequenzinformationen der ppcA-, ppcB- und ppcC-PEPCasen aus *F. trinervia* (C<sub>4</sub>) und *F. pringlei* (C<sub>3</sub>) miteinander verglichen und die Enzyme in eine Verwandtschaftsbeziehung gestellt werden. Die anschließende Charakterisierung der isolierten rekombinanten Enzyme sollte die Entwicklung spezifischer Eigenschaften der C<sub>4</sub>-PEPCase sichtbar werden lassen.

# b) Lassen sich spezifische Eigenschaften der C<sub>4</sub>-PEPCase bestimmten Sequenzbereichen (Determinanten) des Proteins zuordnen ?

Dazu sollte die C<sub>4</sub>-ppcA-PEPCase aus *F. trinervia* mit der nächstverwandten nichtphotosynthetischen Isoform molekular gekreuzt und chimäre rekombinante Enzyme hergestellt werden. Die Eigenschaften der Enzymchimären sollten eine quantitative und qualitative Zuordnung der C<sub>4</sub>-Determinanten zu einzelnen Proteinregionen ermöglichen, die im Detail durch Punktmutagenese einzelner Aminosäuren vervollständigt werden sollte.

#### c) In welchen Schritten wurde die Evolution des $C_3$ -Enzyms zum $C_4$ -Enzym vollzogen ?

Zunächst sollten die PEPCasen  $C_3$ - $C_4$ -intermediärer *Flaveria*-Arten isoliert werden, die der orthologe Genklasse der  $C_4$ -PEPCase aus *F. trinervia* angehören.  $C_4$ -Determinanten sollten mit der Sequenzanalyse erfaßt werden. Eine anschließende Enzymcharakterisierung sollte Besonderheiten der Primärsequenz dem enzymatischen Entwicklungszustand und damit den erworbenen  $C_4$ -spezifischen Eigenschaften zuordnen.

#### *d)* Wie entwickelte sich die C<sub>4</sub>-PEPCase der monokotylen Gräser ?

Ansatzweise sollten die Erkenntnisse zur Evolution der PEPCasen nah verwandter C<sub>4</sub>-Gräser aus der Gras-Unterfamilie *Panicoideae* durch die Isolierung und die Sequenzanalyse einer C<sub>4</sub>-PEPCase der entfernter verwandten Gras-Unterfamilie *Chloridoideae* erweitert werden.

#### 2. Material und Methoden

#### 2.1. Material

Alle Pufferreagenzien und Salze waren von p.A.-Qualität und wurden von folgenden Firmen bezogen: Baker (Deventer, Niederlande), BioMol (Frankfurt), Janssen (Beerse, Belgien), Merck (Darmstadt), Riedel de Haen (Seelze), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (München). Im Folgenden ist eine Aufstellung von besonderen Reagenzien mit ihren Bezugsquellen tabellarisch aufgeführt.

2.1.1. Medien und Reagenzien für die Bakterien- und Phagenanzucht

Agar-Agar	Serva (Heidelberg)
Bactotrypton	Gibco BRL – Life Technologies (Eggenstein)
NZ-Amin	Difco (Detroit, USA)
Hefe-Extrakt	Gibco BRL – Life Technologies (Eggenstein)
Isopropyl-1-thio-β-D-galaktopyranosid (IPTG)	Roche Diagnostics/Boehringer (Mannheim)
5-Bromo-4-Chloro-3-indolyl-β-D-galactopyranosid (X-Gal)	Roche Diagnostics/Boehringer (Mannheim)
Antibiotika: Ampicillin, Kanamycin, Streptomycin, Tetracyclin	Serva (Heidelberg)

#### 2.1.2. Enzyme und Reagenzien für die Molekularbiologie

DNA modifiziernende Enzyme wurden von Appligene (Heidelberg), MBI Fermentas (Vilnius, Littauen), Roche Diagnostics/Boehringer (Mannheim) und Stratagene (USA) bezogen. Folgende zusätzlichen Enzyme und Reagenzien wurden genutzt:

#### a) Nukleinsäure-Polymerisation und -Modifizierung

rATP, Adenosin-Ribonukleotid	Roche Diagnostics/Boehringer (Mannheim)
Advantage cDNA-Polymerase Mix	Clontech (Palo Alto, USA)
Desoxyribonukleoside (dNTPs)	Roche Diagnostics/Boehringer (Mannheim)
Ribonuklease (RNAse) A	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Superscript II Reverse-Transkriptase	Gibco BRL – Life Technologies (Eggenstein)
Taq-DNA-Polymerase aus Thermus aquaticus	eigene Aufreinigung
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics/Boehringer (Mannheim)
T7-Polynukleotid-Kinase	Roche Diagnostics/Boehringer (Mannheim)

b) Trennung, Sequenzierung und Nachweis von Nukleinsäuren  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dATP,  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP Amersham Pha Agarose Gibco BRL – L

Amersham Pharmacia Biotech (Braunschweig) Gibco BRL – Life Technologies (Eggenstein)

#### Material und Methoden

Ethidiumbromid	Serva (Heidelberg)
Chromatographiepapier (GB002)	Schleicher und Schüll (Dassel)
Membran Nitrozellulose 0,45 µm	Schleicher und Schüll (Dassel)
Membran Hybond-N, Hybond-N $^+$	Amersham Pharmacia Biotech(Freiburg)
Phage $\lambda$ -DNA (Molekulargewicht-Standard)	MBI-Fermentas (Vilnius, Littauen)
Röntgenfilme:	
Wicor-X-RP (Blue Sensitive)	CEA (Schweden)
Kodak X-OMAT AR (XAR 5)	Sigma-Aldrich (Steinheim)
Tenebrio molitor Käferlarven-DNA	eigene Aufreinigung, aus Zoohandlung

#### c) Fertigbausätze (Kits) zur Aufreinigung, Prozessierung und Modifizierung von DNA

Chameleon Double-Stranded, Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene (USA)
Jetsorb-Kit	Genomed (Bad Oeynhausen)
Qiaex II-Kit	Qiagen (Hilden)
Megaprime DNA Labelling Kit, Nr. RPN1605	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
Oligotex-dT-Suspension	Qiagen (Hilden)
T7-Polymerase-Sequenzierungskit	Amersham-Pharmacia (Freiburg)
SMART cDNA Library Construction Kit	Clontech (Palo Alto, USA)
ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit	Stratagene (USA)

#### 2.1.3. Enzyme und Reagenzien für die Proteinaufreinigung und -Charakterisierung

a) Proteinaufreinigung	
MonoQ HR 5/5, Source Q	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
PEG 8000	Sigma (München)
Phenylsepharose CL-4B	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)
PMSF	Sigma (München)
Superdex 200 HR	Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg)

#### b) spektoskopische Tests auf PEP-Carboxylase Enzymaktivität

L-Malat	Sigma (München)
NADH	Sigma (München)
NADH-Malate-Dehydrogenase (aus Schweineherzen)	Sigma (München)
Na <sub>3</sub> PEP	ICN (Eschwege)

#### 2.1.4. Pflanzenmaterial

Das Pflanzenmaterial für die Nukleinsäuregewinnung waren Blattspreiten der Spezies *Flaveria* brownii und *Flaveria pubescens* bzw. *Chloris gayana*. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus auf Erde herangezogen und waren zum Erntezeitpunkt ca. 2 Monate alt. *F. brownii* wurde tagsüber

zusätzlich künstlich beleuchtet. Die Blattspreiten wurden direkt in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zum Gebrauch gelagert.

#### 2.1.5. Bakterienstämme

Die folgenden Bakterienstämme wurden für die Vermehrung von Plasmid-DNA und die Expression rekombinanter PEPCasen verwendet (**Tabelle 1**).

Stamm	Genotyp				
E. coli PCR1	Genotyp F <sup>-</sup> , recA1, arg, leu, thr, thi, rpsL, ppc2				
(Streptomycin-Resistenz)	Dient der Expression transgener PEPCase (SABE ET AL. 1984). Dieser				
	Bakterienstamm besitzt endA1-Nukleaseaktivität, die bei einer Plasmidisolierung				
	über Phenolisierung inaktiviert werden muß.				
<i>E. coli</i> GM2163	F <sup>-</sup> , ara- 14, leuB6, thi-1, fhuA31, lacY1, tsx-78, galK2,galT22, supE44, hisG4, rpsL 136 (Str <sup>r</sup> ), xyl-5, mtl-1, dam13::Tn9 (Cam <sup>r</sup> ), dcm-6, mcrB1, hsdR2 ( $r_{\rm K}^-$ m <sub>K</sub> <sup>+</sup> ), mcrA); (New England Biolabs, Schwalbach)				
E.coli XlmutS Kan <sup>r</sup>	Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 gyrA96 relA1 lac				
(Kanmycin-Resistenz)	mutS:: Tn10 (Tet <sup>r</sup> ) [F' proAB lacl <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15 Tn5 (Kan <sup>r</sup> )]; (Stratagene, USA)				
E. coli XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacl <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15				
(Tetracyclin-Resistenz)	Tn10 (Tet <sup>r</sup> )]; (Stratagene, USA)				
<i>E. coli</i> SOLR <sup>TM</sup>	e14 <sup>-</sup> (MCRA-) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 sbcC recB recJ uvrC umuC::Tn5(kan <sup>r</sup> )				
(Kanmycin-Resistenz)	lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 $\lambda^{R}$ [F' proAB lacl <sup>q</sup> Z $\Delta$ M15] Su <sup>-</sup> ; (Stratagene, USA)				
E. coli XL1-Blue MRF'	$\Delta$ (mcrA)183 $\Delta$ (mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96				
(Tetracyclin-Resistenz)	relA1 lac [F' proAB lacl <sup>q</sup> ZΔM15 Tn10 (Tet <sup>r</sup> )] ; (Stratagene, USA)				

Tabelle 1: Eigensc	haften und Que	ellen der genutzten	Bakterienstämme.
--------------------	----------------	---------------------	------------------

#### 2.1.6. Klonierungs- und Expressionsvektoren

Folgende Plasmide wurden als Klonierungs- und Expressionsvektoren eingesetzt:

pBluescript I SK(-)	Standardklonierungsvektoren mit Ampicillin-Resistenz zur cDNA-Klonierung und
pBluescript II KS(+)	-Manipulation (Stratagene, USA)
pTrc99A	Prokaryotischer Expressionsvektor (GenBank Nr. U13872, AMAN ET AL. 1988,
-	Amersham-Pharmacia, Freiburg)

#### 2.1.7. Bereitgestellte ppc-cDNA-Klone

Folgende Plasmide enthalten ppc-cDNA und wurden für die Klonierung von ppc-Expressionsplasmiden verwendet:

pcFtppcA-1 (pcFtppc1.1)	ppcA-cDNA aus Flaveria trinervia als EcoRI-Fragment in der multiplen			
	Klonierungsstelle des Plasmids pBluescript II KS+ (POETSCH ET AL. 1991)			
pcFpppcA-1	ppcA-cDNA, als EcoRI-XhoI-Fragment in der multiplen Klonierungsstelle des			
	Plasmids pBluescript I SK-, von einer Blatt cDNA-Bücherei aus Flaveria pringlei.			
	(SVENSSON ET AL. 1997)			

#### 2.2. Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1. Allgemeine Techniken

Grundlegende molekularbiologische Verfahren wie die Vermehrung von Bakterien, die Isolierung, Klonierung, Restriktion, Ligation und Phosphorylierung von Plasmid-DNA und DNA-Primern, wurden nach SAMBROOK ET AL. (1989) durchgeführt. Gewöhnlich wurde Plasmid-DNA über die Koch-Lyse isoliert (HOLMES & QUIGLEY 1981). Hochwertige superhelikale Plasmid-DNA wurde mit Jetstar-Säulen (Genomed, Bad Oeynhausen) gereinigt. Die analytische und quantitative Trennung von DNA-Fragmenten wurde durch Elektropherographie im TBE-Agarosegel (1 x TBE: 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 1 mM EDTA; pH 8,3) + 0,5  $\mu$ g/mL Ethidiumbromid durchgeführt (SAMBROOK ET AL. 1989). Die Elution von DNA-Fragmenten aus TBE-Agarosegelen wurde nach Anleitung des Herstellers mit dem *Qiaex II Kit* (Qiagen, Hilden) oder dem *Jetsorb Kit* (Genomed, Bad Oeynhausen) ausgeführt. Als DNA-Längenstandard (142 Bp-Leiter) diente DNA des Mehlwurms (*Tenebrio molitor*), die mit EcoRI partiell verdaut wurde (GITELMAN 1997). Medien und Lösungen wurden durch Autoklavieren (121°C, 20 Min.) oder Filtrieren mit Spritzenvorsatzfiltern (0,22  $\mu$ m Porengröße) sterilisiert. Glasgefäße zur Isolierung von RNA wurden vor Gebrauch 5 – 6 Std. bei ca. 180°C erhitzt.

#### 2.2.2. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde der *T7-Polymerase Kit* nach Anleitung des Herstellers verwendet (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg), der nach der Kettenabbruch-Methode mit Didesoxy-NTPs arbeitet (SANGER 1977). Pro Reaktion wurden 1-2 µg DNA, 2 pmol Oligonukleotid (Primer) und ca. 5-10 µCi an radioaktivem  $\alpha^{32}$ P-dATP eingesetzt. Radioaktiv markierte, einzelsträngige DNA-Fragmente wurden unter denaturierenden Bedingungen (48% Harnstoff) auf 0,2 mm dicken in 4- oder 6-prozentigen Polyacrylamidgelen in einer Sequenzieraparatur (Model S2, Life Technologies, Karlsruhe) aufgetrennt. Mit der Autoradiographie wurden die radioaktiv markierten DNA Fragmente auf Röntgenfilm (*X-OMAT AR XAR-5* bzw. *Wicor-X RP blue sensitiv*, siehe Abschnitt 2.1.2.) sichtbar gemacht.

#### 2.2.3. Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

DNA-Hybridisierungssonden wurden nach Anleitung des Herstellers mit dem *Megaprime DNA Labelling Kit* (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) unter Verwendung von  $\alpha^{32}$ P-dATP und Zufallsprimern hergestellt (FEINBERG & VOGELSTEIN 1983). Im reduzierten 1/3-Ansatz wurden pro Reaktion 25-50 ng DNA und 15 µCi  $\alpha^{32}$ P-dATP eingesetzt.

#### 2.2.4. Southern-Analyse von DNA

Plasmid-DNA wurde mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen gespalten und im Agarose-Gel (1xTBE) elektrophoretisch getrennt. Das Gel wurde 2 x 15 Min. in alkalischer Lösung (400 mM NaOH, 600 mM NaCl) inkubiert und die denaturierte DNA über kapillare Saugströmung mit Phosphatpuffer (25 mM Natriumphosphat; pH 6,5) auf eine Hybond N<sup>+</sup>-Nylonmembran transferiert (SOUTHERN 1975). Nach dem Transfer wurde die Membran in 2xSSC-Puffer (30 mM Natriumcitrat, 300 mM NaCl; pH 7,4) gewaschen, getrocknet und die DNA durch Backen (2 Std., 80°C) fixiert. Die gesuchte DNA auf der Membran wurde mit radioaktiv markierten DNA-Sonden hybridisiert und durch Autoradiographie nachgewiesen.

#### 2.2.5. Northern-Analyse von RNA

10 µg Gesamt-RNA wurde zur Auflösung von Sekundärstrukturen in 20 µL Glyoxylierungspuffer (6 % (w/v) Glyoxal, 47,5 % (v/v) DMSO und MOPS-Puffer: 25mM MOPS/NaOH, 6,25 mM Natriumacetat, 1,25 mM EDTA; pH 7,0) 45 Minuten bei 50°C denaturiert, mit 5 µL Probenauftragspuffer (90 % (v/v) Formamid, 10 mM EDTA pH 7,5, 0,01 (w/v) Bromphenolblau, 0,01 % (w/v) Xylencyanol) versetzt. Anschließend wurde die RNA im Agarose-Gel (1,2 % (w/v) Agarose) mit MOPS-Puffer (20 mM MOPS/NaOH, 5 mM Natriumacetat, 1 mM EDTA; pH 7,0) elektrophoretisch getrennt (MACMASTER & CARMICHAEL 1977). Die größengetrennte RNA wurde über kapillare Saugströmung mit 20xSSC-Puffer (3 M NaCl, 330 mM Natriumcitrat; pH 7,0) 18 – 20 Stunden auf eine Hybond N-Nylonmembran (Amersham Life Sciences) transferiert (THOMAS 1980). Nach dem Transfer wurde die Membran getrocknet und die RNA durch Bestrahlung mit UV-Licht (300 J m<sup>-2</sup>; UV-Bestrahlungsgerät: UV-Crosslinker; Amersham Life Sciences, Freiburg) an der Membran fixiert (KHANDJIAN 1986). Für den Nachweis radioaktiv markierter ppc-Transkripte wurde die membrangebundene RNA mit der Sonde für 18 Std. bei 60°C hybridisiert. Anschließend wurden unspezifisch bindende Sondenmoleküle durch Waschungen (3 x 20 Min. mit 0,5 x SSC, 0,5 % (w/v) SDS; 2 x 20 Min. mit 0,3 x SSC, 0,5 % (w/v) SDS) entfernt und die an ppc-Transkripte gebundene Sonde durch Autoradiographie (über Nacht) nachgewiesen.

#### 2.2.6. DNA-Hybridisierung und Autoradiographie

Der Nachweis von filtergebundener Nukleinsäuren erfolgte nach CHURCH & GILBERT (1984). Membranen mit Nukleinsäure wurden in 50 mL Hybridisierungspuffer (250 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 7 % (w/v) SDS, 2,5 mM EDTA; pH 7,2) bei der gewählten Hybridisierungstemperatur zunächst ca. eine Stunde inkubiert. Die Lösung wurde anschließend durch 5 mL vorgewärmten Hybridisierungspuffer ersetzt und die hitzedenaturierte Sonde (siehe Sondenmarkierung) zugefügt. Sonden mit hoher Sequenzidentität wurden bei 64°C, und Sonden mit geringer Sequenzidentität bei 56°C mit der Ziel-DNA hybridisiert (über Nacht). Nach der Entfernung der Hybridisierungslösung wurden die Membranen mit Waschlösungen behandelt, um unspezifisch gebundene und ungebundene Sonden-DNA zu entfernen. Die Waschungen dauerten 20 - 40Minuten bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur (1. Waschung: 1 x SSC, 1 % (w/v) SDS; 2. und 3. Waschung: 0,5 x SSC, 0,5 % (w/v) SDS; 4. und 5. Waschung 0,1 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS). 1 x SSC enthielt 150 mM NaCl und 15 mM Natriumcitrat; pH 7,0). Die noch feuchten Membranen wurden in dünne Haushaltsfolie eingeschlagen und auf einem Röntgenfilm in einer Metallkassette mit Verstärkerfolie (Cronex Quanta III, DuPont Instruments, Bad Homburg) bei – 80°C exponiert. Die Expositionsdauer wurde der Strahlungsintensität der Proben angepaßt (8 - 18 Std.).

#### 2.2.7. Gerichtete Mutagenese der Expressionsplasmide Ft966 und Fp966

Gerichtete Mutationen wurden nach Herstellerangaben mit dem *Chameleon Double-Stranded*, *Site-Directed Mutagenesis Kit* (Stratagene, USA) eingeführt. Dieses Verfahren ist bei Plasmid-DNA ohne Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen angebracht, die für eine PCR gestützte Mutagenese nicht zugänglich sind. Für die Methode werden jeweils ein Mutageneseprimer und Selektionsprimer benötigt, die an ihrem 5'-Ende phosphoryliert sind. Sie hybridisieren mit dem selben DNA-Strang und werden mit der T7-Polymerase verlängert. Die 3'-OH-Enden der verlängerten Primer werden in einer Ligation mit dem 5'-Ende des nächsten Primers verknüpft, der auf dem selben Strang sitzt. Der Mutageneseprimer lagert sich an den komplementären Strang des zu mutagenisierenden Plasmids an und führt die gewünschte Nukleotidsubstitution in dem neu synthetisierten DNA-Strang ein. Der Selektionsprimer führt eine Mutation ein, die die Erkennungstelle einer einzigen Restriktionsendonuklease (hier PstI) zerstört.



Abbildung 5: Prinzip der Punktmutagenese von Doppelstrang-Plasmid-DNA. Der Mutageneseprimer (Pfeil mit Punkt) führt die Mutation in die Zielsequenz (graue Kästen) ein. Der Selektionsprimer (Pfeil mit Kreuz) wandelt die singuläre PstI-Schnittstelle in eine SacI-Schnittstelle um. Die mutierten DNA-Stränge sind fett dargestellt, die unveränderten DNA-Stränge als gestrichelte Linie. Die Grafik wurde aus dem Handbuch des "*Chameleon Double-Stranded, Site-Directed Mutagenesis Kit"* (Stratagene, USA) übernommen und modifiziert.

Die Neusynthese eines ringförmigen DNA-Stranges mit zwei Punktmutationen führt zu hybriden Plasmiden. Anschließend werden die Plasmide durch Restriktion mit PstI geschnitten. Die hybriden Plasmide bleiben intakt und werden bei der folgenden Transformation in den *E. coli*-Stamm Xl*mutS* (Stratagene, USA) effizient überführt. Xl*mutS* ist in der DNA-Reaparatur defekt. Daher segregieren die Stränge der hybriden Plasmide während der Vermehrung in Xl*mutS* zu eigenen Plasmiden. Aus den Bakterien wird dann die Gesamt-Plasmid-DNA isoliert und wieder mit PstI verdaut, um nichtmutierte DNA zu zerschneiden. Bei einer erneuten Transformation in den *E. coli*-Stamm XL1 Blue (Stratagene) werden wieder nur die mutierten Plasmide mit superhelikaler Struktur übertragen. Das Prinzip der Mutagenese ist in **Abbildung 5** schematisch dargestellt. **Tabelle 2: Sequenzen der zur gerichteten Mutagenese verwendeten Primer.** Die mutierten Basen sind fett und die betroffenen Aminosäuren oberhalb der Sequenz dargestellt. Die Primer wurden für die Mutageneseprozedur am 5'-Ende phosphoryliert, um eine Ligation mit den 3'-OH-Enden der verlängerten Primer zu gewährleisten.

Primer	Sequenz
Selektion	SacI
T99PSTSAC	5'-pCCT CTA GAG TCG AC <b>G AGC TC</b> G CAT GCA AGC TTG G-3'-OH
Mutagenese	Ser
A774SPPCA	5'-pCCA TGG ATC TTT <b>T</b> CA TGG ACT CAG ACC-3'-OH
Mutagenese	Ala
S774APPCA	5'-pCCA TGG ATC TTT <b>G</b> CA TGG ACT CAG ACC-3'-OH

Für die Mutagenese des Serin774 in FT966 zu Alanin774 wurde pcFtppcA-T32 (Ft966) mit dem Mutageneseprimer A774SPPCA behandelt. Im reziproken Ansatz wurde für die Mutagenese des Alanin774 in FP966 die ppcA-cDNA pcFtppcA-T87 (Fp966) von *F. pringlei* mit dem Primer S774APPCA mutagenisiert. Als universaler Selektionsprimer diente T99PSTSAC, der in der multiplen Klonierungsstelle des Expressionsvektors pTrc99A die singuläre Schnittstelle PstI zu SacI konvertiert (**Tabelle 2**). Die DNA der mutagenisierten Expressionsplasmide wurde aus *E. coli* XL1-Blue isoliert und die erfolgreiche Mutagenese durch Restriktions- und Sequenzanalyse bestätigt. Die erhaltenen Plasmide wurden Ft966-S774A und Fp966-A774S genannt.

#### 2.2.8. Klonierung von ppc-cDNA in den Expressionsvektor pTrc99A

Für die Expression pflanzlicher ppc-cDNA im Bakterienstamm *E. coli* PCR1 wurde der Vektor pTrc99A (GenBank Nr. U13872, AMAN ET AL. 1988) verwendet. pTrc99A bietet einen starken trc-Promotor im 5'-Bereich der multiplen Klonierungsstelle (MCS), eine acht Basen vor dem Startcodon gelegene Ribosomenbindestelle und den starken *rrnB*-Transkriptionsterminator hinter der MCS. Der *trc*-Promotor wird mit IPTG induziert. Die erste Schnittstelle der MCS (NcoI) ermöglicht das Einfügen von Genen mit eigenem ATG-Startcodon.

#### 2.2.8.1. Konstruktion der Expressionsplasmide Ft966-S und Fp966-S

Die cDNAs der ppcA-PEPCase aus *F. trinervia* und *F. pringlei* lagen in dem Expressionsvektor pTrc99A (Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) als Konstrukte pcFtppcA-T32 (Ft966) und pcFpppcA-T87 (Fp966) vor (SVENSSON ET AL. 1997, BLÄSING 1995).



Abbildung 6: Karten der ppcA-Expressionsplasmide Fp966 und Ft966 und der modifizierten Abkömmlinge Fp966S und Ft966S. Der Anteil des Expressionsvektors pTrc99A ist als schwarzer Teilkreis, die Anteile der klonierten ppcA-cDNA aus *F. pringlei* (C<sub>4</sub>) gelb und aus *F. trinervia* (C<sub>3</sub>) grün dargestellt. Die Zählung der Basen geht von der ersten Base des ATG-Startcodons für die ppc-cDNA aus. Die PEPCase kodierende Sequenz der cDNA ist dick gedruckt. Die Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen sind maßstabsgetreu mit ihren Schnittpositionen aufgeführt. Die Schnittstellen für die Klonierung chimärer PEPCasen sind fett und kursiv dargestellt. Die meisten Schnittstellen der MCS in den Plasmiden Fp966 und Ft966 fehlen in Fp966-S und Ft966-S.

**Abbildung 6** zeigt die Restriktionskarten der Expressionsplasmide Fp966 und Ft966 mit den wichtigsten Restriktionsschnittstellen. Um die Konstruktion der chimären PEPCasen zu erleichtern, mußten den Expressionsvektoren Ft966 und Fp966 überflüssige Restriktionsschnittstellen der multiplen Klonierungsstelle (MCS) im 3'-Bereich der cDNA entfernt und eine singuläre SacI-Schnittstelle eingefügt werden. Die Prozedur ist in **Abbildung 7** schematisch dargestellt.



Abbildung 7: Verkürzung der multiplen Klonierungsstelle (MCS) in den Expressionsplasmiden Ft966 und Fp966. Die Schnittstellen der MCS sind mit ihren Namen in der Reihenfolge ihres Auftretens in der MCS aufgeführt. KpnI (fett und kursiv) markiert den ursprünglich verwendeten Schnitt, der für die Subklonierung der ppc-cDNA in den Expressionsvektor pTrc99A gebraucht wurde. Der Großteil der Schnittstellen wurde zwischen dem Klonierungsschnitt am 3'-Ende der cDNA und der PstI-Schnittstelle des Vektor herausgeschnitten. Ein synthetischer Linker ersetzt diesen Bereich durch eine singuläre SacI-Schnittstelle.

Für die Verkürzung wurde das Plasmid Fp966 mit XhoI linearisiert und mit PstI ein Großteil der MCS abgespalten. Die Fragmentenden wurden mit dem Klenow-Fragment der *E. coli*-DNA-Polymerase I aufgefüllt bzw. geglättet und ein SacI-Linker (Sequenz: pCGAGCTCG) über eine Ligation eingefügt. Plasmid Ft966 wurde mit EcoRI und PstI gespalten und der gleiche SacI-Linker eingefügt. Die modifizierten Konstrukte Fp966-S und Ft966-S sind ebenfalls in Abbildung 6 mit den wichtigsten Schnittstellen dargestellt.

#### 2.2.8.2. Konstruktion der Expressionsplasmide chimärer ppcA-PEPCasen

Zur Konstruktion der chimären PEPCasen mußten gleichlange Proteinfragmente aus den ppcA-PEPCasen gegeneinander ausgetauscht werden. Auf DNA-Ebene wurden dazu singuläre Restriktionsschnittstellen in beiden Sequenzen der ppcA-cDNA untersucht und als natürliche Grenzen für die Enzymfragmente nutzbar gemacht. Ein Problem stellten die singulären Schnittstellen in der cDNA dar, die mehrfach im Expressionsvektor pTrc99A vorkommen und keine gerichtete Fragmentligation erlauben. Daher wurden weitere singuläre Schnittstellen im Expressionsplasmid verwendet, die die problematischen zusätzlichen Schnittstellen umgehen. Dies führte zu Ligationen mit drei Fragmenten. Die Prozedur ist in **Abbildung 8** veranschaulicht.



**Abbildung 8: Konstruktion chimärerer ppcA-PEPCasen aus Expressionsplasmiden.** Anhand der Restriktionsschnittstellen (A, B und C) wird im Verdau aus Expressionsplasmiden ein Satz Plasmidfragmente definierter Größe erzeugt (siehe auch **Abbildung 6**). Dabei werden proteinkodierende Bereiche (gelb: C<sub>4</sub>; grün: C<sub>3</sub>) zerteilt. Das A-C-Fragment muß durch einen separaten Verdau gewonnen werden, da Restriktionsenzym B das A-C-Fragment zerteilt. Nach dem Austausch eines proteinkodierenden Fragments gegen das äquivalente Fragment aus dem Fremdplasmid werden alle neu erzeugten Fragmentsätze durch Ligation zu chimären Plasmiden (Chimäre 1 und Chimäre 2) zusammengesetzt. Dabei bleiben die genutzten Schnittstellen erhalten.

Die Fragmente aus Ft966, Ft966-S, Fp966 und Fp966-S wurden mit einer geeigneten Kombination von Restriktionsendonukleasen ausgeschnitten und in einer Ligation rekombiniert. Die Unterteilung der cDNA wurde mit den Schnittstellen für AocI, SalI, RcaI und ApaI durchgeführt. Da RcaI und ApaI die Vektor-DNA schneiden, wurden zusätzliche singuläre Schnittstellen (BcII, NarI) in pTrc99A für die Klonierung genutzt und Tripel-Ligationen durchgeführt (siehe Prinzip in **Abbildung 8**). Um Plasmid-DNA mit BcII zu schneiden, mußte sie im *E. coli*–Stamm GM2163 vermehrt werden, der DNA nicht methyliert.

In **Tabelle 3** sind alle Plasmidkonstrukte für die Expression der chimären PEPCasen und deren Fragmente für die Ligation aufgeführt. Die Prüfung der erfolgreichen Konstruktion chimärer PEPCasen fand durch DNA-Spaltungsanalysen und z.T. durch Sequenzierungen der Fragmentgrenzen statt. Zusätzlich wurde eine Komplementationsanalyse nach der Transformation der Konstrukte in *E. coli*-PCR1 (ppc<sup>-</sup>) auf Selektionsmedium durchgeführt (SABE ET AL. 1984).

Tabelle 3: Klonierung chimärer PEPCasen aus den Expressionsvektoren Fp966 (ppcA,  $C_3$ ) und Ft966 (ppcA,  $C_4$ ). Angegeben sind die klonierten chimären Expressionsvektoren mit den zur Ligation benutzten Vektorfragmenten. Die Abfolge der Schnittstellen an den Fragmentenden ist in Bezug auf das Startcodon der PEPCase-cDNA in der Orientierung von 5'- zum 3'-Ende dargestellt. In Klammern ist die Herkunft aus den entsprechend genutzten Vektoren angegeben.

Expressionsplasmid	Fragmente der Ligation					
	Fragment I	Bp	Fragment II	Вр	Fragment III	Вр
Fp296Ft670	Aoc I-Pst I (Ft966)	2323	Pst I-Aoc I (Fp966)	5061	-	-
Ft296Fp670	Aoc I-Pst I (Fp966)	2299	Pst I-Aoc I (Ft966)	5016	-	-
Fp437Ft529	Sal I-SacI (Ft966-S)	1830	SacI-Sal I (Fp966-S)	5443	-	-
Ft437Fp529	Sal I-SacI (Fp966-S)	1839	SacI-Sal I (Ft966-S)	5443	-	-
Fp591Ft375	SacI-Bcl I (Ft966-S)	3139	Bcl I-Rca I (Fp966)	2795	Rca I-SacI (Ft966-S)	1369
Ft591Fp375	SacI-Bcl I (Fp966-S)	3139	Bcl I-Rca I (Ft966)	2795	Rca I-SacI (Fp966-S)	1378
Fp645Ft321	Apa I-SacI (Ft966-S)	1207	SacI-Nar I (Ft966-S)	3735	Nar I-Apa I (Fp966)	2331
Ft645Fp321	Apa I-SacI (Fp966-S)	1216	SacI-Nar I (Fp966-S)	3735	Nar I-Apa I (Ft966)	2331
Ft966-S774A	Bcl I-Rca I (Ft966)	2795	Rca I-SacI (Ft966-S774A)	1438	SacI-Bcl I (Ft966-S)	3139
Fp966-A774S	Bcl I-Rca I (Fp966)	2795	Rca I-SacI (Fp966-A774S)	1414	SacI-Bcl I (Ft966-S)	3139
Fp645Ft321-S774A	Aoc I-Apa I (Fp966)	1047	Apa I-Age I (Ft966-S774A)	959	Age I-Aoc I (Fp966)	5309
Ft645Fp321-A774S	Aoc I-Apa I (Ft966)	1047	Apa I-Age I (Fp966-A774S)	959	Age I-Aoc I (Ft966)	5333

# 2.2.8.3. Konstruktion der Expressionsplasmide für die ppcA-PEPCasen aus F. brownii und F. pubescens

Die ppc-cDNA der Klone pcFbppcA-1 und pcFpubppcA-1 wurde für die Expression in *E. coli* PCR1 in den Expressionsvektor pTrc99A wie folgt inseriert: pTrc99A wurde mit NcoI und KpnI geschnitten. Die NcoI-Schnittstelle beherbergt das ATG-Startcodon. Die cDNA der Klone pcFbppcA-1 und pcFpubppcA-1 wurde mit PvuI und KpnI aus den Klonierungsvektoren geschnitten, da NcoI nicht das ATG-Startcodon schneidet aber mehrfach in den cDNAs vorkommt. Zwischen dem Startcodon und dem PvuI-Schnitt liegen 35 Basen. In der folgenden Ligation wurden das Vektorfragment, das cDNA-Fragment und ein synthetischer Linker, der die ersten 35 Basenpaare ersetzt, verbunden. Als Linker dienten zwei phosphorylierte Oligonukleotide, die als Doppelstrang-DNA die Schnittenden für NcoI und PvuI bilden. Die Linker-Oligonukleotide für Fb966 waren FB-NP36 (5'-pC ATG GCT AAC AAG AAT GTG GAG AAA TTA GCA TCG AT-3') und FB-PN30 (5'-pCGA TGC TAA TTT CTC CAC ATT CTT GTT AGC-3'). Bei FPUB966 wurden die Oligonukleotide FPUB-NP36 (5'-pC ATG GCT

AAC AGG AAT TTG GAG AAA TTA GCA TCG AT-3') und FPUBPN30 (5'-pCGA TGC TAA TTT CTC CAA ATT CCT GTT AGC-3') verwendet. **Abbildung 9** verdeutlicht den Zusammenschluß der drei Fragmente zu vollständigen ppc-Expressionsplasmiden.



Abbildung 9: Schema zur Klonierung der Expressionsvektoren Fb966 und Fpub966. Das cDNA-Fragment (ppccDNA) und der synthetische Linker (L) bilden den proteinkodierenden Bereich (graue Kästen) des Expressionskonstrukts. Die Sequenzen des Expressionsvektors pTrc99A sind mit dem Promotor, der Ribosomenbindestelle (RBS) und der multiplen Klonierungsstelle (MCS) dargestellt. Die Restriktionsschnittstellen der Fragmentenden sind durch ihre Namen gekennzeichnet. NcoI und KpnI sind Schnittstellen in pTrc99A.

#### 2.2.8.4. Expressionsplasmide für die ppcB- und ppcC-PEPCasen aus F. trinervia

Die Klonierung der cDNA der ppcB- und ppcC-PEPCasen aus *F. trinervia* in den Expressionsvektor pTrc99A wurde in Analogie zu den vorhergehenden Expressionsklonierungen durchgeführt. Für die Klonierung des Expressionsplasmids Ft965B wurde die ppcB-cDNA aus dem cDNA-Klon pcFtppcB1 mit PvuI und KpnI geschnitten und mit einem ppcB-Linker in den mit NcoI und KpnI geschnittenen Vektor pTrc99A eingesetzt. Der ppcB-Linker bestand aus den Oligonukleotiden PPCBNP36 (5'-pC ATG GCT AAT CGG AAT TTG GAG AAA TTG GCA TCG AT-3') und PPCBPN30 (5'-pCAT GGC TAA TCG GAA TTT GGA GAA ATT GGC ATC GAT-3'). Für die Klonierung des Expressionsplasmids Ft967C wurde die ppcC-cDNA aus dem cDNA-Klon pcFtppcC1 mit Hin1I und KpnI geschnitten und mit einem ppcC-Linker in den mit NcoI und KpnI geschnittenen Vektor pTrc99A eingefügt. Der ppcC-Linker setzte sich aus den Oligonukleotiden PPCCNH29 (5'-pC ATG GCG AAT CGG AAT TTG GAG AAA TTG G-3') und PPCCHN27 (5'-pCCAT GCC AAT CGG AAT CGG AAT TTG GAG AAA TTG G-3') und PPCCHN27 (5'-pCCAT GCC AAT CGC AAT CGG AAT TTG GAG AAA TTG G-3') und PPCCHN27 (5'-pCCC) ATG GCG AAT CGG AAT CGC-3') zusammen.

#### 2.2.9. PEPCase-Komplementationsanalyse als Klonierungskontrolle

Ein *E. coli*-Stamm mit fehlender PEPCase, wie z.B. *E. coli* PCR1, kann zur gezielten molekularen Klonierung funktionstüchtiger PEPCasen verwendet werden, wenn man ihn auf Minimalmedium heranzieht und das Enzym für das Überleben essentiell ist (SABE ET AL. 1984). Im gewählten Minimalmedium dient D-Glukose als einzige verwertbare Kohlenstoffquelle. Im Vergleich zu anderen Mitgliedern der *Enterobacteriaceae*, kann *E. coli* nicht die Zitronensäure aus dem Minimalmedium zum Wachstum verwenden (PRESCOTT 1999). Bakterien nutzen  $\alpha$ -Ketoglutarat,

Oxalacetat und Succinat des Tricarbonsäure-Zyklus für verschiedene Biosynthesen (SCHLEGEL 1992). Die Erhaltung des Tricarbonsäure-Zyklus für die Biosynthesen und die Energiegewinnung durch die Endoxidation des Glykolyse-Produkts Acetyl-Coenzym A wird mit Auffüllreaktionen (anaplerotische Stoffwechselsequenzen) gewährleistet. Bei *E. coli* wird hauptsächlich Oxalacetat als Akzeptor für Acetyl-Coenzym A anaplerotisch durch die PEPCase synthetisiert. Daher benötigt *E. coli* PCR1 für das Wachstum im selektiven Minimalmedium entweder das Enzym PEPCase oder L-Glutamat als ausgleichenden Zusatz im Medium (Komplementation) (ASHWORTH & KORNBERG 1966). Wird die ppc-Mutante *E. coli* PCR1 mit einem ppc-Expressionsplasmid transformiert, so zeigt der Phänotyp (Wachstum) eine erfolgreich gebildete, funktionstüchtige PEPCase an.

Zur Selektion von *E. coli* PCR1-Stämmen mit aktiver, rekombinanter PEPCase von PEPCase-Plasmidkonstrukten wurde der entsprechende Transformationsansatz auf Selektiv-Festmedium (1% (w/v) Agar-Agar, 0,4% Glukose, 100 µg/mL Ampicillin, 70 µM IPTG) ausplattiert und bei 28 - 30°C 24 - 48 Stunden inkubiert. Zunächst wurde Selektionspuffer aus einer konzentrierten Stammlösung (50x: 10 g/L MgSO<sub>4</sub>, 100 g/L Zitronensäure x H<sub>2</sub>O, 655 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 3 H<sub>2</sub>O, 175 g/L NaNH<sub>4</sub>HPO<sub>4</sub> x 4 H<sub>2</sub>O) angesetzt. Die Lösung wurde auf pH 7,2 mit NaOH eingestellt, Agar-Agar zugefügt und durch Autoklavieren (120°C, 1 Bar, 20 Minuten) sterilisiert. D-Glukose wurde aus einer autoklavierten Stammlösung (50 % (w/v)) zugesetzt. Nach Abkühlung wurden der noch flüssigen Lösung (>55°C) sterilfiltrierte Spurenelemente (1000x: 480 mg/L FeCl<sub>3</sub> x 6 H<sub>2</sub>O, 280 mg/L MnCl<sub>2</sub> x 4 H<sub>2</sub>O, 256 mg/L CaCl<sub>2</sub> x 2 H<sub>2</sub>O, 2 g/L ZnCl<sub>2</sub>, 270 mg/L H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, 236 mg/L CoSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O), Vitamine (1000x: jeweils 100 g/L L-Leucin, L-Threonin, L-Arginin und 3 g/L Thiamin x HCl), Antibiotika und IPTG (50 – 100 µM) zugesetzt.

#### 2.2.10. Isolierung pflanzlicher Gesamt-RNA

Die im Folgenden beschriebene Methode zur Isolierung von Blatt-RNA ist der Methode zur Isolierung von Mesophyll-RNA aus C<sub>4</sub>-Gräsern nach WESTHOFF ET AL. (1991) entlehnt:

10-20 g Blattmaterial wurde in flüssigem Stickstoff pulverisiert und portionsweise in 80 mL Extraktionsmedium (0,2 M Tris/HCL pH 9,0 bei 25°C, 0,33 M Sorbitol, 0,3 M NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA; 40°C) eingemischt. Dann wurde 40 mL Phenollösung (pH 8, 40°C) und 40 mL Chloroform nacheinander zugefügt. Nach 15 Minuten inniger Vermischung wurde die wässrige Phase durch Zentrifugation (10 Min., 7000 UpM HS4, Raumtemperatur) abgetrennt und mit je 80 mL Phenol/Chloroform und Chloroform reextrahiert. Die Nukleinsäuren wurden über Nacht bei -20°C gefällt (1/20 Vol. 4 M Natriumacetat (pH 6,0), 1 Vol. Isopropanol), dann

abzentrifugiert (20 Min., 10000 UpM), angetrocknet, in 5 mL TBE-Puffer (80 mM Tris/Borsäure, 10 mM EDTA; pH 8,0) bei 4°C gelöst und unlösliche Partikel sedimentiert. Die RNA wurde mit Lithiumchlorid (1/3 Vol. 8 M LiCl, filtriert) versetzt und über Nacht auf Eis gefällt. Sie wurde dann abzentrifugiert, in TBE-Puffer gelöst und die LiCl-Fällung wiederholt. Danach wurde die RNA zweimal mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in Wasser gelöst.

#### 2.2.11. PolyA<sup>+</sup>-mRNA-Isolierung

Aus der RNA-Lösung wurde polyadenylierte "PolyA<sup>+</sup>"-mRNA nach Anleitung des Herstellers mit der "*Oligotex-dT Suspension*" (Qiagen, Hilden) im "Batch-Verfahren" isoliert und die gereinigte erste Fraktion nochmals einer Aufreinigung unterzogen. Die Oligotex-Latexmatrix hat Desoxy-Thymidin-Oligomere (Oligo-dT) kovalent gebunden. Nur PolyA<sup>+</sup>-mRNA bindet in einer Hybridisierungsreaktion an die Poly-dT-Bereiche und wird in Waschschritten von rRNA, tRNA und sonstiger nichtadenylierter RNA getrennt. Die PolyA<sup>+</sup>-mRNA wird in dem folgenden Elutionsschritt durch die veränderte Salzkonzentration im Puffer und eine Temperaturerhöhung von der Matrix gewaschen.

#### 2.2.12. Herstellung von größenfraktionierten cDNA-Büchereien

Die cDNA-Synthese wurde mit 5  $\mu$ g PolyA<sup>+</sup>-mRNA nach Herstellerangaben mit einem cDNA Synthesis Kit (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt. Dieser ermöglichte die direktionale Klonierung von hemimethylierter cDNA mit EcoRI- und XhoI-Schnittstellen am 5'- bzw. 3'-Bereich der cDNA. Abweichend von der Vorschrift wurde bei der Erststrangsynthese die RNA zusammen mit dem Linker-Primer hitzedenaturiert (70°C, 5 Min., danach 2 Min. Abkühlung auf RT) und kein  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dNTP eingesetzt, sondern durch Wasser substituiert. Die mit EcoRI und XhoI geschnittene cDNA wurde phenolisiert, gefällt, in Wasser rückgelöst und durch Agarosegelelektrophorese (1% Agarose, 1x TBE, 0,5 µg/µL Ethidiumbromid) nach Größe fraktioniert. Dazu wurden Gelstücke mit cDNA von 0,5 – 6 kBp ausgeschnitten, die cDNA aus dem Gel extrahiert, gefällt und in Wasser rückgelöst. Die größenfraktionierte cDNA wurde anschließend mit den Armen des Phagen-Vektors Uni-ZAP XR ligiert und die concatemere DNA nach Herstellerangaben in Phagenhüllen verpackt (Gigapack Gold Verpackungsextrakte, Stratagene, Heidelberg). Die Bestimmung des Phagentiters (Plaque bildende Einheiten/ml = pfu/mL) der Primärbücherei erfolgte über Infektion des E. coli-Stamms XL1-Blue MRF' auf Festmedium nach Anleitung des Herstellers. XL1-Blue MRF' läßt hemimethylierte DNA unversehrt und ist deshalb für deren Vermehrung geeignet.

Im Folgenden sind die einzelnen Schritte der Sichtung kurz erläutert: Zur Vermehrung (Amplifizierung) der Phagen wurden 50 mL LB-Medium (zusätzlich 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,2 % (w/v) Maltose) mit einer XL1-Blue MRF'-Einzelkolonie inokuliert und die Bakterien bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,8 - 1,2 angezogen (37°C). Anschließend wurden die Bakterien sedimentiert, in 10 mM MgSO<sub>4</sub>-Lösung ad OD<sub>600</sub> = 2 resuspendiert und bis zum Gebrauch bei 4°C aufgehoben. Ein Volumen der primären cDNA-Bücherei, entsprechend 5 x 10<sup>5</sup> pfu der Phagensuspension, wurde in 2 mL Bakteriensuspension (XL1-Blue MRF' in 10 mM MgSO<sub>4</sub>, OD<sub>600</sub> = 0,5) aufgenommen, 15 Min. bei 37°C inkubiert und in 40 mL NZY-Top-Agarose (47°C) gemischt. Diese Suspension wurde auf vorgewärmte NZY-Agar-Platten (37°C, 20 cm x 35 cm Fläche, 400 mL NZY-Agar) verteilt. Anschließend wurden die Platten nach Abkühlung auf Raumtemperatur bei 37°C inkubiert. Nach 8 - 10 Stunden wurden die Platten bei 4°C mit 50 mL SM-Puffer (5,8 g/L, 2 g/L MgSO<sub>4</sub>x7H<sub>2</sub>O, 50 mM Tris/HCl pH 7,5, 0,01 % Gelatine) überschichtet und zur Elution der Phagen über Nacht unter Schwenken inkubiert. Die Präparation der Bakterien- und Phagen-Medien, sowie die Ausführung der übrigen Schritte folgten dem Protokoll für das *ZAP-cDNA Gigapack III Gold Cloning Kit* (Stratagene, Heidelberg).

#### 2.2.13. Sichtung der Phagen-cDNA-Bücherei

Die Sichtung der Phagen-cDNA-Bücherei orientierte sich an der Methode nach BENTON & DAVIS (1977). 5 x  $10^4 - 1$  x  $10^5$  pfu an Phagen der primären cDNA-Bücherei wurden mit XL1-Blue MRF' in 40 mL NZY-Top-Agarose auf NZY-Agar-Platten (20 cm x 35 cm Fläche, 400 mL NZY-Agar) plattiert. Phagenpartikel wurden von der Mediumoberfläche aus den Phagen-Plaques durch einen luftblasenfreien Abklatsch von 30 Sek. Dauer auf eine Nitrozellulosemembran (20 cm x 35 cm, 0,45 µm, BA85, Schleicher und Schüll, Dassel) transferiert. Die Phagen-DNA wurde 30 Sek. lang durch Auflegen der Membranrückseite auf Chromatographiepapier mit Denaturierungslösung (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) denaturiert. Nach Inkubation auf Neutralisierungspuffer (0,5 M Tris/HCl, 3 M NaCl; pH 7,4) für 5 - 7 Min., folgte ein letzter Waschschritt für 5 – 7 Min. in Äquilibierungspuffer (0,25 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>; pH 7,2). Auf den getrockneten Membranen wurde die DNA durch Backen für 2 Std. bei 80°C fixiert und anschließend mit einer radioaktiver DNA-Sonde hybridisiert. Die Schwärzung des Röntgenfilms führt zur Identifizierung von Phagenplaques mit der gesuchten Hybridisierung von cDNA und Sonde.

Da die interessierenden Phagenplaques aufgrund der hohen Plaquedichte mit anderen Phagenspezies kontaminiert waren, mußte eine Vereinzelung (Sekundärsichtung) der Phagen angeschlossen werden. Für die Sekundärsichtung der Phagen-cDNA-Bücherei wurden die in der Primärsichtung identifizierten Bereiche der Phagenplaques aus dem Agar geschnitten, in 1 mL
SM-Medium aufgenommen, mit 20  $\mu$ L Chloroform versetzt und über Nacht eluiert. Eine für eine Vereinzelung gültige Phagenverdünnung wurde mit 200  $\mu$ L XL1-Blue MRF' (OD<sub>600</sub> = 0,5) inkubiert und in 1,8 mL NZY-Top-Agarose auf NZY-Agar-Platten (runde Plastik-Petrischalen, 8,5 cm Durchmesser, ca. 20 mL Medium) replattiert. Die Sekundärsichtung wurde mit kleinen quadratischen Nitrozellulose-Membranen (4 cm x 4 cm) für Plastik-Petri-Schalen im Hybridisierungsverfahren wie in der Primärsichtung ausgeführt und führte zu singulären Phagenplaques mit der gesuchten cDNA.

#### 2.2.14. In vivo-Exzision der cDNA-Phagemide

Für die Isolierung von cDNA-Plasmiden fand eine in vivo-Exzision des cDNA-Vektor-Phagemids Anwendung. In diesem Verfahren wird aus der DNA des λ-Vektors Uni-ZAP XR die pBluescript SK(-)-Phagemid-Einzelstrang-DNA synthetisiert. Die gebildeten Phagemide sind in f1-Phagen enthalten, mit denen *E. coli* SOLR-Zellen infiziert werden. In SOLR-Zellen wird das pBluescript SK(-)-Plasmid erzeugt. Es wurde nach dem Protokoll der Firma Stratagene vorgegangen. Die Phagen der identifizierten Plaques wurden in 500 µL SM-Puffer + 20 µL Chloroform eluiert. 200 µL XL1-Blue MRF' (OD<sub>600</sub> = 1, in 10 mM MgSO<sub>4</sub>) wurden mit 200 µL Phagensuspension und mit >10<sup>6</sup> pfu Helferphageneinheiten (f1-Phage ExAssist) koinfiziert. 200 µL SOLR (OD<sub>600</sub> = 1, in 10 mM MgSO<sub>4</sub>) wurde mit 20 µL f1-Phageneluat infiziert, auf LB-Agar (zusätzlich 50 µg/mL Ampicillin) ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert. SOLR-Einzelkolonien dienten der Gewinnung von cDNA-Plasmid-DNA.

# 2.2.15. PCR-Analyse von Phagen und Bakterien

Um die Größe und die Vollständigkeit der 5'-Bereiche von ppc-cDNA-Klonen schnell in Bakterien und Phagen nachweisen zu können, wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) benutzt (FALOONA & MULLIS 1987). 5  $\mu$ L der Probensuspension oder ein Aliquot einer Bakterienkolonie wurden der PCR-Analyse unterworfen. Der PCR-Ansatz für eine Reaktion in 50  $\mu$ L bestand aus 1x Reaktionspuffer (20 mM Tris/Cl, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 % (v/v) Triton X-100; pH 8,9), je 200  $\mu$ M dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 0,5  $\mu$ M Primer und 1 U Taq-Polymerase (SAIKI ET AL. 1987). Die Reaktion wurde mit einem Denaturierungsschritt (94°C / 5 Min.), fünf Vorzyklen (94°C / 1 Min., 50°C / 1 Min., 72°C / 1 Min.), 25 Hauptzyklen (94°C / 30 Sek., 55°C / 1 Min., 72°C / 1 Min.) und einer finalen Extension (72°C / 5 Min.) durchgeführt. Als PCR-Gerät wurde der *Thermocycler 9700* (Perkin Elmer) verwendet. Anschließend wurde 1/5 des Ansatzes für eine Agarose-Gelelektrophorese (1x TBE, 1,5 % (w/v) Agarose, 0,5  $\mu$ g/mL Etidiumbromid) eingesetzt.

## 2.2.16. Schnelle Klonierung pflanzlicher ppc-cDNA über inverse cDNA-PCR

Mit diesem PCR-Verfahren soll die spezifische Klonierung einer bestimmten vollständigen cDNA, bzw. ihres proteinkodierenden Bereiches, ermöglicht werden. Für die direkte Klonierung einer vollständigen cDNA müssen die nichttranslatierten 5'- und 3'-Endsequenzen bekannt sein, da nur sie für die Bildung von spezifischen PCR-Primern herangezogen werden können. Durch die Anwendung der inversen PCR-Technik auf die cDNA erhält man die Sequenzinformation über die nichttranslatierten 5'- und 3'-Bereiche einer cDNA. Die inverse PCR-Technik benutzt konservierte interne Sequenzbereiche einer ringförmigen cDNA als Startpunkt für die Polymerisation.

Abbildung 10 illustriert das Prinzip der im Folgenden beschriebenen Methode. Im ersten Schritt wurde cDNA mit definierten künstlichen Endsequenzen hergestellt und vermehrt. Dazu wurde pflanzliche PolyA<sup>+</sup>-RNA nach Herstellerangaben mit dem "SMART cDNA Library Construction Kit" (Clontech) in doppelsträngige cDNA übersetzt. Eine reverse Transkription der mRNA wurde mit Superscript II-Reverse-Transcriptase (RNAse H<sup>-</sup>, Gibco BRL – Life Technologies) und anschließend eine PCR mit dem KlenTaq-Polymerase-Gemisch (Kitkomponente) durchgeführt. Als Primer fand der SMART III-Primer und ein modifizierter Poly-dT-Primer Verwendung. Der SMART III-Primer erlaubt die Zweitstrangsynthese vom 5'-Ende des cDNA-Erststrangs. Er enthält eine SfiI-Schnittstelle (SMART III: 5'-AAG CAG TGG TAT CAA CGC AGA GTG GCC ATT A/TG GCC GGG-3'). Die Besonderheit des SMART III-Primers liegt in den drei G-Nukleotiden des 3'-Endes, die aus RNA-Nukleotiden bestehen. Der Poly-dT-Primer CDS III des Kits wurde durch einen Poly-dT-Primer (POLYT30-II: 5'-ATT CTA GAG GCC ATA A/TG veränderten SfiI-Schnittsequenz ersetzt, um sie mit der SfiI-Schnittsequenz des SMART III-Primers kompatibel zu machen. Zwei PCR-Ansätze à 50 µL wurden vereinigt, phenolisiert und die DNA präzipitiert.



**Abbildung 10: Schnellklonierung von 5'- und 3'-cDNA-Enden durch die inverse PCR-Methode.** Poly-A<sup>+</sup>-RNA wird mit dem SMART III-Oligonukleotid und einem Poly-dT-Primer cDNA übersetzt und Primerzielsequenzen an das 5'- und 3'-Ende der cDNA-Erststrangs zugefügt (cDNA Klonierungskit, Firma CLONTECH, vgl. Material & Methoden). Der 5'-Primer und der Poly-dT-Primer weisen essentiell die gleiche Sfi I-Schnittstelle auf. Dies ermöglicht den effektiven intramolekularen Ringschluß in der Ligation. Die 5'- und 3'-Enden der cDNA werden mit Hilfe des aminoterminalen NT-Primers und des carboxyterminalen CT-Primers spezifisch amplifiziert. Die Abfolge der Sequenzabschnitte im PCR-Amplifikat (unten) resultiert aus der cDNA-Synthese und der Zyklisierungsprozedur. Die SfiI-Schnittstelle entsteht durch Ligation der SfiI-Schnittenden der linearen cDNA. Die Anlagerungsstellen der degenerierten ppc-Primer (NT- und CT-Primer) sind als Pfeile an der cDNA und die proteinkodierenden Bereiche der cDNA als graue Boxen dargestellt.

Im nächsten Schritt wird die cDNA in den Primersequenzen der cDNA-Enden geschnitten, um "klebrige" überhängende Enden für eine anschließende Ligation zu erhalten. Dazu wurde die DNA nach Herstellerangaben mit dem Enzym Sfil gespalten und zwecks Größenfraktionierung im Agarose-Gel (1% (w/v) Agarose, 1xTBE) elektrophoretisch getrennt. Ein Gelstück, das cDNA in einem Größenbereich von 2,5 – 4 kBp enthielt (Transkriptlänge der gesuchten cDNA), wurde aus dem Gel ausgeschnitten und die cDNA eluiert. Anschließend wurde die DNA gefällt und in Wasser rückgelöst. Alternativ wurde ein Aliquot einer cDNA genommen, die nach konventioneller cDNA-Synthese (Stratagene-Protokoll) überhängende 5′-Enden für eine EcoRI-Schnittstelle aufwies. Dieses DNA-Aliquot wurde direkt für die intramolekulare Zirkularisierung durch die Ligation eingesetzt.

In der folgenden Ligation werden die Endbereiche eines cDNA-Moleküls, die nichttranslatierten 5'- und 3'-Bereiche, miteinander verbunden. Die Zirkularisierung ist für die inverse PCR-Technik notwendig. Sie wird durch eine starke Verdünnung der DNA bei der Ligation favorisiert. Dazu wurde die cDNA in Ligationspuffer (50 mM Tris/HCl pH 7,5, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM ATP) auf eine Konzentration von  $< 2 \mu g/mL$  eingestellt und die Reaktion mit der Zugabe von T4-DNA-Ligase (0,02 Weiss-Einheiten pro  $\mu$ L) gestartet. Die Inkubation wurde bei 16°C über Nacht ausgeführt. Anschließend wurde die T4-DNA-Ligase durch Hitze (15 Min., 65°C) denaturiert.

Tabelle 4: Sequenzen der degenerierten Primer für die Vermehrung von ppc-cDNA aus Gräsern.VariablePositionen erhalten den Code:  $\mathbf{R} = A+G$ ;  $\mathbf{Y} = C+T$ ;  $\mathbf{M} = A+C$ ;  $\mathbf{S} = C+G$ ;  $\mathbf{D} = A+T+G$ .

ppc-Primer	Nukleotidsequenz	Ausrichtung
CT-Primer	5'-GARGACACMCTSATYYTSACMATGAARGG-3'	zum 3'-Ende
NT-Primer 1	5'-GATTDCCATCRCGRTCACCMCCCATCC-3'	zum Startcodon
NT-Primer 2	5'-TCCTCGGCSAGGTTGGCGAGGTTGAGCATGTG-3'	zum Startcodon

Im nächsten Schritt werden cDNA-Fragmente von PEPCasen mit der inversen PCR-Technik amplifiziert (**Abbildung 10**). Die Primer sind nach außen in die 5'- und 3'-Enden der ppc-cDNA ausgerichtet. Nur mit ringförmiger cDNA können PCR-Produkte gebildet werden. Eine geschachtelte PCR wurde mit degenerierten Primern für konservierte PEPCase-DNA-Sequenzbereiche durchgeführt. Die Primerinformation wurde mit Hilfe eines DNA-Sequenzvergleiches aller bekannten pflanzlichen PEPCasen gewonnen und von stark konservierten Sequenzblöcken abgeleitet (**Tabelle 4**). Der reiche Gehalt an G- und C-Nukleotiden in den Genen für die C<sub>4</sub>-PEPCase aus *Sorghum bicolor* und *Zea mays* wurde berücksichtigt. Der CT-Primer soll im 3'-Ende, ca. 30 Bp vor dem Stop-Codon, und der NT-Primer 1 ca. 900 Bp hinter dem Startcodon im 5'-Bereich der ppc-cDNA binden. Von dem Ligationsansatz wurde 1/60 für eine primäre PCR mit degenerierten ppc-Primern und KlenTaq-DNA-Polymerase (Clontech) eingesetzt. 50 µL PCR-Ansatz enthielt 1x KlenTaq-Reaktionspuffer, 200 µM dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 0,4 µM Primer und 1 µL KlenTaq-Polymerase-Gemisch. Um die Bindung der degenerierten Primer an die verschiedenen ppc-cDNA-Spezies zu ermöglichen, wurde den Hauptzyklen der PCR fünf Vorzyklen mit geringerer Annealing-Temperatur vorangesetzt. Die Hauptzyklen der primären PCR wurden mit einer Verringerung der Temperatur um 0,2°C pro Zyklus ausgeführt ("Touch down PCR"). Die Reaktion wurde mit einem Denaturierungsschritt (95°C / 30 Sek.), fünf Vorzyklen (95°C / 30 Sek., 46°C / 30 Sek., 68°C / 2 Min.), 25 Hauptzyklen (94°C / 30 Sek., 55°C / 30 Sek., 68°C / 1 Min.) und einer finalen Extension (68°C / 5 Min.) durchgeführt. Als PCR-Gerät wurde der *Thermocycler 9700* (Perkin Elmer) verwendet.

Eine zweite PCR sollte eine weitere spezifische Vermehrung der ppc-DNA-Fragmente durch den Gebrauch eines weiteren intern bindenden Primers erlauben. Der degenerierte NT-Primer 1 für die 5'-Region der ppc-cDNA wurde gegen den degenerierten NT-Primer 2 ausgetauscht. Dieser bindet ca. 330 Bp hinter dem Startcodon der ppc-cDNA. Der 50  $\mu$ L-Ansatz für die Sekundär-PCR enthielt 1x KlenTaq-Reaktionspuffer, 200  $\mu$ M dNTP (dATP, dCTP, dGTP, dTTP), je 0,4  $\mu$ M NT-und CT-Primer und 1  $\mu$ L KlenTaq-Polymerase-Gemisch. Die Reaktion wurde mit einem Denaturierungsschritt (95°C / 30 Sek.), 25 Hauptzyklen (94°C / 15 Sek., 55°C / 15 Sek., 68°C / 1 Min.) und einer finalen Extension (68°C / 4 Min.) durchgeführt. Die sekundäre PCR wurde mit einer Verringerung der Temperatur um 0,2°C pro Hauptzyklus ausgeführt (Gerät: Thermocycler 9700, Perkin Elmer). Die DNA des sekundären PCR-Ansatzes wurde in einem Agarose-Gel (1% Agarose, 1xTBE) elektrophoretisch getrennt und DNA-Fragmente der erwarteten Größe für eine Klonierung aus dem Gel isoliert. Als Nachweis für die korrekte Vereinigung der 3'- und 5'- cDNA-Bereiche zu einem DNA-Fragment wurde ein Aliquot der PCR-Reaktion mit SfiI verdaut und die Trennung der Fragmente in zwei etwa gleich große Subfraktionen beobachtet. Diese sollten je den 3'- und 5'- Bereichen der cDNA-Spezies entsprechen.

Die aufgereinigten Fragmente der sekundären PCR wurden in den Vektor pBluescript II KS(+)-T ligiert. Die in der PCR gebildeten DNA-Fragmente weisen an den 3'-Enden ein zusätzliches überstehendes Desoxy-Adenosin (dA) auf. Es wird durch die Terminale-Transferase-Aktivität der Taq-Polymerase angehängt. Die Herstellung des T-Vektors, ein modifizierter pBluescript II KS(+), folgte dem Protokoll von MARCHUK ET AL. (1990). Die DNA-Fragmente wurden in die EcoRV-Schnittstelle von pBluescript II KS(+) mit einem zusätzlichen T-Nukleotid eingefügt. Die Klone mit erfolgreicher Insertion der PCR-DNA-Fragmente wurden über Blau-Weiß-Selektion auf LB-Agar (50 µg/mL Ampicillin) erhalten und die Plasmid-DNA nach Aufreinigung durch Restriktionsenzymverdau und Sequenzierung analysiert.

#### 2.3. Biochemische Methoden

#### 2.3.1. Aufreinigung rekombinanter PEPCase aus E. coli PCR1

Für die Aufreinigung eines rekombinanten PEPCase-Enzyms wird *E. coli* PCR1 mit einem PEPCase-Expressionsplasmid transformiert und eine Expressionskultur angezogen. Anschließend wird ein Rohextrakt hergestellt und eine differentielle Proteinfällung angewendet. Es folgt die säulenchromatographische Aufreinigung der PEPCase in mehreren Schritten, die sich an der Aufreinigungsprozedur zur Isolierung einer PEPCase aus Blattmaterial von Tabak (*Nicotiana tabacum*) orientieren (WANG & CHOLLET 1993).

### 2.3.1.1. Anzucht der Bakterien zur Überexpression rekombinanter PEPCase

Nach der Transformation von *E. coli* PCR1 mit einem PEPCase-Expressionsplasmid wurde, von einer Einzelkolonie ausgehend, 50 mL Expressionsmedium (12 g/L Bacto-Trypton, 6 g/L Hefe-Extrakt, 6 g/L NaCl, 0,4% (w/v) Glukose, 100  $\mu$ g/mL Ampicillin; pH 7,5) mit einer Einzelkolonie (nicht älter als eine Woche) angeimpft und bei 37°C und 220 UpM auf dem Schüttler inkubiert. Nach ca. 9 Stunden Wachstum (OD<sub>600</sub> = 0,7 – 1), wurden 800 mL (bzw. 2 x 400 mL) auf 37°C vorgewärmtes Expressionsmedium (zusätzlich 0,4% (w/v) Glukose, 100  $\mu$ g/mL Ampicillin) mit der gesamten Vorkultur angeimpft, nach weiterem Wachstum (OD<sub>600</sub> = 0,2) IPTG ad 70 $\mu$ M zugesetzt und für 12 – 13 Stunden über Nacht bei 28°C - 30°C und 220 UpM auf einem Schüttler inkubiert. Die Übernachtkultur wurde abzentrifugiert (10 Min., 4000 x g, GSA-Rotor, Sorvallzentrifuge) und in 20 – 25 mL eiskaltem Extraktionspuffer (100 mM Mops/KOH, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM DTT, 1 mM EDTA) aufgenommen. Diese Bakteriensuspension ließ sich in 50 mL-Sarstaedt-Plastikröhrchen mindestens ein halbes Jahr vor einer Weiterverarbeitung bei –80°C lagern. Sie wurde zwecks Weiterverwendung schonend unter gelegentlichem Schwenken in einem Becherglas mit raumtemperiertem Wasser auf 4°C aufgetaut.

#### 2.3.1.2. Herstellung des Enzym-Rohextraktes und Proteinfällung mit Polyethylenglykol 8000

Für die Herstellung des Rohextraktes wurde die kalte Bakteriensuspension kurz vor dem Aufschluß mit dem Serin-Protease-Inhibitor PMSF (ad 1 mM) versetzt. Die Zellen wurden in der French-Press-Zelle durch Scherkraft zweimal bei einem konstanten Druck von ca. 140 MPa bei 4°C aufgeschlossen. Das heterogene Bakterienlysat wurde abzentrifugiert (30 Min., 30000 x g,

SS34-Rotor, Sorvallzentrifuge) und der homogene, opaleszente Überstand quantitativ für die folgende Proteinfällung mit Polyethylenglykol (PEG) 8000 abgenommen.



Abbildung 11: Schema zur Homogenatgewinnung und differentielle Fällung der Proteine durch PEG 8000.

Das geklärte Bakterienlysat wurde durch stetiges Einrühren von PEG 8000 (50% (w/v) in H<sub>2</sub>O) auf 6 % Sättigung gebracht und 5 - 10 Minuten mit einem Magnetrührer durchmischt. Die Proteinsuspension wurde zentrifugiert (10 Min., 30000 x g, 4°C) und der geklärte Überstand mit PEG 8000 auf 12 % Sättigung gebracht. Nach 15-minütiger Durchmischung wurden die ausgefällten Proteine abzentrifugiert (15 Min., 30000 x g, 4°C). Anschließend wurde das Proteinsediment in 12 - 15 mL Hochsalzpuffer (siehe nächster Abschnitt) auf Eis rückgelöst und filtriert (Spritzenvorsatzfilter: 0,45 µm Porendurchmesser). Die Prozedur ist in **Abbildung 11** veranschaulicht.

## 2.3.1.3. Hydrophobe Interaktionschromatographie

Alle chromatographischen Schritte wurden mit FPLC-Chromatographiesäulen an einer automatisierten FPLC-Anlage (Amersham Pharmacia, Schweden) bei 4°C bis 6°C im Kaltraum durchgeführt. Sämtliche Puffer der Säulenchromatgraphie wurden filtriert und entgast. Für den ersten Schritt, die hydrophobe Interaktionschromatographie mit *Phenylsepharose CL-4B*, wurde die Matrix mit mind. 2 Volumina Hochsalzpuffer (300 mM Ammoniumsulfat, 20 mM Tris/HCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% (v/v) Glycerin; pH 7,5 bei 25°C) und einer Flußrate von 1 mL/Min. voräquilibriert (Dimension des Säulenbetts: 1,6 cm Durchmesser x 5 cm Höhe). Die in

Hochsalzpuffer gelösten Proteine der PEG-Fällung (12 – 15 mL) wurde mit Hilfe einer Peristaltikpumpe (Flußrate: 0,5 mL/Min.) auf die Säule aufgetragen und an die Matrix gebunden. Mit 10 mL Hochsalzpuffer (0,5 mL/Min.) wurde nachgespült, um den vollständigen Auftrag der Probe zu gewährleisten. Die Säulematrix wurde dann mit 30 mL Hochsalzpuffer und 30 – 40 mL Niedrigsalzpuffer (200 mM Ammoniumsulfat, 20 mM Tris/HCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% (v/v) Glycerin; pH 7,5 bei 25°C) gewaschen (Flußrate: 1 mL/Min.), um nur leicht gebundene, kontaminierende Proteine zu entfernen. Die gebundenen Proteine wurden am Ende eines abnehmenden Ammoniumsulfat-Gradienten (200 mM – 0 mM) mit 10 mL Gesamtvolumen in Niedrigsalzpuffer eluiert. 1 mL-Proteinfraktionen wurden gesammelt und ihre PEPCase-Aktivität bestimmt. Die Spitzenfraktionen der PEPCase-Enzymaktivität befanden sich am Ende des Ammoniumsulfat-Gradienten.

## 2.3.1.4. Anionenaustausch-Chromatographie

Für die Anionenaustausch-Chromatographie wurden 9 - 10 mL der Phenylsepharose-Spitzenfraktionen vereinigt. Diese Probe wurde auf eine mit Niedrigsalzpuffer (20 mM Tris/HCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% (v/v) Glycerin; pH 7,5 bei 25°C) äquilibrierte *MonoQ*-Matrix (1 mL-*HR 5/5*-Säule, Amersham Pharmacia) oder *SourceQ*-Matrix (2 mL-*HR 10/5* Säule, Amersham Pharmacia) mit einer Flußrate von 0,5 mL/Min. geladen. Die Matrix wurde mit Niedrigsalzpuffer (Flußrate:1 mL/Min.) gewaschen. Anschließend wurden die gebundenen Proteine durch einen linear ansteigenden Salzgradienten (0 – 500 mM KCl) in Niedrigsalzpuffer eluiert. 0,5 mL-Fraktionen wurden gesammelt und deren PEPCase-Aktivität bestimmt.

## 2.3.1.5. Gelfiltration

Die Spitzenfraktionen der Anionenaustausch-Chromatographie (2 bis 2,5 mL) wurden vereinigt und mit einem *Centricon 30 Microconcentrator* (Millipore Amicon, Eschborn) den Herstellerangaben entsprechend auf ein Volumen von 200 – 300  $\mu$ L eingeengt. Dieses Volumen wurde auf eine *Superdex 200 HR 10/30* Gelfiltrationssäule (Amersham Pharmacia) geladen (Flußrate: 0,5 mL/Min.), die mit Niedrigsalzpuffer (20 mM Tris/HCl, 0,1 mM EDTA, 1 mM DTT, 5% (v/v) Glycerin; pH 7,5 bei 25°C) + 50 mM KCl voräquilibriert wurde. Die Elution in 0,25 mL-Proteinfraktionen erfolgte bei einer Flußrate von 0,5 mL/Min. in Niedrigsalzpuffer + 50 mM KCl. Zwei bis drei Spitzenfraktionen des Bereiches mit einem Molekulargewicht um 440 kDa wurden ermittelt, vereinigt und mit Glycerin zu 50 % (v/v) versetzt. Diese Proben konnten bei –20°C über Monate hinweg ohne erkennbaren Aktivitätsverlust gelagert werden.

### 2.3.2. Enzymatische Tests für die PEPCase

Zur Messung der Reaktionsgeschwindigkeit der Phosphoenolpyruvat-Carboxylase wurde die Enzymreaktion mit Malat-Dehydrogenase (MDH) an die Oxidation von NADH gekoppelt (UEDAN & SUGIYAMA 1976). Die an die Oxidation von NADH gebundene Abnahme der Extinktion ( $\Delta E/t$  [Min.<sup>-1</sup>]) wurde bei der Wellenlänge  $\lambda = 340$  nm spektroskopisch (Zweistrahl-Photometer, Firma Hitachi, Japan) bei 25°C gemessen. Die Messungen dauerte eine Minute mit einem Meßintervall von sechs Sekunden. Für die Berechnung der Reaktionsgeschwindigkeit (v<sub>o</sub>) wurde der molare Extinktionskoeffizient von NADH mit  $\varepsilon = 6,22 \ \mu M^{-1} cm^{-1}$  angewandt. Als eine Einheit der Enzymaktivität (U = "Unit") definiert sich die Geschwindigkeit der Oxidation von 1  $\mu$ mol NADH pro Minute bei der Reduktion von Oxalacetat zu Malat. Konzentrierte Enzymproben wurden für Kinetikmessungen mit PEPCase-Verdünnungspuffer (10 mM Tricine/KOH, 1mM DTT, 5% (w/v) Glycerin; pH 8,0 bei 25°C) auf eine Aktivität von 40 – 50 mU / 20  $\mu$ L eingestellt und auf Eis gehalten.

## 2.3.2.1 Messung der PEPCase-Enzymaktivität

Für die Messung der Enzymaktivität in Proben der Aufreinigungsprozedur wurde ein standardisierter Meßansatz mit 600  $\mu$ L Volumen bei pH 8 gewählt. Der bei 25°C vorinkubierte Meßansatz (50 mM Tricine/KOH, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 150  $\mu$ M NADH, 2 U MDH, 2 – 5 mM Na<sub>3</sub>PEP; pH 8,0 bei 25°C) wurde in der Meßküvette vorgelegt und für einen Meßvorgang bei 25°C temperiert. Anschließend wurde die Enzymreaktion mit der Zugabe der Enzymprobe (2 - 5  $\mu$ L) gestartet. Die Messung dauerte eine halbe Minute mit einem Meßintervall von drei Sekunden.

### 2.3.2.2. Substratsättigungskinetiken

Um Substratsättigungskinetiken mit Phosphoenolpyruvat (PEP) durchzuführen, wurde zunächst die Enzymaktivität der Probe auf 40 – 50 mU in 20  $\mu$ L verdünnt und für die Dauer der Kinetik-Messungen auf Eis inkubiert. Die Substratsättigungskinetiken wurden bei pH 8,0 (Puffer: 50 M Tricine/KOH) und bei pH 7,6 (Puffer: Hepes/KOH) mit variablen PEP-Konzentrationen im Bereich von 20  $\mu$ M bis 5 mM durchgeführt. Dazu wurde 530  $\mu$ L Meßansatz (Endkonzentration in 600  $\mu$ L: 50 mM Puffer, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 150  $\mu$ M NADH, 2 –3 U MDH) ohne PEP vorgelegt und für einen Meßvorgang lang in der Meßküvette bei 25°C temperiert. Kurz vor der Messung wurde 50  $\mu$ L PEP-Lösung zugesetzt und die Reaktion mit der Zugabe von 20  $\mu$ L Enzymprobe (konstante Enzymaktivität) gestartet. Die Substratsättigungskinetiken der aktivierten

Enzyme wurden zusätzlich mit Glukose-6-Phosphat (5 mM Endkonzentration) im Meßansatz gemessen.

## 2.3.2.3. Messung der Malatinhibierung – $I_{0,5}$ -Malat

Der inhibitorische Einfluß von L-Malat auf die Enzymaktivität der PEPCase wurde durch die Bestimmung des  $I_{0,5}$  gemessen. Dazu wurde die Geschwindigkeit der Enzymreaktion bei einer festen Substratkonzentration und einer variablen Inhibitorkonzentration gemessen. Es wurde die Inhibitorkonzentration ( $I_{0,5}$ ) ermittelt, bei der die Enzymaktivität nur noch 50% der Maximalaktivität ohne Inhibitor entsprach. Für die C<sub>4</sub>-PEPCase aus Mais wurde gezeigt, daß bei pH 8 die Inhibierung der Enzymaktivität durch Malat mit sättigenden Substratkonzentration (PEP) aufgehoben wird. Bei pH 7,1 dagegen ist die Malatinhibierung stärker und substratunabhängig (ECHEVARRIA ET AL. 1994). Um eine gute Antwort der Enzymaktivität auf die eingesetzte Malatkonzentration im  $\mu$ M- bis mM-Bereich zu erhalten, wurde der  $I_{0,5}$ -Malat daher bei pH 7,6 gemessen. Die Substratkonzentration im Meßansatz wurde auf 2 x K<sub>0,5</sub>-PEP eingestellt, da im Fall einer kompetitiven Hemmung eine sättigende Substratkonzentration die Wirkung des Inhibitors maskiert und geringe Substratkonzentrationen während der Messung zu schnell verbraucht werden.

Für den enzymatischen Test wurde 480  $\mu$ L Meßansatz (Endkonzentration in 600  $\mu$ L: 50 mM Hepes/KOH, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM KHCO<sub>3</sub>, 150  $\mu$ M NADH, 2 –3 U MDH; pH 7,6 bei 25°C) ohne PEP und Malat vorgelegt und einen Meßvorgang lang in der Meßküvette bei 25°C temperiert. Kurz vor der Messung wurde 50  $\mu$ L PEP-Lösung (12 x konzentrierte Lösung: Na<sub>3</sub>PEP) und 50  $\mu$ L L-Malat (12 x konzentrierte Lösung: L-Malat/KOH; pH 7,6) zugesetzt. Anschließend wurde die Reaktion mit der Zugabe von 20  $\mu$ L Enzymlösung (konstant 40 – 50 mU) gestartet.

Die Hemmung der Enzymaktivität der PEPCase durch Malat wird als kompetitive Hemmung angesehen (WEDDING 1990). Bei der Bestimmmung des  $I_{0,5}$  wird zunächst die Substratkonzentration (S) von 2 x K<sub>m</sub>-PEP ohne den Inhibitor eingesetzt. Für den Fall einer kooperativitätslosen Enzymreaktion (hyperbolische Kinetik) gilt die Michaelis-Menten-Gleichung (1). Bei S = 2 K<sub>m</sub>-PEP und der eingesetzten Gesamtenzymaktivität ( $v_{max}$ ) entspricht dies der Reaktionsgeschwindigkeit von:

(1) 
$$v_{S=2K_m} = v_{\max} \frac{S}{S+K_m} = v_{\max} \frac{2K_m}{2K_m+K_m} = v_{\max} \frac{2}{3}$$

Wird die Enzymreaktion mit einem kompetitiven Inhibitor (hier Malat) gemessen, so wird die Michaelis-Menten-Gleichung um die Inhibitorkonzentration (I) und die Inhibitorkonstante ( $K_i$ ) modifiziert.  $K_i$  stellt ein Maß für die Bindung des Inhibitors an das Enzym dar. Im Fall der nichtkooperativen Kinetik gilt für die Reaktionsgeschwindigkeit:

(2) 
$$v_i = v_{\max} \frac{S}{S + K_m (1 + \frac{I}{K_i})}$$
  $v_i = inhibitorabhängige Reaktionsgeschwindigkeit I = Inhibitorkonzentration  $K_i = Inhibitor-Konstante$$ 

Bei der Ermittlung des  $I_{0,5}$ -Malat ist die Substratkonzentration S = 2 K<sub>m</sub>-PEP. In Gleichung (2) eingesetzt erhält man bei diesem Sonderfall für die malatabhängige Reaktionsgeschwindigkeit:

(3) 
$$v_i^{S=2K_m} = v_{\max} \frac{2K_m}{2K_m + K_m(1 + \frac{I}{K_i})} = v_{\max} \frac{2}{3 + \frac{I}{K_i}}$$

Die Inhibitorkonstante  $K_i$  läßt sich aus der Inhibitorkonzentration der halbmaximalen Inhibierung  $I_{0,5}$  berechnen. Aus (1) folgt, daß bei der halbmaximalen Hemmung der Reaktionsgeschwindigkeit durch die Inhibitorkonzentration  $I_{0,5}$ -Malat (S = 2 K<sub>m</sub>-PEP) gilt:

(4) 
$$v_{I_{0,5}}^{S=2K_m} = v_{\max} \frac{1}{2} \cdot \frac{2}{3} = v_{\max} \frac{2}{3 + \frac{I_{0,5}^{Malat}}{K_i}} \Rightarrow \frac{1}{3} = \frac{2}{3 + \frac{I_{0,5}^{Malat}}{K_i}} \Rightarrow K_i = \frac{I_{0,5}^{Malat}}{3}$$

Bei Substratsättigungskinetiken mit sigmoiden Kurvenverlauf wird Gleichung (2) um den Hill-Koeffizienten (h) erweitert, der ein Maß des Kooperativitätsgrad für das Substrat (PEP) darstellt. Im Fall der kompetitiven Hemmung gilt für die Reaktionsgeschwindigkeit Gleichung (5):

(5) 
$$v_i = v_{\max} \frac{(2K_m)^h}{(2K_m)^h + (K_m(1 + \frac{I}{K_i}))^h} = v_{\max} \frac{2^h}{2^h + (1 + \frac{I}{K_i})^h}$$

### 2.3.4. Proteinbestimmung

Die Konzentrationen löslicher Proteine wurden nach der Methode von BRADFORD (1976) bestimmt. Die Bindung von Argininen der Proteine an den sauren Indikatorfarbstoff Coomassie Brilliant-Blau G250 in saurem Medium verursacht eine Stabilisierung der deprotonierten Sulfonat-Form. Dies bewirkt eine spektroskopisch meßbare Verschiebung des Farbstoff-Absorptionsmaximums auf 595 nm, das nach 10 Min. bei Raumtemperatur gemessen wurde. Als Eichprotein wurde BSA, in H<sub>2</sub>O oder einem entsprechenden Probenpuffer gelöst, verwendet.

#### 2.3.5. Denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Trennung von Proteinen wurde durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese unter denaturierenden Bedingungen mit SDS (Natrium-Dodecylsulfat) nach der Methode von Schägger und Jagow durchgeführt (SCHÄGGER & JAGOW 1987). Die Gelelektrophorese wurde mit einem Sammelgel von 4% T, 3% C und mit einem Trenngel von 10% T, 3% C ausgeführt (T = totale Acrylamidkonzentration, C = Bisacrylamidkonzentration). Die Proteine wurden mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant-Blau angefärbt (WEBER & OSBORNE 1969).

### 2.4. Rechnergestützte Analysen

Die Analysen der DNA- und Proteinsequenzen sowie die Berechnung der Enzymkinetiken wurde generell unter dem MacOS-Betriebssystem auf Rechnern der Firma Apple (Macintosh-Modelle mit PowerPC-Zentralprozessor) ausgeführt. Die Betriebssysteme der genutzten Rechner und die Quellen der Programmme im Internet sind in **Tabelle 5** zusammengestellt.

### 2.4.1. Sequenzanalyse, Sequenzvergleich und Stammbaumanalyse

Grundlegende Sequenzanalysen, wie die Bestimmung von Restriktionsschnittstellen und offenen Leserastern in DNA-Sequenzen, sowie die Ableitung der Proteinsequenzen, wurden mit dem Programmpaket MacMolly Tetra durchgeführt (Version 3.8; Softgene GmbH, Berlin). Einfache Vergleiche von DNA- und Proteinsequenzen berechnete das Programm ClustalW bzw. ClustalX (Version 1.8, THOMPSON ET AL. 1994, 1997) angefertigt. Mit dem Programm SeqPub wurden die Sequenzen zusammengestellt und in verschiedene Dateiformate konvertiert (GILBERT 2000). Die Datenbanksuchen in der GenBank-Datenbank wurde durch das Internet mit dem Programm BLAST (Version 2.0, ALTSCHUL ET AL. 1997) im Datensatz "nr" (non redundant) vorgenommen.

## 2.4.2. Erstellung phylogenetischer Bäume – Verwandtschaftsanalyse von Aminosäuresequenzen

Das Programm PILEUP (GCG Programmpaket Version 10, Genetics Computer Group, USA) wurde für den Sequenzvergleich von PEPCase-Aminosäuresequenzen eingesetzt. Dazu wurde die Strafe für eine Lückeneröffnung auf 8 bzw. die Strafe für eine Lückenerweiterung auf 2 gesetzt. Nach der Entfernung von hypervariablen Regionen mit Insertionen oder Deletionen aus dem Sequenzvergleich wurde der verbliebene Sequenzblock für die Konstruktion des phylogenetischen Baumes nach der Nachbar-Verknüpfungsmethode ("Neighbour-joining", SAITOU & NEI 1987) verwendet. Dazu wurde mit ProtML und NJDist (MOLPHY Vers. 2.3b3, ADACHI & HASEGAWA 1994, 1996) eine Schätzung der maximalen Wahrscheinlichkeit ("Maximum likelihood"-Analyse) mit Hilfe der JTT-Aminosäure-Substitutionsdatenmatrix (JONES ET AL. 1992) bei 1000

"bootstrap"-Replikaten vorgenommen (FELSENSTEIN 1985). Zur graphischen Darstellung der Ergebnisse aus MOLPHY wurde das Programm TreeView verwendet (Version 1.51, **Tabelle 5**)

Tabelle 5: Programme für die Analyse von DNA- und Aminosäuresequenzen bzw. Enzymkinetiken. Unter derQuellenangabe befinden sich die Internetadressen zum Bezug der Programme. PowerPC (PPC) bezeichnetProgramme, die auf Apple Macintosh Rechnern nur mit einem speziellen Zentralprozessor genutzt werden können.

System	Version	Quelle
Mac OS	3.8	SCHÖNEBERG ET AL. 1994; Softgene GmbH, Berlin
	PowerPC	http://www.mologen.com/
Mac OS	0.6f (1996)	GILBERT 2000
	PowerPC	http://iubio.bio.indiana.edu/soft/molbio/seqpup/
Mac OS	1.8	THOMPSON ET AL. 1994, 1997
	PowerPC	ftp://ftp-igbmc.u-strasbg.fr/pub/ClustalX/
WWW	2.0	Altschul et al. 1997
		http://www.ncbi.nlm.nih.gov/
UNIX	10	Genetics Computer Group, USA
		http://www.gcg.com/
UNIX	2.3b3	Adachi & Hasegawa 1994
	(1996)	ftp://ftp.ism.ac.jp/pub/ISMLIB/MOLPHY/
Mac OS	1.51	PAGE 1996
	PowerPC	http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html
Mac OS	3.08	Synergy Software, Reading, USA
	PowerPC	http://www.synergy.com/
	System Mac OS Mac OS Mac OS WWW UNIX UNIX UNIX Mac OS Mac OS	SystemVersionMac OS3.8PowerPCMac OS0.6f (1996)PowerPCMac OS1.8PowerPCWWW2.0UNIX10UNIX2.3b3 (1996)Mac OS1.51PowerPCMac OS3.08PowerPC

## 2.4.3. Enzymkinetik-Analyse

Die Analyse der Substratsättigungskinetiken wurde mit dem Programm Kaleidagraph (Version 3.08, Synergy Software, Reading, USA) durchgeführt. Das Programm ermöglicht die nichtlineare Regressionsanalyse von Funktionen (Enzymkinetik-Gleichungen) durch numerische Annäherung und deren graphische Darstellung.

Zur Berechnung der Parameter der modifizierten Michelis-Menten-Gleichung wurde die Funktion

 $y = ,,m1 * (M0^{m3} / ((M0^{m3}) + (m2^{m3}))); m1=50; m2=0.1; m3=1"$ 

eingegeben. Die Konstanten  $v_{max}$ ,  $K_{0,5}$ , und der Hill-Koeffizient (h) wurden als m1, m2 und m3 in die Gleichung eingesetzt und Startwerte vorgegeben. Das Programm bestimmt die Konstanten anhand der vorgegebenen Substratkonzentrationen und der gemessenen enzymatischen Reaktionsgeschwindigkeit. M0 stellt die veränderliche Variable x (Substratkonzentration) dar.

# 2.5. Datenbankeinträge

Die klonierten ppc-Sequenzen der vorliegenden Arbeit und der Arbeit von Dr. Karin Ernst (selbes Institut) wurden z.T. in die EMBL-, GenBank- und DDBJ- Sequenzdatenbanken eingetragen. Sie sind über die Internetadresse des National Center of Bioinformatics am National Health Institute (NCBI, USA:), http://www.ncbi.nlm.nih.gov/, zugreifbar. Die Zugriffsnummern für die ppc-cDNAs lauten:

Klonierte cDNA	Kennung	GenBank- Zugriffsnummer
pcFbppcA1	kein	Eintrag
pcFpubppcA1	kein	Eintrag
pcFtppcB1	FTPPCB1	AF248079
pcFtppcC1	FTPPCC1	AF248080
pcChgppc22	CHGPPC1	AF268091

# 3. Ergebnisse

## 3.1. Methodische Vorarbeiten

Für die Bestimmung der enzymatischen und regulatorischen Eigenschaften der PEPCasen aus *Flaveria* sollten homogene Enzymfraktionen eingesetzt werden. Die Aufreinigung und Charakterisierung der pflanzlichen Enzyme erwies sich in der Vergangenheit aufgrund des geringen Gehalts der nichtphotosynthetischen Isoformen, des unklaren Phosphorylierungsstatus und des Vorkommens von mehreren Isoformen in den verschiedenen Pflanzenorganen als schwierig. Deshalb sollten in *E. coli* erzeugte, rekombinante Enzyme untersucht werden, die am Aminoterminus nicht phosphoryliert sind (CRETÍN ET AL. 1991b). Alle untersuchten Enzyme wurden in Form ihrer cDNA in das Bakterium *E. coli* PCR1 (ppc<sup>-</sup>) eingebracht und die rekombinanten Proteine bis zur Homogenität aufgereinigt. Anschließend wurden die kinetischen Eigenschaften der Enzyme verglichen. Dazu wurde die Aufzucht- und Aufreinigungsprozedur standardisiert und ein reproduzierbarer Enzymtest genutzt, der die unterschiedlichen Eigenschaften der untersuchten PEPCasen für einen Vergleich berücksichtigt.

## 3.1.1. Klonierung der ppc-cDNA in den Expressionsvektor pTrc99A

Ziel war es nicht, ein rekombinantes PEPCase-Fusionsprotein mit einer amino- oder carboxyterminalen Erweiterung zu erzeugen, da der Carboxyterminus der PEPCase stark konserviert ist und der Aminoterminus eine Rolle in der Enzymregulation spielt. Stattdessen sollte ein "natives" rekombinantes Enzym durch Überexpression der ppc-cDNA in *E. coli* hergestellt und aufgereinigt werden. Für die Expression der PEPCasen in *E. coli*-PCR1 fand daher der bakterielle Expressionsvektor pTrc99A Verwendung, der mit seinem starken *trc*-Promotor eine durch IPTG induzierbare Expression der eingefügten cDNA ermöglicht.

Für die ppcA-PEPCasen aus *F. trinervia* (C<sub>4</sub>) und *F. pringlei* (C<sub>3</sub>) standen die Expressionsplasmide Ft966 und Fp966 aus früheren Arbeiten zur Verfügung (BLÄSING 1995, SVENSSON ET AL. 1997). Die cDNAs der ppcB- und ppcC-Isoenzyme aus *F. trinervia* isolierte Frau Dr. Karin Ernst isoliert (ERNST & WESTHOFF 1997). Frau Monika Streubel klonierte sie in den Expressionsvektor pTrc99A. Da die cDNA nicht direkt mit dem Startcodon in die NcoI-Schnittstelle des Vektors kloniert werden konnte, fand dieselbe Strategie wie für die Klonierung der Expressionsplasmide Ft966 und Fp966 für die ppcA-PEPCasen Anwendung (siehe Material und Methoden). Die resultierenden Expressionsplasmide wurden pcFtppcB-Trc (Ft965B) und

pcFt967C-Trc (Ft967C) genannt. Die Expression der cDNA der ppcB- und ppcC-PEPCase im *E.coli*-Stamm PCR1 konnte den ppc-Defekt auf Selektionsmedium komplementieren. Also wurde in beiden Fällen eine funktionstüchtige rekombinante PEPCase gebildet.

## 3.1.2. Reinigung rekombinanter PEPCasen

Die höchsten Enzymspiegel wurden für die rekombinanten PEPCasen in *E. coli* PCR1 durch die Wachstumsbedingungen bei 28 - 30°C in reichem LB-Medium (pH 7,4; 70  $\mu$ M IPTG; ca. 220 UpM) erhalten. Es fiel auf, daß unter den gleichen Bedingungen die Ausbeute an Enzymaktivität für die ppcA-PEPCase aus *F. trinervia* zweifach größer war als die Ausbeuten für die übrigen PEPCasen. Nach der Induktion der Expression wurden die Bakterien gesammelt und in Homogenisationspuffer aufgenommen. Sie konnten so bei  $-80^{\circ}$ C für mehrere Wochen ohne Aktivitätsverlust der PEPCase gelagert werden. Der effizienteste Aufschluß der Bakterien wurde, im Vergleich zum Ultraschall-Aufschluß (BLÄSING 1995), mit der "French Press" erzielt, die Bakterien durch Scherkräfte aufbricht und die Viskosität des Bakterienlysats herabsetzt.



Abbildung 12: Aufreinigung der rekombinanten PEPCasen. Die rekombinanten PEPCasen wurden in den beschriebenen sequentiellen Schritten gereinigt (siehe Material & Methoden für genaue Aufreinigungsprozedur). Die in 50 % Glycerin gelagerten Enzymproben dienten der Enzymcharakterisierung.

In Vorbereitung zur chromatographischen Aufreinigung der PEPCasen mußte ein Teil der Proteine und die gescherte DNA durch eine differentielle Fällung mit PEG abgetrennt werden. Mit den Proteinen der PEG-Fällung wurden nacheinander eine hydrophobe Interaktionschromatographie, eine Anionenaustausch-Chromatographie und eine Gelfiltration durchgeführt, mit der die Proteine nach Hydrophobizität, Ladung und Größe getrennt werden. Das Schema der Reinigungsprozedur ist in **Abbildung 12** dargestellt.



**Abbildung 13: Dokumentation der Aufreinigung rekombinanter PEPCasen durch SDS-PAGE. A**: Schritte der Aufreinigung am Beispiel des Enzyms FT966. Bahnen 1 bis 3 wurden mit 50 μg, Bahnen 4 und 5 mit 25 μg Protein beladen. Auftrag von links nach rechts: 1. Überstand von Rohextrakt nach Zentrifugation; 2. Sediment der PEG-Fällung; 3. Durchfluß der Phenylsepharose bei Beladung; 4. vereinigte Phenylsepharose Spitzenfraktionen; 5. Superdex 200-Spitzenfraktionen; 6. Molekulargewichtsmarker (MGM). **B:** Aufreinigung der rekombinanten PEPCasen FT965B und FT967C. Aufgetragen sind der Molekulargewichtstandard (MGM), die Rohextrakte (je 50 μg) und die gereinigten Enzymfraktionen in 50 % Glycerin nach Gelfiltration (je 5 μg). Für jedes Enzym wurden zwei unabhängige Bakterienanzuchten und Aufreinigungen durchgeführt (1 und 2).

Als die effektivsten Schritte der Aufreinigungsprozedur erwiesen sich die Chromatographie mit Phenylsepharose CL-4B und die Gelfiltration mit Superdex 200 HR. Die Molekulargewichte der aktiven Enzymfraktionen der Gelfiltration lag bei 440 Kilodalton (KDa). Proteinfraktionen um 220 KDa zeigten keine nachweisbare PEPCase-Enzymaktivität. Die Spitzenfraktionen der Gelfiltration waren frei von anderen Proteinen. Die Enzymisolate konnten in 50 % Glycerin bei -20°C mehrere Monate ohne Aktivitätsverlust gelagert werden. **Abbildung 13 A** dokumentiert exemplarisch die Aufreinigung der rekombinanten PEPCase FT966. Die Reinigungsprozedur wurde früher schon für die ppcA-PEPCasen aus *F. trinervia* (FT966) und *F. pringlei* (FP966) angewendet (SVENSSON ET AL. 1997). Die ppcB- und ppcC-PEPCasen FT965B und FT967C aus *F. trinervia* wurden ebenfalls in *E. coli*-PCR1 überexprimiert und dem Schema für die ppcA-PEPCasen entsprechend isoliert. Die Qualität der Enzymfraktionen des letzten Aufreinigungsschrittes durch Gelfiltration dokumentiert (**Abbildung 13 B**). Die Geldokumentation zeigt, daß die Aufreinigungsstrategie erfolgreich war. Dagegen enthielten die Fraktionen führte und die Aufreinigungsstrategie erfolgreich war. Dagegen enthielten die Fraktionen der ersten Aufreinigung von FT967C Verunreinigungen mit anderen Proteinen.

### 3.1.3. Charakterisierung der Enzyme durch PEP-Substratsättigungskinetiken

Für die Bestimmung der enzymatischen und regulatorischen Eigenschaften der rekombinanten PEPCasen wurden Substratsättigungskinetiken mit Phosphoenolpyruvat (PEP) als Substrat gemessen, die Aufschluß über  $K_{0,5}$ -PEP,  $v_{max}$  und  $k_{kat}$  geben sollten. Glukose-6-Phosphat (G-6-P) ist ein wichtiger allosterischer Aktivator der PEPCase (BAUWE & CHOLLET 1986), weshalb der  $K_{0,5}$ -PEP der Enzyme in Gegenwart dieses Aktivators (5 mM Endkonzentration) bestimmt wurde. Die Konzentration des Kofaktors Mg<sup>2+</sup> und des Kosubstrates HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> im Meßansatz wurde auf je 10 mM eingestellt, um eine Sättigung aller untersuchten Enzyme mit diesen Komponenten zu gewährleisten (NAKAMOTO ET AL. 1983). Die PEPCasen zeigen bei pH 8 ihre maximale Aktivität. Daher wurde dieser pH als Standardbedingung bei Sättigungskinetiken mit dem Substrat PEP eingesetzt. Parallel dazu wurden die Messungen bei pH 7,6 durchgeführt. Dieser pH entspricht eher physiologischen Bedingungen, und bei diesem pH zeigt sich das Enzym wesentlich empfindlicher gegenüber dem Inhibitor L-Malat (RAJAGOPALAN ET AL. 1994). Die Inhibierung der Enzymaktivität durch Malat, d.h. die Bestimmung des I<sub>0,5</sub>-Malat (50 % Inhibierung), wurde daher bei pH 7,6 gemessen.

Zunächst wurde der  $K_m$ -PEP für die einzelnen Enzymkinetiken anhand der Michaelis-Menten-Gleichung berechnet und die Kinetiken für eine bessere Beurteilung in der Eadie-Hofstee-Auftragung verglichen. Die PEP-Sättigungskinetiken des nicht aktivierten Enzyms FP966 und der durch Glukose-6-Phosphat (G-6-P) aktivierten Form folgen der Michaelis-Menten-Gleichung mit einem hyperbolen Kurvenverlauf. Das nicht aktivierte C<sub>4</sub>-Enzym (FT966) verhält sich allosterisch und zeigt einen sigmoiden Kurvenverlauf, der eine positive Kooperativität für die Substratbindung von PEP andeutet. Das aktivierte C<sub>4</sub>-Enzym dagegen folgt der Kinetik nach Michaelis-Menten. Dies wurde schon früher mit Enzymtests an entsalzten Blatt-Rohextrakten für die C<sub>4</sub>-PEPCase aus *F. trinervia* gezeigt (TING & OSMOND 1973, NAKAMOTO ET AL 1983). Die Unterschiede in der Kooperativität des aktivierten und nichtaktivierten C<sub>4</sub>-Enzyms werden in einem Hill-Diagramm deutlich sichtbar. **Abbildung 14** zeigt die Unterschiede im kooperativen Verhalten für die PEP-Kinetiken der ppcA-PEPCasen aus *F. trinervia* und *F. pringlei*.



**Abbildung 14: Einfluß der Kooperativität auf die Kinetikparameter der ppcA-Enzyme FT966 und FP966.** Die PEP-Substratsättigungskinetiken wurden bei pH 8,0 und 25°C gemessen. Die Kinetiken sind im Michaelis-Menten-Plot (**A**) und im Eadie-Hofstee-Plot (**B**) dargestellt. Die Messungen wurden in Abwesenheit des Aktivators G-6-P (gefüllte Vierecke, unterbrochene Linie) und in seiner Anwesenheit (leere Vierecke, durchgezogene Linie) durchgeführt. Die Reaktionskurven wurden durch eine nichtlineare Regressionsanalyse mit der Michaelis-Menten-Gleichung ermittelt (siehe Material und Methoden). Im Fall des nichtaktivierten Enzyms FT966 wird die Abweichung der Meßwerte von dem idealen Verlauf der Kinetik nach Michaelis-Menten gezeigt. Der Hill-Plot für das Enzym FT966 verdeutlicht die positive Kooperativität im nichtaktivierten und die fehlende Kooperativität im aktivierten Zustand. Für beide Zustände ist der Hill-Koeffizient (h) als zusätzlicher Graph in **A** (oberer Teil) dargestellt.

Die Anwendung der Michaelis-Menten-Gleichung führte zu falschen Enzymparametern und war deswegen zur Berechnung der Enzymparameter ungeeignet. Als Konsequenz wurde der  $K_m$ -PEP mit der modifizierten Michaelis-Menten-Gleichung (siehe **Gleichung 6**) als  $K_{0,5}$ -PEP mit dem

Hill-Koeffizienten (h) bestimmt, der den Meßwert für die von PEP abhängige Kooperativität darstellt. Die Gleichungsparameter konnten in einem nichtlinearen Regressionsverfahren durch numerische Annäherung an die Meßpunkte bestimmt werden. Meßpunkte bei kleinsten Substratkonzentrationen unterhalb des K<sub>0,5</sub>-PEP ergaben fehlerhafte Werte, wenn der K<sub>0,5</sub> sehr klein (< 60  $\mu$ M) war, da das Substrat für den Meßvorgang zu schnell verbraucht wurde. Sie fanden bei den Berechnungen keine Berücksichtigung.

(6)  

$$v: \text{ Reaktionsgeschwindigkeit (µmol/Min)}$$
  
 $S: \text{ Substratkonzentration (µM)}$   
 $v_o = v_{\max} \frac{S^h}{S^h + K_{0,5}^h}$   
 $K_{0,5}: \text{ Substrat-Bindekonstante (µM)}$   
 $v_{\max}: \text{ Maximale Reaktionsgeschwindigkeit (µmol/Min)}$   
 $h: \text{ Hill-Koeffizient}$ 

Die Enzymparameter aller in der Arbeit untersuchten Enzyme wurden mit **Gleichung 6** berechnet. Bestimmt wurden die Substrat-Bindekonstante ( $K_{0,5}$ -PEP), die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei Substratsättigung ( $v_{max}$ ) und der Hill-Koeffizient (h), aus denen die Wechselzahl ( $k_{kat}$ ) und die Spezifitätskonstante ( $k_{kat}/K_{0,5}$ ) abgeleitet wurden.

### 3.2. Vergleich der ppcA-, ppcB, und ppcC-PEPCasen aus F. trinervia und F. pringlei

Um die molekulare Evolution der C<sub>4</sub>-PEPCase verstehen zu lernen, sollte die der ppcA-Genklasse zugehörige C<sub>4</sub>-PEPCase aus *F. trinervia* (C<sub>4</sub>) mit der nichtphotosynthetischen PEPCase der orthologen ppcA-Genklasse aus *F. pringlei* (C<sub>3</sub>) und mit den nichtphotosynthetischen Isoformen der ppcB- und ppcC-Genklasse aus *F. trinervia* verglichen werden. Dazu wurde ein Vergleich der Aminosäuresequenzen und der Enzymparameter durchgeführt.

Abbildung 15: nächste Seite: Aminosäuresequenzvergleich der PEPCasen aus *F. trinervia* und *F. pringlei*. Die PEPCase-Sequenzen der ppcA-, ppcB- und ppcC-Genklasse aus *F. trinervia* (FT966A, FT965B, FT967C) und der ppcA-Genklasse aus *F. pringlei* (FP966A) wurden verglichen. Die mit FT966A identischen Aminosäuren sind als Punkte in der Sequenz gekennzeichnet. Die für die C<sub>4</sub>-PEPCase FT966A spezifischen 41 Aminosäuren sind grau hinterlegt. Aminosäuren mit der Funktion der Inhibitorbindung (Aspartat) oder der Substratbindung (PEP und Mg<sup>2+</sup>) sind rot hinterlegt und nach FT966 nummeriert. Sie wurden durch die Kristallisierung der *E. coli*-PEPCase mit Aspartat bzw. Mn<sup>2+</sup> identifiziert (KAI ET AL. 1999; MATSUMURA ET AL. 1999).

	Phosphorylierung					-
FT966A FT965B	1 20 30 A MANRNVEKLASIDAQLRLLVPGKVSEDDKLVEYDALL 3III.	40 LDKFLDILQDLH	50 HGEDLKEAVÇ	60 Q <b>Q</b> CYELSAEYI E	70 EGKHDPKKLEE	80 ELG
FT967C FP966A	C L Q		GT DA	E	H	
FT966A FT965B FT967C FP966A	A         SLLTSLDTGDSIVIAKAFSHMLNLANLAEELQIAYRR           B         SVPV           C         NVP	RIKLK <b>S</b> GDFADH K K	EANATTESDI	EETFKRLVHI	KLNKSPEEVFI	
FT966A FT965B	A KNQTVELVLTAHPTQSVRRSLLQKHGRIRNCLAQLYA	KDITPDDKQELI	DEALHREIQA	AFRTDEIRR	TPPTPQDEMR	AGM
FT967C FP966A	CDFDDD	W <sub>283</sub> PEP-T	asche		P P	
FT966A FT965B FT967C FP966A	A SYFHETIWKGVPKFLRRVDTALKNIGINERFPYNAPL 3V CVV AVV	IQFSSWMGGDRI	DGNPRVTPEN	TRDVCLLAR	4M <b>T</b> SNMYFSQ1 AA AA AS	EED
FT966A FT965B FT967C FP966A	A LMIEMSMWRCNSELRVRAEELYR-TARKDVKHYIEFW 3 .FTDFTARR C .FSDH.SSSKR A .FNSYTARR	K <b>RI</b> PP <b>NQ</b> PYRVI .QVTE .QVTE .QVTE	ILGDVRDKLY	YNTRERSRHLI	AHDIE. AHDVE. AHGIE.	EAV A. S. A.
FT966A FT965B FT967C FP966A	A YTNVEQLLEPLELCYRSLCDCGDHVIADGSLLDFLRQ 3FAR CFAR AF	VSTFGLSLVKLI K R .K	DIRQESDRHI	EVLDAITQHI D D D	GIGSYREWSE E E E	EEK
FT966A FT965B FT967C FP966A	A       RQEWLLAELSGKRPLIGPDLPKTEEVKDCLDTFKVLA         B      AF.SIK.VN         C      SF.PIA.VH         A      F.SVK.VN	ELPSDCFGAYII	ISMATS <b>T</b> SDV P P P	/LAVELLQRE	PEP-Tasche           //HIKHPLRVVE           .V.Q           .V.Q           .V.Q           .V.Q	L <sub>558</sub> PLF
E	E <sub>560</sub> Mg <sup>2+</sup> -Bindung PEP-TascheM <sub>592</sub> D	597Mg <sup>2+</sup> -Bindun	g			
FT966A FT965B FT967C FP966A	A       EKLADLEAAPAAMTRLFSMDWYRNRIDGKQEVMIGYS         B	DSGKDAGRFSA	AWQLYK <b>T</b> QE <b>Ç</b> AE A.E	IVKIAKEFGV LKNVE LINVK IIKVE	/KLVIFHGRGG	GTV • • • •
FT966A FT965B FT967C FP966A	R <sub>641</sub> Aspartat-Bindung GRGGGPTHLALLSQPPDTINGSLRVTVQGEVIEQSFG ID.Q IEH AID.H.	EEHLCFRTLQRI	FCAATLEHGN	INPPISPRPE	VRELMDQMAV( .EQ\ .AEy EQ\	/AT / /
FT966A FT965B FT967C FP966A	A EEYRS <b>V</b> VFKEPRFVEYFRLATPELE <b>F</b> GRMNIGSRPSK 3 .QSI	RKPSGGIESLRA	S/A774 AIPWIFSWTQ A A	OTRFHLPVWLO	GFGAAFKHAIC	QKD Q E K
	K <sub>eoo</sub> Asparta	t-Bindung				
FT966A FT965B FT967C FP966A	A SKNLQMLQEMYKTWPFFRVTIDLVEMVFAKGNPGIAA B SQDD. C IHDD. A SQD.	LNDKLLVSEDLE	RPFGESLRAN VP VS VP	IYEETKNYLLI	KIAGHKDLLEG K K R	GDP
FT966A FT965B FT967C FP966A	R888       Aspartat-Bindung         A       YLKQGIRLRDPYITTLNVCQAYTLKRIRDPNYHVTLR         B       .K.RLKSTL.         C       .R.RLRSF.         A       .K.RIRSI.	PHISKEYAAEPS AEPS SEPSS AAEPS	SKPADELIHI L.H. SY.K. SL.H.	NPTSEYAPGI	LEDTLILTMKO	GIA 
FT966A FT965B FT967C FP966A	N <sub>964</sub> Aspartat-Bindung A AGMQNTG B C A					

## 3.2.1. Aminosäuresequenzvergleich der PEPCasen aus F. trinervia und F. pringlei

Um einen ersten Anhaltspunkt für den Vergleich der PEPCasen zu erhalten, wurde die Aminosäuresequenzen der C<sub>4</sub>-PEPCase FT966 (ppcA) und die der nichtphotosynthetischen PEPCasen FT965 (ppcB), FT967 (ppcC) aus F. trinervia und FP966 (ppcA) aus F. pringlei miteinander verglichen (Abbildung 15). Die C<sub>4</sub>-ppcA-PEPCase aus *F. trinervia* und die orthologe ppcA-PEPCase aus F. pringlei bestehen aus jeweils 966 Aminosäuren und sind zu 95 % sequenzidentisch. Das C<sub>4</sub>-ppcA-Enzym ist mit dem ppcB-Isoenzym (955 Aminosäuren) in 92 % und dem ppcC-Isoenzym (967 Aminosäuren) in 90 % der Aminosäuresequenz identisch. Also ist in F. trinervia das C<sub>4</sub>-Enzym mit dem ppcB-Enzym näher verwandt als mit dem ppcC-Enzym. Untereinander sind diese ppcB- und ppcC-Enzyme zu 94 % identisch. Die jeweils spezifischen Aminosäuren der PEPCasen spiegeln die unabhängige Entwicklung der einzelnen Enzyme wider. 42 von 115 unterschiedlichen Aminosäuren des Sequenzvergleichs sind spezifisch für die C<sub>4</sub>-PEPCase aus F. trinervia und liegen über die ganze Länge des Enzyms verteilt. 15 Aminosäuren sind für das ppcB-Enzym, 40 Aminosäuren für das ppcC-Enzym aus F. trinervia und nur drei für die ppcA-PEPCase aus F. pringlei spezifisch. Die unterschiedliche Aminosäureanzahl der PEPCasen weist auf je eine aminoterminale und eine carboxyterminale Sequenzposition mit einer Insertion bzw. Deletion ("Indel") einer Aminosäure hin. An beiden Stellen fallen mehrere aufeinanderfolgende Serine für die ppcC-PECAse aus F. trinervia auf.

Abbildung 16: Verwandtschaftsanalyse der PEPCase-Isoformen aus *F. trinervia* und *F. pringlei*. Die Aminosäuresequenzen der PEPCasen verschiedener Genklassen (fett gedruckt) wurden mit PILEUP verglichen und eine Analyse der maximalen Wahrscheinlichkeit (Maximum Likelihood-Analyse) mit 1000 "Bootstrap"-Replikaten durchgeführt (siehe Material und Methoden). Astlängen repräsentieren die phylogenetische Distanz in Substitutionen pro 100 Aminosäuren (siehe Maßstab). Als Referenz zu den *Flaveria*-Sequenzen diente die PEPCase aus der C<sub>3</sub>-Pflanze *A. thaliana*.



Um die Entwicklung der verschiedenen PEPCase-Isoformen aus *F. trinervia* und *F. pringlei* aus einer gemeinsamen Urform besser zu verstehen, wurde der Aminosäuresequenzvergleich für die Erstellung eines Verwandtschaftsbaumes herangezogen. Als Referenz diente eine PEPCase von *Arabidopsis thaliana (Brassicaceae)*, die mit den *Flaveria*-PEPCasen einen gemeinsamen Vorfahr gehabt haben sollte. Es fällt auf, daß die ppcA-PEPCase der C<sub>4</sub>-Pflanze *F. trinervia* eine wesentlich höhere Anzahl an Aminosäureaustauschen im Verhältnis zu den übrigen Isoenzymen und besonders im Verhältnis zu dem orthologen Enzym aus *F. pringlei* zeigt. Das weist auf eine deutlich gesteigerte Mutationsrate im Gen für die C<sub>4</sub>-PEPCase hin. Die ppcB-PEPCase aus *F. trinervia* hat sich dagegen gleichlangsam wie die ppcA-PEPCase aus *F. pringlei* weiterentwickelt.

# 3.2.2. Vergleich der Enzymparameter der ppcA-, ppcB- und ppcC-PEPCasen

Ein Vergleich der nichtphotosynthetischen PEPCasen aus *F. trinervia* und *F. pringlei* mit dem C<sub>4</sub>-Enzym aus *F. trinervia* benötigt neben der Sequenzinformation die charakteristischen Eigenschaften der Enzyme. Daher wurden Sättigungskinetiken für das Substrat PEP zunächst bei pH 8,0 für die ppcA-, ppcB- und ppcC-Enzyme aus *F. trinervia* sowie für das ppcA-Enzym aus *F. pringlei* gemessen. Als allosterischer Aktivator der Enzyme wurde Glukose-6-Phosphat (G-6-P) eingesetzt. Anschließend wurden die kinetischen Konstanten K<sub>0,5</sub>-PEP (Substratbindekonstante) und die Wechselzahl k<sub>kat</sub> mit dem Substrat PEP bestimmt. Als Maßstab für die katalytische Effizienz wurde der Quotient aus k<sub>kat</sub> und K<sub>0,5</sub>-PEP (Spezifitätskonstante) gebildet. Eine zweite Meßreihe wurde bei pH 7,6 durchgeführt, da die Inhibierung der Enzyme durch L-Malat miteinander verglichen werden sollte. Bei diesen I<sub>0,5</sub>-Messungen wurde die PEP-Konzentration auf zweimal K<sub>0,5</sub>-PEP bei pH 7,6 eingestellt.

## 3.2.2.1. Bestimmung der Enzymparameter bei pH 8

Zunächst wurden die Enzymparameter pH 8,0 ermittelt (**Tabelle 6**). Betrachtet man die nichtaktivierten PEPCasen, so fällt das C<sub>4</sub>-Enzym FT966 durch einen im Vergleich zu den nichtphotosynthetischen Isoformen FT965B, FT967C und FP966 hohen Wert für K<sub>0,5</sub>-PEP, d.h. eine niedrige Affinität zu PEP, auf. Der K<sub>0,5</sub>-PEP von FT966 (278  $\mu$ M) ist um den Faktor 9,6 größer als der K<sub>0,5</sub>-PEP für das orthologe C<sub>3</sub>-Enzym FP966 (29  $\mu$ M). Der K<sub>0,5</sub>-PEP der ppcB- und ppcC-Enzyme FT965B und FT967C aus *F. trinervia* ist mit 33 bzw. 36  $\mu$ M nahezu identisch niedrig wie der K<sub>0,5</sub>-PEP des ppcA-Enzyms aus *F. pringlei*. Die Aktivierung mit G-6-P induziert bei allen untersuchten Enzymen eine größere Affinität zu PEP, d.h. eine Senkung des K<sub>0,5</sub>-PEP (**Tabelle 6**) Die Aktivierung fällt für die C<sub>4</sub>-PEPCase FT966 mit dem Faktor 4,8 am stärksten aus. Dagegen werden die Enzyme FT965B (Faktor 2,1), FT967C (Faktor 2) und FP966 (Faktor 1,5) verhältnismäßig gleichschwach aktiviert. Der K<sub>0,5</sub>-PEP der aktivierten C<sub>4</sub>-ppcA-PEPCase ist um den Faktor 3 – 4 größer als der K<sub>0,5</sub>-PEP der aktivierten nichtphotosynthetischen PEPCasen.

рН 8,0	Bindekonstante (K <sub>0,5</sub> -PEP) [µM]		Hill-Koeffizient (h) -		Wechs (k <sub>l</sub> [s	selzahl <sub>(at</sub> )	$\begin{array}{c} \textbf{Spezifitätskonstante} \\ \textbf{(k_{kat}/K_{0,5}\text{-}PEP)} \\ [s^{-1}M^{-1}] \end{array}$	
Enzym	- G-6-P	+ G-6-P	- G-6-P	+ G-6-P	- G-6-P	+ G-6-P	- G-6-P	+ G-6-P
FT966A (C <sub>4</sub> )	$278 \pm 4,0$	58 ± 1,8	$1,5\pm0,02$	$1,1\pm0,05$	$49 \pm 2{,}3$	55 ± 2,8	1,8 x 10 <sup>5</sup>	9,5 x 10 <sup>5</sup>
FP966A (C <sub>3</sub> )	$29\pm2{,}2$	$19 \pm 1,5$	$0,\!9\pm0,\!03$	$1,2\pm0,13$	$51 \pm 4,8$	$60\pm5,8$	18 x 10 <sup>5</sup>	31 x 10 <sup>5</sup>
FT965B	$33 \pm 1,5$	$16 \pm 0,2$	$1,\!0\pm0,\!02$	$1,\!1\pm0,\!04$	$154\pm3,\!1$	$164 \pm 4,2$	47 x 10 <sup>5</sup>	$102 \ge 10^5$
FT967C	$36 \pm 1,1$	$18\pm0,8$	$0,\!9\pm0,\!08$	$1,\!0\pm0,\!01$	$108\pm24{,}6$	$114\pm26{,}9$	31 x 10 <sup>5</sup>	61 x 10 <sup>5</sup>

Tabelle 6: Enzymatische Kenngrößen der ppcA-, ppcB- und ppcC-PEPCasen aus *F. trinervia* und *F. pringlei* bei pH 8. Die Enzyme von zwei Präparationen wurden jeweils zweimal vermessen. Die Werte der Parameter sind mit ihrem Standardfehler aufgeführt. Zur Aktivierung der Enzyme wurde 5 mM Glukose-6-Phosphat (G-6-P) verwendet.

Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit der Enzyme bei Substratsättigung wird durch die Wechselzahl (Katalytische Konstante,  $k_{kat}$ ) widergegeben (**Tabelle 6**). Im nichtaktivierten Zustand sind die Wechselzahlen der C<sub>4</sub>-ppcA-PEPCase aus *F. trinervia* ( $k_{kat} = 49 \text{ s}^{-1}$ ) und der orthologen ppcA-PEPCase aus *F. pringlei* ( $k_{kat} = 51 \text{ s}^{-1}$ ) gleichgroß. Die ppcB- und ppcC-Isoenzyme aus *F. trinervia* zeigen jedoch von den ppcA-Enzymen abweichende, um den Faktor 3 bzw. Faktor 2 höhere Wechselzahlen. Die Aktivierung mit G-6-P verursacht bei allen Enzymen eine leichte Erhöhung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit um ca. 10 %. Nur die nichtaktivierte C<sub>4</sub>-PEPCase FT966 zeigt ein stark allosterisches Verhalten in Form einer substratabhängigen positiven Kooperativität, die durch den hohen Hill-Koeffizienten (h = 1,5) verdeutlicht wird. Die Aktivierung des Enzyms durch G-6-P bewirkt den Verlust der Kooperativität (h = 1,1).

Die geringste katalytische Effizienz, d.h. den niedrigsten Quotienten aus  $k_{kat}$  und  $K_{0,5}$ , zeigt die C<sub>4</sub>-ppcA-PEPCase aus *F. trinervia* (**Tabelle 6**). Die katalytische Effizienz des orthologen ppcA-Enzyms aus *F. pringlei* ist dagegen um den Faktor 10 größer. In Bezug auf das C<sub>4</sub>-Enzym hat das ppcB-Enzym die größte katalytische Effizienz (Faktor 26), gefolgt von dem ppcC-Enzym (Faktor 17). Die Aktivierung mit G-6-P steigert die katalytische Effizienz aller PEPCasen. In Bezug auf den nichtaktivierten Zustand wird das C<sub>4</sub>-ppcA-Enzym mit dem Faktor 5,3 stärker aktiviert als das ppcB-Enzym (Faktor 2,2), das ppcC-Enzym (Faktor 2) und das orthologe ppcA-Enzym (Faktor 1,7) aus *F. pringlei*. Den Verhältnissen für die nichtaktivierten Enzyme entsprechend, zeigt aber das C<sub>4</sub>-Enzym im aktivierten Zustand die geringste und das ppcB-Isoenzym, gefolgt von dem ppcC-Isoenzym, die größte katalytische Effizienz.

### 3.2.2.2. Bestimmung der Enzymparameter bei pH 7,6

In der nächsten Versuchsreihe wurden die Enzymparameter bei pH 7,6, sonst aber unter gleichen Bedingungen wie bei pH 8 gemessen. Betrachtet man die nichtaktivierten Enzyme bei pH 7,6, ist die PEP-Bindekonstante ( $K_{0,5}$ -PEP) aller PEPCasen im Vergleich zu pH 8 erhöht (**Tabelle 7**). Die größte pH-Abhängigkeit der PEP-Bindekonstante zeigt das ppcC-Enzym FT967C aus *F. trinervia* mit einem um den Faktor 1,8 größeren  $K_{0,5}$ -PEP.

Wie zu erwarten führt die Aktivierung der Enzyme durch G-6-P bei pH 7,6 zu einer Senkung des  $K_{0,5}$ -PEP aller PEPCasen. Die C<sub>4</sub>-PEPCase FT966 wird im Vergleich zu den anderen Enzymen am stärksten aktiviert (Faktor 3,9). Die Aktivierung ist allerdings deutlich schwächer als bei pH 8,0. Dagegen zeigen das ppcA-Enzym aus *F. pringlei* (Faktor 2,4) und auch die ppcB- (Faktor 2,9) und ppcC-Enzyme (Faktor 3,3) aus *F. trinervia* bei pH 7,6 eine signifikant höhere Aktivierbarkeit als bei pH 8. Dieses ist darin begründet, daß der K<sub>0,5</sub>-PEP der aktivierten Enzyme bei beiden pH-Werten praktisch identisch ist, der K<sub>0,5</sub>-Wert der nichtaktivierten Enzyme dagegen bei der Erniedrigung des pH angestiegen ist. D.h., die C<sub>4</sub>-PEPCase ist in ihrer aktivierten Form im Gegensatz zu den Nicht-C<sub>4</sub>-Enzymen pH-sensitiv.

 Tabelle 7: Enzym-Kenngrößen der ppcA-, ppcB- und ppcC-PEPCasen aus F. trinervia und F. pringlei bei pH

 7,6. Die Enzyme von zwei Präparationen wurden jeweils zweimal vermessen. Die Werte der Parameter sind mit ihrem

 Standardfehler aufgeführt. Zur Aktivierung der Enzyme wurde Glukose-6-Phosphat (G-6-P) verwendet

рН 7,6	Bindekonstante (K <sub>0,5</sub> -PEP) [µM]		Hill-Koeffizient (h) -		Wechs (k <sub>i</sub> [s	selzahl <sub>sat</sub> )	$\begin{array}{c} \textbf{Spezifitätskonstante} \\ \textbf{(k_{kat}/K_{0,5})} \\ [s^{-1}M^{-1}] \end{array}$	
Enzym	- G-6-P	+G-6-P	- G-6-P	+G-6-P	- G-6-P	+G-6-P	- G-6-P	+G-6-P
FT966A (C <sub>4</sub> )	$375\pm4,\!8$	$96 \pm 5,9$	$1,7\pm0,03$	$1,2 \pm 0,03$	48 ± 1,6	$52 \pm 1,1$	1,3 x 10 <sup>5</sup>	5,6 x 10 <sup>5</sup>
FP966A (C <sub>3</sub> )	$38 \pm 1,1$	$16 \pm 0,3$	$1,\!0\pm0,\!02$	$1,\!2\pm0,\!06$	$44 \pm 3,\!4$	51 ± 3,9	$12 \ge 10^5$	$32 \ge 10^5$
FT965B	$44\pm2,\!5$	$15\pm0,8$	$1,1\pm0,05$	$1,1\pm0,05$	$146\pm3,\!5$	$160\pm4{,}3$	$33 \times 10^5$	$108x \ 10^5$
FT967C	$63 \pm 2,4$	$19\pm0{,}5$	$1,0\pm0,02$	$1,1\pm0,02$	$102\pm23{,}0$	$108 \pm 25{,}0$	16 x 10 <sup>5</sup>	59 x 10 <sup>5</sup>

Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit ( $k_{kat}$ ) der nichtaktivierten PEPCasen ist bei pH 7,6 im Vergleich zu pH 8 nicht verändert (**Tabelle 6**). Die Aktivierung mit G-6-P erhöht die Wechselzahl aller Enzyme um ca. zehn Prozent. Die katalytische Effizienz der nichtaktivierten und der aktivierten PEPCasen hängt nur von den Veränderungen der PEP-Bindekonstante ( $K_{0,5}$ -PEP) ab, da wie beschrieben die Wechselzahl ( $k_{kat}$ ) bei pH 7,6 nicht verändert wird. Daher ist nur die katalytische Effizienz der aktivierten C<sub>4</sub>-PEPCase FT966 und des nichtaktivierten ppcB-Enzyms bei pH 7,6 signifikant geringer als bei pH 8. Die Kooperativität des nichtaktivierten C<sub>4</sub>-Enzyms wurde bei pH 7,6 erhöht (h = 1,7). Die ppcB- und ppcC-PEPCase aus *F. trinervia* und das orthologe ppcA-Enzym aus *F. pringlei* zeigen auch bei pH 7,6 keine sigmoiden Kinetiken.

### 3.2.2.3. Messung der Malathemmbarkeit

Der  $I_{0,5}$ -Malat ist der Inhibitor-Bindekonstante, dem K<sub>i</sub>-Malat, unter den gewählten Meßbedingungen direkt proportional, und damit ein vergleichbares Maß für die Malathemmbarkeit der untersuchten Enzyme. Der  $I_{0,5}$  eignet sich daher, um die Malathemmbarkeit der Enzyme aus *F. trinervia* und *F. pringlei* mit den nichtaktivierten ppcA-, ppcB- und ppcC-PEPCasen aus *F. trinervia* und der ppcA-PEPCase aus *F. pringlei* zu vergleichen (**Tabelle 8**).

**Tabelle 8: Malatsensitivität der ppcA-, ppcB- und ppcC-PEPCasen aus** *F. trinervia* **und der ppcA-PEPCase aus** *F. pringlei* **bei pH 7,6.** Die Messungen wurden bei pH 7,6 durchgeführt und Phosphoenolpyruvat (PEP) in der Konzentration von zweimal  $K_{0,5}$ -PEP bei pH 7,6 eingesetzt (siehe Material und Methoden). 40 – 50 mU Enzym wurde bei mindestens sechs verschiedenen L-Malat-Konzentrationen zur Messung der um 50 % reduzierten Enzymaktivität (I<sub>0,5</sub>) herangezogen. K<sub>i</sub>-Malat wurde aus den Werten für I<sub>0,5</sub>-Malat bei pH 7,6 berechnet (Abschnitt 2.3.2.3.).

рН 7,6	50% Inhibierung	Inhibitor-Konstante
	I 0,5-Malat	K <sub>i</sub> -Malat
Enzym	[mM]	[mM]
FT966A (C <sub>4</sub> )	$9{,}4\pm0{,}05$	2,9
FT965B	$0,\!15\pm0,\!003$	0,05
FT967C	$1,8\pm0,4$	0,6
FP966A (C <sub>3</sub> )	$0{,}61\pm0{,}05$	0,2

Wie erwartet zeigt die C<sub>4</sub>-PEPCase aus *F. trinervia* die geringste Malathemmbarkeit. Erst bei Malat-Konzentrationen im mM-Bereich sinkt die Enzymaktivität auf die Hälfte. Das orthologe ppcA-Enzym aus *F. pringlei* ist dagegen 15-fach empfindlicher gegenüber Malat. Überraschenderweise zeigen die ppcB- und ppcC-Isoenzyme aus *F. trinervia* stark verschiedene Werte für den I<sub>0,5</sub>-Malat (**Tabelle 8**). Bei dem ppcB-Enzym wirkt die Malathemmung am effektivsten. Es wird im Vergleich mit der C<sub>4</sub>-ppcA-PEPCase durch eine ca. 60-fach geringere Malatkonzentration gehemmt. Dagegen toleriert das ppcC-Enzym eine nur 5-fach niedrigere Malatkonzentration als das C<sub>4</sub>-Enzym und liegt in der Malathemmbarkeit zwischen den ppcA-Enzym eine *F. trinervia* und *F. pringlei*.

#### 3.3. Identifizierung C<sub>4</sub>-spezifischer Enzymdeterminanten

Der nicht mehr existente Vorfahr der C<sub>4</sub>-PEPCase aus F. trinervia muß enzymatische C<sub>3</sub>-Eigenschaften gehabt haben. Er ist nicht mehr für die Untersuchung der Entwicklung der C4spezifischen Enzymeigenschaften greifbar. Jedoch kann die orthologe ppcA-PEPCase aus F. pringlei, die mit der C<sub>4</sub>-PEPCase die größte Sequenzidentität (96 %) gemeinsam hat und typische C<sub>3</sub>-Enzymeigenschaften in Bezug auf K<sub>0.5</sub>-PEP besitzt, als moderne Referenz zur Identifizierung C<sub>4</sub>-spezifischer Proteinregionen (C<sub>4</sub>-Determinanten) herangezogen werden. Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit findet man in den cDNA-Sequenzen beider ppcA-PEPCasen mehrere konservierte und singuläre Restriktionsschnittstellen, die eine positionsgenaue Rekombination homologer Enzymregionen erlauben. Darauf aufbauend wurde eine Strategie zur Eingrenzung von C<sub>4</sub>-Determinanten verfolgt, in der die Eigenschaften systematisch hergestellter Enzymchimären mit denen der Ausgangsenzyme verglichen werden sollten. Dazu wurden, in einer ersten Austauschreihe, vom Aminoterminus ausgehend Teile des C<sub>3</sub>-Enzyms FP966 sukzessiv gegen die entsprechenden Teile des C<sub>4</sub>-Enzyms FT966 ausgetauscht. In einem parallelen Ansatz wurde die gleiche Strategie mit dem Carboxyterminus als Ausgangspunkt verfolgt. Die chimären PEPCasen wurden als rekombinante Enzyme aus E. coli isoliert und die Substrataffinität (K<sub>0.5</sub>-PEP) und die Wechselzahl (kkat) in Anwesenheit und Abwesenheit des Aktivators G-6-P bestimmt.

# 3.3.1. Aminoterminale Austausche von FP966 ( $C_3$ ) gegen FT966 ( $C_4$ )

Wie in **Abbildung 17** gezeigt wurden dem C<sub>3</sub>-Enzym FP966 vom Aminoterminus ausgehend in vier Schritten erst 296 (Region 1), dann 437 (Region 1+2), 591 (Region 1+2+3) und schließlich 645 Aminosäuren (Region 1+2+3+4) ersetzt. Zunächst werden die PEP-Bindekonstanten (K<sub>0,5</sub>-PEP) der nichtaktivierten Enzymchimären betrachtet (**Tabelle 9**). Der Austausch der ersten Region (FT296FP670) führte im Vergleich mit dem C<sub>3</sub>-Enzym FP966 zu keiner Veränderung des K<sub>0,5</sub>-PEP. Region 1 scheint also keine wichtigen C<sub>4</sub>-Determinanten für den K<sub>0,5</sub>-PEP zu besitzen. Das zweite chimäre Enzym FT437FP529 umfaßt zusätzlich Region 2 aus FT966 und zeigt einen doppelt so hohen K<sub>0,5</sub>-PEP (55  $\mu$ M) wie das C<sub>3</sub>-Ausgangsenzym FP966. Dies weist auf C<sub>4</sub>-Determinanten in Region 2 hin. Der Austausch weiterer 154 Aminosäuren (Region 3) in dem nächsten chimären Enzym FT591FP375 führte zu keiner signifikanten Veränderung des K<sub>0,5</sub>-PEP. Region 3 trägt demnach keine C<sub>4</sub>-Determinanten. Im letzten chimären Konstrukt (FT645FP321) stammt nach dem zusätzlichen Austausch der Region 4 nur noch das letzte carboxyterminale Drittel der Enzymchimäre vom C<sub>3</sub>-Enzym. Der K<sub>0,5</sub>-PEP des Enzym FT645FP321 liegt mit 78  $\mu$ M nur gering höher und ist weit von dem Wert für das C<sub>4</sub>-Enzym FT966 (278  $\mu$ M) entfernt.

Tabelle 9: Konvertierung des C<sub>3</sub>-Enzyms zum C<sub>4</sub>-Enzym I - Aminoterminale Austauschserie. Die aminoterminale Region von 296, 437, 591 und 645 Aminosäuren der C<sub>3</sub>-PEPCase FP966 wurde sukzessive ausgetauscht und PEP-Substratsättigungskinetiken bei pH 8,0 gemessen. Zum Vergleich sind die C<sub>3</sub>-PEPCase FP966 und die C<sub>4</sub>-PEPCase FT966 aufgeführt (fett gedruckt). Je zwei Kinetiken wurden von zwei unabhängigen Enzymisolationen erstellt und die Standardfehler berechnet.

pH 8	Bindeko	Bindekonstante		Hill-Koeffizient		Wechselzahl		Spezifitätskonstante	
	(K <sub>0,5</sub> -	PEP)	(	h)	(k <sub>kat</sub> )		(k <sub>kat</sub>	/K <sub>0,5</sub> )	
	[µ]	M]	-		[s <sup>-1</sup> ]		[s <sup>-1</sup>	M <sup>-1</sup> ]	
Enzym	- Glc6P	+Glc6P	- Glc6P	+Glc6P	- Glc6P	+Glc6P	- Glc6P	+Glc6P	
FP966 (C <sub>3</sub> )	$29 \pm 2,\!2$	19 ± 1,5	$0,9\pm0,03$	$1,2 \pm 0,13$	51 ± 4,8	60 ± 5,8	18 x 10 <sup>5</sup>	31 x 10 <sup>5</sup>	
FT296FP670	$25 \pm 1,2$	$17\pm0,9$	$0,9\pm0,05$	$1,\!2\pm0,\!03$	$50\pm2,7$	$58 \pm 3,3$	$20 \ge 10^5$	34 x 10 <sup>5</sup>	
FT437FP529	$55\pm1,7$	$22\pm0{,}7$	$1,\!3\pm0,\!03$	$1,\!2\pm0,\!05$	$65\pm2,6$	$72\pm2,7$	$12 \ge 10^5$	33 x 10 <sup>5</sup>	
FT591FP375	$51\pm0{,}7$	$19\pm0{,}4$	$1,2\pm0,04$	$1,\!1\pm0,\!02$	$57 \pm 3,2$	$63 \pm 3,7$	11 x 10 <sup>5</sup>	34 x 10 <sup>5</sup>	
FT645FP321	$78\pm3,1$	$25 \pm 1,2$	$1,\!2\pm0,\!04$	$1,\!1\pm0,\!02$	61 ± 1,8	$65 \pm 2,7$	8,0 x 10 <sup>5</sup>	27 x 10 <sup>5</sup>	
FT966 (C <sub>4</sub> )	$278 \pm 4,0$	58 ± 1,8	$1{,}5\pm0{,}02$	$1,1 \pm 0,05$	49 ± 2,3	55 ± 2,8	1,8 x 10 <sup>5</sup>	9,5 x 10 <sup>5</sup>	

Betrachtet man die K<sub>0,5</sub>-PEP-Werte der mit G-6-P aktivierten Enzymchimären (**Abbildung 17**), so fällt nur im Schritt des zusätzlichen Austausches von Region 4 eine unwesentlich Erhöhung des K<sub>0,5</sub>-PEP (25  $\mu$ M) auf, der aber den Wert für das aktivierte C<sub>4</sub>-Enzym (58  $\mu$ M) bei weitem nicht erreicht. Im Carboxyterminus (Region 5) des C<sub>4</sub>-Enzyms scheinen demnach die wichtigsten C<sub>4</sub>-Determinanten für den K<sub>0,5</sub>-PEP enthalten zu sein.

Da das nichtaktivierte C<sub>4</sub>-Enzym FT966 allosterisch ist und PEP positiv kooperativ bindet, das C<sub>3</sub>-Enzym dagegen keine Allosterie zeigt, wurde für alle Enzymchimären der Hill-Koeffizient (h) berechnet. Das Auftreten einer verstärkten Kooperativität sollte als Merkmal einer C<sub>4</sub>-Eigenschaft gewertet werden können. Eine erste Veränderung des Kooperativitätsgrades verdeutlichte der Austausch der Region 2 (FT437FP529). Dennoch zeigte keine Chimäre den Grad der Kooperativität wie das C<sub>4</sub>-Enzym FT966. C<sub>4</sub>-Determinanten für die Enzymkooperativität müssen daher, wie im Falle des K<sub>0.5</sub>-PEP, in der Region 5 liegen.

Weiterhin wurde für alle chimären Enzyme die Spezifitätskonstante für PEP ( $k_{kat}/K_{0,5}$ -PEP) berechnet, die ein Maß für die katalytische Effizienz der Enzyme darstellt. Wie **Tabelle 9** zeigt, spiegeln die Werte der Spezifitätskonstanten im wesentlichen die Veränderungen des K<sub>0,5</sub>-PEP wider, da sich die Wechselzahlen in der Reihe der chimären PEPCasen nur unwesentlich veränderten.



Abbildung 17: Analyse des  $K_{0,5}$ -PEP chimärer PEPCasen zur Lokalisierung C<sub>4</sub>-spezifischer Eigenschaften I. -Aminoterminale Austauschserie. Ausgehend vom Aminoterminus (N) des C<sub>3</sub>-Enzyms FP966 wurden Proteinsegmente (grau) gegen die entsprechenden Segmente aus dem C<sub>4</sub>-Enzym FT966 (weiß) getauscht und die Veränderung der C<sub>3</sub>- zu C<sub>4</sub>-Eigenschaften untersucht. Die für die Unterteilung genutzten Restriktionsendonukleasen wurden mit ihrer Position in der Aminosäuresequenz dargestellt.

# 3.3.2. Carboxyterminale Austausche von FP966 ( $C_3$ ) gegen FT966 ( $C_4$ )

Die Ergebnisse aus der ersten Austauschserie sollten in einer weiteren Experimentreihe überprüft werden, indem vom Carboxyterminus ausgehend in vier Schritten erst 321 (Region 5), dann 375 (Region 5+4), 529 (Region 5+4+3) und schließlich 670 Aminosäuren (Region 5+4+3+2) ersetzt wurden (**Abbildung 18**).

Betrachtet man die nichtaktivierten Enzymchimären, so fallen drei Schritte in der Reihe der Austausche mit signifikant großen Veränderungen der PEP-Bindekonstante (K<sub>0,5</sub>-PEP) auf (**Tabelle 10**). Schon der erste Austausch von 321 carboxyterminalen Aminosäuren des C<sub>3</sub>-Enzyms gegen die entsprechende Region 5 des C<sub>4</sub>-Enzyms verursachte einen starken Anstieg des K<sub>0,5</sub>-PEP von 29  $\mu$ M (FT966) auf 105  $\mu$ M (FP645FT321), d.h. um den Faktor 3,6. Der Austausch von zusätzlichen 54 Aminosäuren (Region 4) brachte keine Veränderung.



Abbildung 18: Analyse des  $K_{0,5}$ -PEP chimärer PEPCasen zur Lokalisierung C<sub>4</sub>-spezifischer Eigenschaften II -Carboxyterminale Austauschserie. Ausgehend vom Carboxyterminus (C) des C<sub>3</sub>-Enzyms FP966 wurden Proteinsegmente (grau) gegen die entsprechenden Segmente aus dem C<sub>4</sub>-Enzym FT966 (weiß) getauscht und die Veränderung der C<sub>3</sub>- zu C<sub>4</sub>-Eigenschaften untersucht. Die konservierte Aminosäure an Position 774 liegt im Carboxyterminus (Kreis).

Eine zweite signifikante Veränderung wurde mit dem Austausch der Region 3 zur Bildung der Enzymchimäre FP437FT529 erreicht, die mit 189  $\mu$ M einen vergleichsweise C<sub>4</sub>-nahen Wert für K<sub>0,5</sub>-PEP zeigt. Schließlich verursachte der zusätzliche Austausch von Region 2, der Schritt von der Chimäre FP437FT529 zur Chimäre FP296FT670, die Veränderung des K<sub>0,5</sub>-PEP auf einen für das C<sub>4</sub>-Enzym FT966 charakteristischen hohen Wert (281  $\mu$ M). Region 5, 3 und 2 enthalten demnach gemeinsam wichtige Determinanten für den K<sub>0,5</sub>-PEP des nichtaktivierten C<sub>4</sub>-Enzyms. Betrachtet man die mit G-6-P aktivierten Enzymchimären (siehe **Tabelle 10**), so veränderte nur der Austausch der Region 2, im Schritt von der Chimäre FP437FT529 zur Chimäre FP296FT670, effektiv den K<sub>0,5</sub>-PEP von einem niedrigen (24  $\mu$ M) zu einem C<sub>4</sub>-spezifisch hohen Wert (63  $\mu$ M). Die wichtigsten C<sub>4</sub>-Determinanten für den K<sub>0,5</sub>-PEP des aktivierten C<sub>4</sub>-Enzyms sollten daher in Region 2 liegen.

Die Berechnung der Spezifitätskonstante ( $k_{kat}/K_{0,5}$ ) bestätigte den Einfluß von Region 5 und Region 3 als Träger von C<sub>4</sub>-Determinanten (**Tabelle 10**). Der Austausch der Region 5 des C<sub>3</sub>-Enzyms gegen die Region aus dem C<sub>4</sub>-Enzym veränderte den Wert für das nichtaktivierte Enzym FP645FT321 um den Faktor 4. Das aktivierte Enzym war nicht betroffen. Der erweiterte Austausch der Region 3 führte zur Chimäre FP437FT529 und bewirkte im Vergleich zur Chimäre FP591FT371 eine signifikante Veränderung der Spezifitätskonstante für das nichtaktivierte und aktivierte Enzym um den Faktor 2. Der zusätzliche Austausch von Region 2 übte nur einen Einfluß auf die Spezifitätskonstante des aktivierten Enzyms FP296FT67 aus und veränderte sie um den Faktor 2 auf den typischen Wert für das C<sub>4</sub>-Enzym FT966. Anhand des Hill-Koeffizienten wurde bei den nichtaktivierten Enzymchimären das Auftreten der C<sub>4</sub>-charakteristischen positiven Kooperativität untersucht. Allein der Austausch der carboxyterminalen Region 5 bewirkte die größte Veränderung des Hill-Koeffizienten (h = 1,3). Der C<sub>4</sub>-typische Wert des Hill-Koeffizienten wurde bei der Chimäre FP437FT529 erreicht, bei der von FP591FT375 ausgehend neben Region 5 und Region 4 zusätzlich Region 3 ausgetauscht wurde.

**Tabelle 10: Konvertierung des C<sub>3</sub>-Enzyms zum C<sub>4</sub>-Enzym - Carboxyterminale Austauschserie.** Die carboxyterminale Region von 321, 375, 529 und 670 Aminosäuren der C<sub>4</sub>-PEPCase FT966 wurde sukzessiv gegen die Fragmente aus der C<sub>3</sub>-PEPCase FP966 ausgetauscht und PEP-Substratsättigungskinetiken bei pH 8,0 gemessen. Je zwei Kinetiken wurden von zwei unabhängigen Enzymisolationen erstellt und die Standardfehler berechnet. Fett gedruckt sind die Ausgangsenzyme für die Konstruktion der chimären Enzyme.

	Bindeko	nstante	Hill-Koeffizient		Wech	selzahl	Spezifitätskonstante	
рН 8	(K <sub>0,5</sub> -PEP)		(h)		(k <sub>kat</sub> )		$(k_{kat}/K_{0,5})$	
	μΝ	μΜ		h		s <sup>-1</sup>		M <sup>-1</sup>
Enzym	- G-6-P	+ G-6-P	- G-6-P	+ G-6-P	- G-6-P	+ G-6-P	- G-6-P	+ G-6-P
FP966 (C3)	29 ± 2,2	19 ± 1,5	0,9 ± 0,03	1,2 ± 0,13	51 ± 4,8	60 ± 5,8	18 x 10 <sup>5</sup>	31 x 10 <sup>5</sup>
FP645FT321	$105\pm2{,}2$	$21\pm0{,}3$	$1,\!3\pm0,\!02$	$1{,}2\pm0{,}04$	$46\pm0{,}9$	$60 \pm 1,2$	4,5 x 10 <sup>5</sup>	29 x 10 <sup>5</sup>
FP591FT375	$107\pm2{,}3$	$24\pm0{,}4$	$1,\!3\pm0,\!02$	$1{,}2\pm0{,}04$	$55\pm3,6$	$71 \pm 4,5$	5,1 x 10 <sup>5</sup>	$30 \ge 10^5$
FP437FT529	$189 \pm 7{,}3$	$24 \pm 1,0$	$1,5\pm0,02$	$1,\!1\pm0,\!01$	$43\pm2{,}0$	$50\pm1,9$	2,3 x 10 <sup>5</sup>	21 x 10 <sup>5</sup>
FP296FT670	$\textbf{281} \pm \textbf{9,9}$	$63 \pm 1,0$	$1,\!4\pm0,\!04$	$1,\!1\pm0,\!07$	$56 \pm 2,1$	$63 \pm 2,\!6$	2,0 x 10 <sup>5</sup>	$10 \ge 10^5$
FT966 (C4)	$278 \pm 4,0$	58 ± 1,8	$1,5\pm0,02$	$1,1 \pm 0,05$	49 ± 2,3	55 ± 2,8	1,8 x 10 <sup>5</sup>	9,5 x 10 <sup>5</sup>

Zusammengefaßt zeigen die beiden Versuchsreihen, daß die Regionen 5 und 2 die wichtigsten C<sub>4</sub>-Determinanten für die PEP-Bindekonstante enthalten. Aber auch die Region 3 und im geringeren Ausmaße Region 4 tragen zum spezifischen  $K_{0,5}$ -PEP des C<sub>4</sub>-Enzyms bei.

## 3.3.3. Welche Rolle spielt die Ser/Ala-Position 774 in Region 5?

Die Untersuchung der Enzymchimären hatte zeigte, daß die Region 5 vermutlich die wichtigste Determinante für die C<sub>4</sub>-Spezifität in Bezug auf den K<sub>0,5</sub>-PEP enthält. Unter den 16 zwischen dem C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-ppcA-Enzym unterschiedlichen Aminosäuren der Region 5 befindet sich eine konservierte Aminosäure an Position 774, die schon früher als C<sub>4</sub>-Determinante diskutiert wurde und die in einem bei allen PEPCasen stark konservierten Sequenzabschnitt liegt (HERMANS & WESTHOFF 1992). Die Sequenzanalyse aller bekannten pflanzlichen PEPCasen zeigt, daß diese Position durch Serin in allen bekannten C<sub>4</sub>-PEPCasen belegt wird. In nahezu allen pflanzlichen Nicht-C<sub>4</sub>-PEPCasen belegt ein Alanin diese Position. Durch gerichtete Mutagenese der ppcA-Enzyme wurde daraufhin geprüft, ob diese Aminosäure, Ser<sub>774</sub> in FT966 (C<sub>4</sub>) und Ala<sub>774</sub> in FP966 (C<sub>3</sub>), eine oder vielleicht die entscheidende C<sub>4</sub>-Determinante der Region 5 darstellt.



Abbildung 19: Analyse des  $K_{0,5}$ -PEP mutierter und chimärer PEPCasen zur Lokalisierung C<sub>4</sub>-spezifischer Eigenschaften III. Der Einfluß der Aminosäure an Position 774 (hängender Kreis) wurde durch Punktmutagenese und in Kombination mit einem Fragment bestehend aus Region 1 bis 4 getestet. Als Referenz sind die Enzyme FP966 und FT966 aufgeführt. Die  $K_{0,5}$ -PEP-Werte wurden bei pH 8,0 bestimmt.

Welchen Einfluß das C<sub>4</sub>-spezifische Ser<sub>774</sub> in einer reinen C<sub>3</sub>-Umgebung ausübt, wurde in einem ersten Ansatz durch den Austausch der Aminosäure Ala<sub>774</sub> des C<sub>3</sub>-Enzyms FP966 gegen Ser<sub>774</sub> getestet (**Abbildung 19** und **Tabelle 11**). Im nichtaktivierten Zustand unterscheidet sich die Mutante FP966-A774S mit einem signifikant erhöhten K<sub>0,5</sub>-PEP (97  $\mu$ M) von dem C<sub>3</sub>-Enzym FP966. Sie erreicht aber nicht den K<sub>0,5</sub>-PEP des C<sub>4</sub>-Enzyms (278  $\mu$ M). Die mit G-6-P aktivierte Enzymmutante zeigte keine signifikante Veränderung des K<sub>0,5</sub>-PEP. Die Mutante hat damit gleiche Eigenschaften wie die Enzymchimäre FP645FT321, die zum größten Teil aus FP966 besteht und nur Region 5 von FT966 enthält.

Daraus kann man folgern, daß Ser<sub>774</sub> die einzige C<sub>4</sub>-Determinante in der Region 5 des nichtaktivierten Enzyms ist. Zur Überprüfung dieses Befundes wurde in der Enzymchimäre FT645FP321, die nur aus der carboxyterminalen Region 5 des C<sub>3</sub>-Enzyms besteht, Ala<sub>774</sub> zu Ser<sub>774</sub> mutiert und die Chimäre FT645FP321-A774S gebildet. Dieses Enzym hat im aktivierten und im nichtaktivierten Zustand die typischen C<sub>4</sub>-Eigenschaften des Enzyms FT966 (**Abbildung 19**).

**Tabelle 11: Einfluß der Aminosäure 774 auf die kinetischen Kenngrößen der ppcA-Enzymchimären.** PEP-Substratsättigungskinetiken wurden bei pH 8,0 durchgeführt und die kinetischen Parameter  $K_{0,5}$ ,  $k_{kat}$  und der Hill-Koeffizient berechnet. Je zwei Kinetiken wurden von zwei unabhängigen Enzymisolationen erstellt und die Standardfehler berechnet.

	Bindekonstante K <sub>0,5</sub> -PEP [μM]		Hill-Ko	effizient	Wech	selzahl	Spezifitätskonstante		
pH 8			e (h)			<sub>kat</sub> )	(k <sub>kat</sub> /K <sub>0,5</sub> ) [s <sup>-1</sup> M <sup>-1</sup> ]		
			-		[s <sup>-1</sup> ]				
Enzym	- Glc6P	+Glc6P	- Glc6P	+Glc6P	- Glc6P	+Glc6P	- Glc6P	+Glc6P	
FP966 (C <sub>3</sub> )	$29 \pm 2,2$	$19 \pm 1,5$	$0,9\pm0,03$	$1,2 \pm 0,13$	51 ± 4,8	60 ± 5,8	18 x 10 <sup>5</sup>	31 x 10 <sup>5</sup>	
FP966-A774S	$97 \pm 9{,}3$	$22\pm0{,}3$	$0,\!9\pm0,\!02$	$1,\!1\pm0,\!08$	$45\pm2,\!1$	$54\pm3,\!5$	4,7 x 10 <sup>5</sup>	25 x 10 <sup>5</sup>	
FT645FP321-A774S	$252\pm1{,}9$	$47\pm0{,}4$	$1,\!4\pm0,\!02$	$1,\!0\pm0,\!04$	$59\pm2,4$	$50\pm2,5$	1,9 x 10 <sup>5</sup>	11 x 10 <sup>5</sup>	
FT966 (C <sub>4</sub> )	$\textbf{278} \pm \textbf{4,0}$	58 ± 1,8	$1,5\pm0,02$	1,1 ± 0,05	49 ± 2,3	55 ± 2,8	1,8 x 10 <sup>5</sup>	9,5 x 10 <sup>5</sup>	
FT966-S774A	$104\pm3{,}0$	$23\pm1{,}0$	$1,\!3\pm0,\!04$	$1,\!1\pm0,\!04$	$47\pm0{,}8$	$51\pm0,6$	4,5 x 10 <sup>5</sup>	22 x 10 <sup>5</sup>	
FP645FT321-S774A	$44 \pm 2,2$	$18 \pm 0,4$	$0,\!8\pm0,\!07$	$1,\!2\pm0,\!04$	$37\pm0,9$	$43 \pm 1,2$	8,5 x 10 <sup>5</sup>	24 x 10 <sup>5</sup>	

Im komplementären Ansatz wurde der Einfluß des C<sub>3</sub>-spezifischen Ala<sub>774</sub> in einer reinen C<sub>4</sub>-Umgebung bestimmt und die Aminosäure Ser<sub>774</sub> in FT966 gegen Ala<sub>774</sub> ausgetauscht. Der K<sub>0,5</sub>-PEP der nichtaktivierten Enzymmutante FT966-S774A war im Vergleich mit dem Wert für das C<sub>4</sub>-Enzym FT966 stark reduziert (104  $\mu$ M). Er erreichte nicht den C<sub>3</sub>-spezifischen Wert des Enzyms FP966. Dagegen zeigte das aktivierte Enzym einen mit dem C<sub>3</sub>-Enzym identischen, niedrigen K<sub>0,5</sub>-PEP (23  $\mu$ M). Mit diesen Kenndaten ist FT966-S774A der Enzymchimäre FT645FP321 vergleichbar, die zum größten Teil aus FT966 besteht und in der nur die carboxyterminale Region 5 gegen die entsprechende Region aus dem C<sub>3</sub>-Enzym FP966 ausgetauscht ist. Die Aminosäure Ala<sub>774</sub> muß auch diesem Ansatz zufolge die einzige Determinante der Region 5 des aktivierten C<sub>4</sub>-Enzyms sein. Zur weiteren Überprüfung wurde die Aminosäure Ser<sub>774</sub> der Enzymchimäre FP645FT321, die nur aus der carboxyterminalen Region 5 des C<sub>4</sub>-Enzyms FT966 besteht, zu Ala<sub>774</sub> mutiert (siehe **Abbildung 19**). Diese Chimäre FP645FT321-S774A zeigt im Vergleich mit der nichtmutierten Form nun auch im nichtaktivierten Zustand die typischen Enzymparameter des C<sub>3</sub>-Enzyms FP966 (**Tabelle 11**).

Zusammengefaßt zeigen die Ergebnisse, daß die Aminosäure an Position 774 die C<sub>4</sub>-Hauptdeterminante für den K<sub>0,5</sub>-PEP in der carboxyterminalen Region 5 ist. Sie wirkt nicht als alleinige C<sub>4</sub>-Determinante für das gesamte Enzym und benötigt dafür das Zusammenspiel mit Determinanten aus dem Aminoterminus.

3.3.4. Sind die Regionen 2 und 5 bzw. die Ser/Ala-Position in Region 5 wirklich die entscheidenden Determinanten für die  $C_4$ - bzw. Nicht- $C_4$ -Spezifität der Enzyme?

Die Aminosäure 774 ist die entscheidende C<sub>4</sub>-Determinante in der carboxyterminalen Region 5. Die Austauschreihen zeigten jedoch, daß Region 2 ebenfalls wichtige Determinanten für den K<sub>0,5</sub>-PEP enthalten kann. Daher sollte die Bedeutung von Region 2 alleine und in Kombination mit der Ser/Ala-Position 774 auf den K<sub>0,5</sub>-PEP geklärt werden. Die Konstrukte wurden in Zusammenarbeit mit Herrn Sascha Engelmann in einem Laborpraktikum hergestellt, konnten aber im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr exprimiert und aufgereinigt werden (siehe **Abbildung 20**).



Abbildung 20: Charakterisierung von Region 2 als C<sub>4</sub>-Determinante. Chimäre ppcA-Enzyme aus FT966 und FP966 wurden mit einem einfachen Austausch von Region 2 (FT296FP141FT529 und FP296FT141FP529) und in Kombination der Punktmutagenese an Position 774 (FT296FP141FT529-S774A und FP296FT141FP529-A774S) hergestellt. Teile des C<sub>4</sub>-Enzyms FT966 (weiß) und des C<sub>3</sub>-Enzyms FP966 (grau) wurden kombiniert.

### 3.4. Evolution der C<sub>4</sub>-PEPCase in *Flaveria* - C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-intermediäre Arten

Die carboxyterminale C<sub>4</sub>-Determinante an Position 774 stellt bezogen auf den K<sub>0,5</sub>-PEP die entscheidende Komponente für die Evolution der C<sub>3</sub>-PEPCase zum C<sub>4</sub>-Enzym dar. Zu welchem Zeitpunkt das Ala<sub>774</sub> in der C<sub>4</sub>-ppcA-PEPCase aus *F. trinervia* zu Ser<sub>774</sub> mutierte, und in welchen Schritten andere Determinanten für die Entwicklung von C<sub>4</sub>-Eigenschaften verändert wurden, ist unbekannt. Die Analyse nah verwandter PEPCasen, die bezogen auf die Enzymparameter intermediäre Eigenschaften zwischen C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-Enzym besitzen, sollte diese Fragen beantworten. Die Gattung *Flaveria* eignet sich besonders gut, um PEPCasen mit intermediären Pflanzen mit unterschiedlich weit fortgeschrittener C<sub>4</sub>-Photosynthese vorliegt (MONSON ET AL. 1986, EDWARDS & KU 1987).

3.4.1. Einteilung von Flaveria-Arten durch Expressionsanalyse der ppcA-Transkripte in Blättern Um die verschiedenen C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-Zwischenformen der Gattung Flaveria in Bezug auf die Expression der ppcA-PEPCasen zu klassifizieren, wurden die Spiegel der mRNA in den Blättern der Arten *F. angustifolia*, *F. pringlei*, *F. cronquistii*, *F. pubescens*, *F. chloraefolia*, *F. anomala*, *F. brownii*, *F. vaginata*, *F. trinervia* und *F. bidentis* mittels Northern-Hybridisierung verglichen (Abbildung 21).



**Abbildung 21: Spiegel der ppcA-Transkripte in Blättern verschiedener** *Flaveria*-Arten. Die Northern-Analyse wurde mit 10 µg Gesamt-RNA aus Blattmaterial mit einem PvuI-XhoI-Fragment der ppcA-cDNA aus pcFpppcA1 (SVENSSON ET AL. 1997) von *F. pringlei* als Sonde durchgeführt. Die Proben sind (von links nach rechts) nach ansteigender Transkriptmenge sortiert. (In Zusammenarbeit mit Udo Gowik).

Abbildung 21 zeigt, daß die vier aufgrund der physiologischen und biochemischen Eigenschaften benannten Gruppen der Flaveria-Arten (MONSON ET AL. 1986) sich deutlich in den Pegeln der ppcmRNA unterscheiden.

## 3.4.2. Isolierung von ppcA-PEPCase-Sequenzen aus F. brownii und F. pubescens

Zunächst sollten cDNA-Klone mit Vollänge für die ppcA-PEPCasen aus *F. brownii* und *F. pubescens* in einem Standardverfahren molekular kloniert werden. Da große Mengen der ppcA-Transkripte in den Blättern der C<sub>4</sub>-Pflanze *F. trinervia* gebildet werden, wurden cDNA-Büchereien aus Blattmaterial von *F. brownii* und *F. pubescens* erstellt und durchmustert. Für die Isolierung von Vollängenklonen wurde der 5'-Bereich des ppcA-cDNA-Klons von *F. trinervia* als Sonde eingesetzt. Aus 44 analysierten ppc-cDNA-Klonen wurde eine cDNA mit Vollänge aus der *F. brownii*-cDNA-Bank isoliert. Mehrere gleichartige Vollängen-cDNA-Klone wurden in der cDNA-Bücherei von *F. pubescens* gefunden. Je ein ppc-cDNA-Klon aus *F. brownii* und aus *F. pubescens* wurde sequenziert und die Restriktionsschnittstellen bestimmt (Abbildung 22).



Abbildung 22: Restriktionskarten der cDNA-Klone pcFpubppcA1 und pcFbppcA1. Die als Sonden genutzten cDNA-Fragmente aus pcFtppc1.1 sind als dicke schwarze Balken gezeichnet. Die proteinkodierende DNA-Sequenz (graue Blöcke) und Restriktionsschnittstellen der cDNAs wurden anhand der Sequenzinformation abgeleitet und sind mit ihren Positionen und Namen der Restriktionsenzyme gekennzeichnet. Die cDNA-Grenzen innerhalb des Klonierungsvektors pBluescript I-SK (Stratagene, USA) sind durch die bei der Klonierung erzeugten äußeren Restriktionsschnittstellen der cDNA angegeben.

Um die isolierten ppc-cDNAs als Mitglieder der ppcA-Genklasse zu identifizieren, wurden die nichttranslatierten 3'-cDNA-Ende mit den 3'-cDNA-Enden aller bekannten PEPCasen aus *Flaveria* verglichen. **Abbildung 23** zeigt, daß die cDNA-3'-Bereiche der neuen PEPCasen in
weiten Teilen mit den 3'-Bereichen der ppcA-PEPCasen aus *F. trinervia* und *F. pringlei* identisch sind, so daß ihre Einstufung als ppcA-PEPCasen nahe liegt.

	1 60	
F+ril	u • • • • • • • • • • • • • • • • • • •	
Fbrol		
FDIOA ForiA		
FpilA		
F pubA		
rtiid Ftric		
runc		
	10	^
Et mi A		U
rtriA Dheel		
FDroA		
FPLIA		
F pubA		
FtriB		
FTTIC	GTCTGTTATGTGTTATCTAATGTTTATTTTCGAGTCGTTGTGGTTGTCTGCCGAGGGAAA	
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	~
		0
FtriA	GTTTGTATGCATCATCAATCTATGCATTTCAGAAGTTGTACTGTGTGCATCATTGATGGT	
FDroA	GTTTGTATGCATCATCAATCCATGCATTGCAGAAGTTGTACTGTGTGCATCATTGATGGT	
FpriA	GTTTGTATTCATCATCAATGCATTGCAGAAGTTGTACTATGTGCATCATTGATGGT	
FpubA	GTGTGTATGCATCATCAATCCATGCATGCAGAAGTTGTACTATGTG <b>CATC</b> ATT <b>GATG</b> GT	
FtriB	TTACCGTCGATCTATGCATTGATGAAGTTGTACCATATG <b>CATC</b> ATC <b>GATG</b> AT	
FtriC	TTTGAGTTGAACCTGCTGCTTGTCGAGGACGTGAAGCGTACCACGTA <b>CATC</b> GTT <b>GATG</b> GT	
	* * * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
	24	0
FtriA	GGTTTATCCAATAAACTAAAGTCTTATTGTACACTTGACTACAAGTGAT- <u>TATATAAA</u> TT	
FbroA	GGTTTATATTATTGTACACTTGAGTACAAGTGAT- <u>TAAATAAA</u> TT	
FpriA	GGTTTATCCAAGAAACTAATGACTTATTGTGCACTTGAATACAAGTGAT- <u>TATATAAA</u> TT	
FpubA	GGTTTATCCAAGAAACTAATGACTTATTGTACACTTGAGTACAAGTGAT- <u>TATATAAA</u> TT	
FtriB	GGTTTATCTATGAAACTAATAACTTGATGTACACTTGATTACAAGTGATATATGTCTCTT	
FtriC	ACCTTGTCCAGGATACAAGTGAATGTTTGTAC <u>TAATAAAT</u> GGTTCACATGTGAA	
	** * * * *** * * ** * *	
	291	
FtriA	GTTGTGCTT-CTACTT	
FbroA	G-TGTGCTTTCTACTT	
FpriA	GTTGTGCTTTCTACTT	
FpubA	G-TGTGCTTTCTGCTT	
FtriB	TCCTTCTTTTTCATTTATTCTAGAACAACTTCTAATCTACTTTTGTTTATC	
FtriC	ACGGTCTTTTTCTGCC	
	**	

Abbildung 23: Vergleich der nicht translatierten 3'-Bereiche bekannter ppc-cDNAs aus *Flaveria*. Stop-Codon und Poly-A-Sequenz sind nicht aufgeführt. Sterne unter den ausgerichteten Sequenzen repräsentieren identische Nukleotide für alle cDNAs. Fett gedruckt ist ein möglicher konservierter Bereich für eine Haarnadelsekundärstruktur in der mRNA. Unterstrichen ist das putative Polyadenylierungssignal der ppcA-PEPCasen. Der Vergleich wurde mit Clustal X (Version 1.8, Standardeinstellungen) berechnet. Die Sequenzübereinstimmungen sind nicht vollständig aufgelöst und wurden teilweilse manuell korrigiert.

Die 3'-Bereiche aller ppcA-PEPCasen enthalten ein konserviertes Sequenzsignal für die Polyadenylierung. Die Polyadenylierungssignale der ppcB- und ppcC-PEPCasen sind dagegen nicht erkennbar oder an einer anderen Stelle am 3'-Ende. Der Vergleich zeigt außerdem, daß die 3'-Bereiche der ppcA-, ppcB- und ppcC-PEPCasen aus *Flaveria* ein konserviertes Sequenzmotiv (CATCxxxGATG) mit einer durch drei Basen getrennten invertierten Wiederholung enthalten (Abbildung 23).

Um die Einstufung der PEPCasen aus *F. brownii* (FB966) und *F. pubescens* (FPUB966) zu bestätigen, wurden ihre Aminosäuresequenzen mit denen aller bisher bekannten PEPCasen aus *Flaveria* verglichen und ein Verwandtschaftsbaum erstellt. Als Referenz diente eine PEPCase aus der C<sub>3</sub>-Pflanze *Arabidopsis thaliana* (*Brassicaceae*), die mit den *Flaveria*-PEPCasen einen gemeinsamen Vorfahr gehabt haben sollte. **Abbildung 24** stellt das Phylogramm dar. Es bestätigt, daß die PEPCasen aus *F. brownii* und *F. pubescens* zu den ppcA-PEPCasen gehören. Sie sind näher mit dem ppcA-Enzym aus *F. pringlei* als mit dem C<sub>4</sub>-Enzym aus *F. trinervia* verwandt. Die PEPCase aus *F. brownii* erfuhr im Vergleich mit dem *F. pubescens*-Enzym eine stärkere Weiterentwicklung.

Abbildung 24: Verwandtschaft der PEPCase-Isoformen aus *Flaveria*. Die bekannten ppc-Aminosäuresequenzen aus *Flaveria* wurden mit PILEUP verglichen und das Phylogramm in einer "Maximum Likelihood"-Analyse mit der nichtphotosynthetischen PEPCase aus *Arabidopsis thaliana* als Referenz erstellt (siehe Material & Methoden). Die ppc-Genklassen sind fett kursiv gedruckt. Die Länge der Äste ist teilweise gekennzeichnet (kursiv). Sie entsprechen der Anzahl der Substitutionen pro 100 Aminosäuren (siehe Maßstab).



# 3.4.3. Primärstruktur-Vergleich der ppcA-PEPCasen aus F. pringlei ( $C_3$ ), F. pubescens ( $C_3$ - $C_4$ ), F. brownii ( $C_4$ -ähnlich) und F. trinervia ( $C_4$ )

Die ppcA-PEPCasen aus *F. pubescens* und *F. brownii* weisen in der Primärsequenz eine Übereinstimmung von 99 % auf. Beide Enzyme ähneln ebenfalls sehr dem *F. pringlei*-Enzym (99 und 98 %). Mit dem C<sub>4</sub>-Enzym aus *F. trinervia* stimmen sie dagegen verhältnismäßig gering in 95 % der Aminosäuren überein. Um Detailunterschiede aufzuspüren und insbesondere die Frage nach der Identität der carboxyterminalen Aminosäure an Position 774 klären zu können, wurden die Aminosäuresequenzen aller vier ppcA-PEPCasen miteinander verglichen.

**Abbildung 25** zeigt, daß die beiden ppcA-PEPCasen aus *F. pubescens* und *F. brownii* an der Position 774 ein Alanin aufweisen. Ihnen fehlt somit die in der C<sub>4</sub>-PEPCase aus *F. trinervia* wirksame carboxyterminale C<sub>4</sub>-Determinante (Serin, **Abschnitt 3.3.**). Es ist daher zu erwarten, daß sogar das Enzym aus der C<sub>4</sub>-ähnlichen Spezies *F. brownii* noch deutliche Eigenschaften eines C<sub>3</sub>-Enzyms aufweist. Weiterhin besitzt das *F. brownii*-Enzym FB966 neun sequenzspezifische Aminosäuren, die eine eigenständige Entwicklung des Proteins wiedergeben. Das *F. pubescens*-Enzym trägt dagegen keine sequenzspezifischen Aminosäuren (**Abbildung 25**).

Abbildung 25: Aminosäuresequenzvergleich der PEPCasen aus *F. brownii* und *F. pubescens* mit den ppcA-PEPCasen aus *F. pringlei* ( $C_3$ ) und *F. trinervia* ( $C_4$ ). Zur Orientierung diente die Sequenz von FT966. Die mit allen anderen Proteinen identischen Aminosäuren sind als Punkte dargestellt.

- Grau hinterlegt sind für das C<sub>4</sub>-Enzym FT966 spezifische Aminosäuren.
- Grün hinterlegt sind Übereinstimmungen der C<sub>4</sub>-PEPCase mit FB966 und FPUB966.
- Gelb hinterlegt sind Aminosäuren von FB966, die mit dem C<sub>4</sub>-Enzym FT966 übereinstimmen.
- Aminosäuren mit der Funktion der Inhibitorbindung (Aspartat) oder der Substratbindung (PEP und Mg<sup>2+</sup>) sind rot hinterlegt und nach FT966 nummeriert. Sie wurden durch die Kristallisierung der *E. coli*-PEPCase mit Aspartat bzw. Mn<sup>2+</sup> identifiziert (KAI ET AL. 1999, MATSUMURA ET AL. 1999).

	Phosphorylierung	
FTRI966 FBRO966 FPUB966 FPRI966	1  S11  20  30  40  50  60  70  80    MANRNVEKLASIDAQLRLLVPGKVSEDDKLVEYDALLLDKFLDILQDLHGEDLKEAVQQCYELSAEYEGKHDPKKLEELG	
FTRI966 FBRO966 FPUB966 FPRI966	SLLTSLDTGDSIVIAKAFSHMLNLANLAEELQIAYRRRIKLKSGDFADEANATTESDIEETFKRLVHKLNKSPEEVFDAL    .VP	
FTRI966 FBRO966 FDUB966	240 KNQTVELVLTAHPTQSVRRSLLQKHGRIRNCLAQLYAKDITPDDKQELDEALHREIQAAFRTDEIRRTPPTPQDEMRAGM	
FPRI966	D.	
FTRI966 FBRO966 FPUB966 FPRI966	W283PEP-Tasche  320    SYFHETIWKGVPKFLRRVDTALKNIGINERFPYNAPLIQFSSWMGGDRDGNPRVTPEVTRDVCLLARMMTSNMYFSQIED  A.    V  A.	
FTRI966 FBRO966 FPUB966 FPRI966	347  400    LMIEMSMWRCNSELRVRAEELYRTARKDVKHYIEFWKRIPPNO  PYRVILGDVRDKLYNTRERSRHLLVDGKSDIPDEAVY    . F.  . V.  . K.  . QV.  TE  . I.  . AH. M.  . D.    . F.  . L.  . R.  . QV.  TE  . R.  . AH. M.  . D.    . F.  . L.  . R.  . QV.  TE  . R.  . AH. M.  . D.    . F.	
FTRI966 FBRO966 FPUB966 FPRI966	480 TNVEQLLEPLELCYRSLCDCGDHVIADGSLLDFLRQVSTFGLSLVKLDIRQESDRHTEVLDAITQHLGIGSYREWSEEKR FDK FC.RDE PEP-Tasche J	g
FTRI966 FBRO966 FPUB966 FPRI966	QEWLLAELSGKRPLIGPDLPKTEEVKDCLDTFKVLAELPSDCFGAYIISMATSTSDVLAVELLQREYHIKHPLRVVPLFE F.SVN.IPC.V F.SV.N.LPC.V	
	PEP-Tasche M <sub>592</sub> D <sub>597</sub> Mg <sup>2+</sup> -Bindung 640	
FTR1966 FBRO966 FPUB966 FPR1966	KLADLEAAPAAMTRLFSMDWYRNRIDGKQEVMIGYSDSGKDAGRFSAAWQLYKTQEQIVKTAKEFGVKLVIFHGRGGTVG S.A.I.A.A.I.A.A.A.A.A.A.A.A.A.A.A.A.A.A.	
	R <sub>641</sub> Aspartat-Bindung 720	
FTRI966 FBRO966 FPUB966 FPRI966	RGGGPTHLALLSQPPDTINGSLRVTVQGEVIEQSFGEEHLCFRTLQRFCAATLEHGMNPPISPRPEWRELMDQMAVVATE LHH	
FTRI966 FBRO966 FPUB966 FPRI966	S/A774    800      EYRSVVFKEPRFVEYFRLATPELE    FGRMNIGSRPSKRKPSGGIESLRAIPWIFSWTQTRFHLPVWLGFGAAFKHAIQKDS	
FTRI966 FBRO966 FPUB966 FPRI966	Knlomloemyktwpffrvtidlvemvfakgnpgiaalndkllvsedlrpfgeslranyeetknyllkiaghkdllegdpy  880	
FTRI966 FBRO966 FPUB966 FPRI966	Base  Aspartat-Bindung  960    LKQGIRLRDPYITTLNVCQAYTLKRIRDPNYHVTLRPHISKEYAAEPSKPADELIHLNPTSEYAPGLEDTLILTMKGIAA  9   RA RS   RS RS	
Aspartat-Bind FTRI966	dungN <sub>964</sub> GMQNTG 966	

FTR1966 GMONTG FBR0966 ..... FPR1966 ....

#### 3.5. Ansätze zu einer Phylogenie der C<sub>4</sub>-PEPCase der Gräser

Fossilen Funden und Sequenzanalysen zufolge stellt die Familie der Gräser (*Monocotyledonae*, *Poaceae*) im Vergleich zu den *Dikotyledonae* die älteste Gruppe mit C<sub>4</sub>-Pflanzen dar. C<sub>4</sub>-Pflanzen findet man in den Unterfamilien *Arundinoideae*, *Chloridoideae* und *Panicoideae* (**Abschnitt 4.4**.). Die Entwicklung von C<sub>3</sub>- zu C<sub>4</sub>-Pflanzen erfolgte in den *Poaceae* wahrscheinlich mehrfach unabhängig voneinander (HATTERSLEY 1987). Über die PEPCasen der C<sub>4</sub>-Gräser ist nur wenig bekannt, d.h. nur von einer Unterfamilie, den *Panicoideae*, liegen C<sub>4</sub>-PEPCase-Sequenzen von Mitgliedern der Untergruppe *Andropogoneae* vor (*Zea*, *Saccharum* und *Sorghum*). Um diese Lücke zu schließen, wurde eine Zwei-Stufen-Strategie verfolgt. Aus den *Chloridoideae*, der Schwestergruppe der *Panicoideae*, sollte erstmals eine C<sub>4</sub>-PEPCase molekular über ein Standardverfahren kloniert werden. Da dieses Verfahren zu arbeits- und zeitaufwendig ist, um für die Erhebung einer repräsentativen C<sub>4</sub>-PEPCase-Sequenzbank angewendet zu werden, sollte zusätzlich nach einer Schnellklonierungsmethode für die Isolierung weiterer PEPCase-Sequenzen gesucht werden.

## 3.5.1. Isolierung einer PEPCase des C<sub>4</sub>-Grases Chloris gayana

Die Spezies *Chloris gayana* gehört innerhalb der *Chloridoideae* zu der Untergruppe *Chlorideae*. *C. gayana* gehört dem PCK-Typ der C<sub>4</sub>-Photosynthese an (METCALFE 1960, ANDERSON 1974). Ursprünglich aus Südafrika stammend, wird das Gras ("Rhodes grass") auf mehreren Kontinenten kultiviert und als Futtergras verwendet (WATSON & DALLWITZ 1992).

Um eine C<sub>4</sub>-PEPCase aus *C. gayana* zu klonieren, wurde eine größenfraktionierte cDNA-Bücherei aus Blattmaterial erstellt und mit einem cDNA-Fragment der C<sub>4</sub>-PEPCase aus *S. bicolor* (C<sub>4</sub>) als Sonde durchmustert. 96 Phagen der Primärsichtung wurden mit einer PCR-Analyse (Primerpaar: SK-Primer und NT-Primer 2) auf Vollängenklone überprüft. 17 Phagen wurden sekundär gesichtet, die Phagemide isoliert und nach einer Restriktionskartierung vier Vollängen-cDNA-Klone am 3'-Ende ansequenziert. In der Restriktionskartierung zeigten alle Vollängenklone das gleiche Spaltungsmuster. Daher wurde die cDNA eines Plasmidklons, pcChgppc1, vollständig und doppelsträngig sequenziert. Der nichttranslatierte 5'-Bereich umfaßt 19 Nukleotide bis zum ATG-Startcodon. Die proteinkodierende Sequenz besteht aus 2865 Basenpaaren, entsprechend 955 Aminosäuren, ohne Stopcodon. Der nichttranslatierte 3'-Bereich weist bis zum PolyA-Bereich 252 Basenpaare, inklusive Stopcodon, auf. Die vollständige DNA- und Aminosäuresequenz ist im **Anhang B** aufgeführt. **Abbildung 26** zeigt die Restriktionskarte der cDNA für pcChgppc1.



Abbildung 26: Restriktionskarte der ppc1-cDNA aus *C. gayana*. Die proteinkodierende Bereich ist als grauer Balken dargestellt. Die Restriktionsschnittstellen sind mit ihren Namen und in Relation zur Sequenzlänge gekennzeichnet. In der Primärsichtung wurde das cDNA-Fragment einer *Sorghum* ppc-cDNA (Klon HHU2) als Sonde (schwarzer Balken) eingesetzt, deren Zielbereich im 3'-Ende der cDNA liegt. Die Primer (schwarze Pfeile) wurden für die PCR-gestützte zweite Vollängen-Durchmusterung von Phagenklonen eingesetzt. Die äußeren Schnittstellen sind die bei der Klonierung erzeugten Insertionsschnittstellen für den Klonierungsvektor pBluescript I SK(-).

## 3.5.2. Aminosäuresequenzvergleich und Verwandtschaftsanalyse der C<sub>4</sub>-PEPCasen

Um weitere Hinweise auf eine Funktion der C. gavana-PEPCase als C<sub>4</sub>-Enzym zu finden, wurde die Aminosäuresequenz mit allen bekannten pflanzlichen PEPCase-Sequenzen verglichen. Innerhalb des stark konservierten carboxyterminalen Sequenzblockes, mit Serin bzw. Alanin als Determinanten für C<sub>4</sub>- und C<sub>3</sub>-spezifische Enzymeigenschaften, enthält die klonierte PEPCase an Position 772 ein Serin. Damit reiht sich die klonierte PEPCase in die Gruppe der C<sub>4</sub>-PEPCasen der monokotylen und dikotylen C<sub>4</sub>-Pflanzen ein, die jeweils ein Serin an dieser Position besitzen. Der Aminosäuresequenzvergleich mit allen bekannten Gras-PEPCasen ordnet die PEPCase aus C. gayana eindeutig den C<sub>4</sub>-Enzymen aus Sorghum, Saccharum und Zea zu. Die phylogenetische Stellung der PEPCase aus Chloris gayana und auch der neuen im Stammbaum aller bekannten PEPCasen zu finden, wurde in einer Stammbaumanalyse bestimmt. Dazu wurde ein Vergleich mit den Aminosäuresequenzen aller pflanzlichen PEPCasen erstellt, deren Vollständigkeit bekannt ist. In den Sequenzvergleich wurden, neben den neuen ppc-Sequenzen aus Chloris und Flaveria, die PEPCase-Sequenzen von drei Arten der dikotylen Gattung Alternanthera (Amaranthaceae) eingebunden, in der A. pungens die C4-Spezies darstellt (unveröffentlichte Sequenzdaten von Udo Gowik, dieses Institut). Das Phylogramm zeigt Abbildung 27. Als Bezugspunkt ("outgroup") fungiert die C<sub>4</sub>-PEPCase von S. bicolor.



**Abbildung 27: Phylogenetische Analyse pflanzlicher PEPCasen.** C<sub>4</sub>-PEPCasen sind fett gekennzeichnet. Vertreter der Genklassen aus der Gattung *Flaveria* sind ebenfalls fett geschrieben. 45 vollständige ppc-Proteinsequenzen wurden mit PILEUP (GCG Vers. 10) unter Standardbedingungen verglichen. Nachdem Regionen mit Insertionen oder Deletionen entfernt wurden, blieb ein Sequenzblock von 905 Aminosäuren für die phylogenetische Analyse übrig. Er wurde mit ProtML und NJDist (MOLPHY Vers. 2.3b3, ADACHI & HASEGAWA 1994, SAITOU & NEI 1987) einer Schätzung der maximalen Wahrscheinlichkeit unter Verwendung der JTT-F-Aminosäure-Substitutionsdatenmatrix (JONES ET AL. 1992) bei 10<sup>3</sup> "Bootstrap"-Replikaten unterworfen. Für die Darstellung des Phylogramms mit TreeView (Vers. 1.6.2, PAGE 2000) wurde die C<sub>4</sub>-PEPCase aus *Sorghum* als Wurzel ausgewählt. Zur phylogenetischen Analyse der PEPCase-Proteinsequenzen wurden die Einträge folgender GenBank-Zugriffsnummern verwendet: *C. gayana* C<sub>4</sub>: **AF268091**; *S. bicolor* 1 C<sub>4</sub>: **X17379** (X63756); *S. officinarum* 1 C<sub>4</sub>: **AJ293346**; *Z. mays* 1 C<sub>4</sub>: **X15283** (X15642 &

X15239); O. sativa: AF271995; S. bicolor: X55664 (X65137); Z. mays: AB012228; B. napus: D13987; V. planifolia 1 CAM: X87148; A. arborescens CAM: E12959; M. crystallinum 1 CAM: X13660 (X14587); A. hypochondriacus C<sub>4</sub>: L49175; A. pungens C<sub>4</sub>: Udo Gowik; A. sessilis: Udo Gowik; A. tenella: Udo Gowik; G. hirsutum: AF998939; S. officinarum 2: M8666; V. planifolia 2: X87149; P. abies: X79090 (AF159051); T. aestivum: AJ007705; S. bicolor 3: X59925; Z. mays 3: X61489; G. max 1: D10717; G. max 2: AB008540; G. max 3: D13998; L. corniculatus: AF135371; M. sativa : M83086; P. sativum: D64037; V. faba: AJ011302; N. tabacum: X59016; L. esculentum 1: AJ243417; S. tuberosum 1: AJ011844; L. esculentum 2: AJ243416; S. tuberosum 2: X67053 (X90982); M. crystallinum 2: X14588; A. thaliana: AF071788 (BAA97057); B. juncea 1: AJ223497; B. juncea 2: AJ223496; F. trinervia ppcC: AF248080; F. trinervia ppcB: AF248079; F. trinervia ppcA C<sub>4</sub>: X61304 (X64143); F. australasica ppcA C<sub>4</sub>: Z25853; F. pringlei ppcA: Z48966 (X64144); F. pubescens ppcA: diese Arbeit; F. brownii ppcA: diese Arbeit.

Die phylogenetische Analyse der pflanzlichen PEPCase-Proteinsequenzen (**Abbildung 27**) gruppiert die PEPCase aus *C. gayana* (*Chloridoideae*) zur distinkten Gruppe der C<sub>4</sub>-PEPCasen aus der Gras-Unterfamilie *Panicoideae*. Die Verwandtschaft der C<sub>4</sub>-PEPCasen der *Panicoideae* untereinander ist höher als zu der PEPCase aus *C. gayana*. Der Vergleich der vorliegenden Sequenzdaten der klonierten PEPCase aus *C. gayana* mit den bisher bekannten C<sub>4</sub>-PEPCasen der Gräser spricht für eine Funktion des Enzyms im C<sub>4</sub>-Photosynthesestoffwechsel dieser Pflanze.

## 3.5.3. Etablierung einer schnellen Klonierungsmethode für ppc-cDNA

Die Motivation für die Entwicklung einer schnellen Methode zur Klonierung von PEPCasen lag in der aufwendigen Prozedur für die Herstellung und Durchmusterung von cDNA-Büchereien bis zum molekularen Klonierung einer gesuchten Vollängen-cDNA. Zudem verlangen Standardmethoden relativ große Mengen aufgereinigter PolyA<sup>+</sup>-RNA. Als Alternative zum Standardklonierungsverfahren bietet sich die Amplifizierung von ppc-cDNA durch die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) an. Meist dienen stark konservierte Bereiche innerhalb der proteinkodierenden Genregion der Gewinnung interner Partialsequenzen. Für phylogenetische und biochemische Analysen werden jedoch die vollständigen proteinkodierenden Regionen benötigt. Da die nichttranslatierten 5'- und 3'-Enden der cDNA meist sehr variabel und daher unbekannt sind, wird der proteinkodierende Bereich der cDNA müssen dann über weitere Schritte isoliert werden.

Das hier entwickelte Konzept zur Klonierung vollständiger ppc-cDNA-Sequenzen durch die PCR-Methode beginnt mit der Klonierung der 5'- und 3'-Enden der mRNA. Zu Beginn wird die Ausgangs-mRNA-Population in eine repräsentative doppelsträngige cDNA-Population umgewandelt. Es bietet sich dafür die PCR-basierte SMART-Technologie der Firma Clontech an, die auf Vollängen-cDNA-Sequenzen selektiert (**Material und Methoden**). Die spezifische Amplifizierung der 5'- und 3'-Enden der ppc-cDNA beruht auf einer inversen PCR-Technik, die mit entgegenläufigen Primern arbeitet. Bereiche aus dem Amino- und Carboxyterminus der PEPCasen werden für die Generierung degenerierter Primer (NT-Primer und CT-Primer) gewählt, die relativ konserviert für eine systematische Gruppe wie die der Gräser sind. Aus den isolierten 5'- und 3'-Sequenzen können cDNA-spezifische Primer hergestellt werden, um in einer Standard-PCR aus der repräsentativen cDNA-Bücherei Vollängen-cDNA einer gesuchten PEPCase zu klonieren.

Die entwickelte Methode wurde an den C<sub>4</sub>-Gräsern *Panicum antidotale* Retz. (*Poaceae; Panicoideae; Neurachneae*) getestet (**Abbildung 33**). *P. antidotale* ist ein nichtwinterfestes mehrjähriges C<sub>4</sub>-Gras (stark verwurzelt, mit kurzen, dicken Rhizomen. "Blue Panicgrass". Herkunft: Indien, 1912 nach Australien eingeführt). *N. munroi* ist eine C<sub>4</sub>-Pflanze vom NADP-ME-Typ. Die Blätter besitzen eine zusätzliche Schicht von Bündelscheidenzellen (Alloteropsis). Die Gattung *Neurachne* enthält neben C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-Pflanzen mit *N. minor* auch eine C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-intermediäre Pflanze (WATSON & DALLWITZ 1992; Internetdatenbank: *http://biodiversity.uno.edu/delta/*).

## 3.5.3.1. Anwendung der inversen-cDNA-PCR auf P. antidotale und N. munroi

Für die inverse PCR mußten in einem ersten Schritt ein Satz degenerierter Primer für die Amplifizierung der cDNA-Enden ausgesucht werden. Dazu wurde ein Sequenzvergleich mit 33 bisher bekannten vollständigen cDNA-Sequenzen pflanzlicher PEPCasen durchgeführt und stark konservierte Sequenzbereiche anhand der Konsensussequenz identifiziert. Zur Generierung der Primer wurden drei konservierte Sequenzblöcke an den Enden der cDNA-Konsensussequenz ausgesucht, die auf die Gras-ppc-cDNAs reduziert wurden. Sie ließen eine relativ niedrige Degeneration der Primer und die Amplifizierung möglichst kurzer 5'- und 3'-Enden zu. Eine Primerkonsensussequenz wurde im 3'-Bereich kurz vor dem Stop-Codon und zwei Primerkonsensussequenzen im 5'-Bereich der proteinkodierenden cDNA-Sequenzen gefunden. Die abgeleiteten NT- und CT-Primer sind in **Tabelle 12** aufgeführt.

**Tabelle 12: Degenerierte ppc-spezifische Primer für die inverse PCR-Strategie.** Die Primer wurden für den Carboxyterminaus (CT-Primer) und den N-Terminus der Gras-PEPCasen konzipiert. Unter "Sequenz" ist zunächst die konservierte Aminosäuresequenz, dann die dazugehörige DNA-Sequenz und zuletzt der synthetisierte Primer aufgeführt. DNA-Code:  $\mathbf{R} = A+G$ ;  $\mathbf{Y} = C+T$ ;  $\mathbf{M} = A+C$ ;  $\mathbf{S} = C+G$ ;  $\mathbf{B} = C+T+G$ ;  $\mathbf{D} = A+T+G$ ;  $\mathbf{K} = G+C+T$ ;  $\mathbf{H} = A+C+T$ ;  $\mathbf{V} = A+C+G$ ;  $\mathbf{N} = A+C+G+T$ .

ppc-Primer	Sequenz	Ausrichtung
	EDTXIXTMKG	
	5´-GARGAYACNYTBATYYTNACHATGAARGGN-3´	
CT-Primer	5 <sup>-</sup> -GA <b>R</b> GACACMCT <b>S</b> AT <b>YY</b> T <b>S</b> ACMATGAA <b>R</b> GG-3 <sup>-</sup>	zur 3'-UTR
	W M G G D R D G N P 5´-TGGATGGGNGGNGAYCGNGAYGGHAAYCCN-3´	
NT-Primer 1	3 <sup>-</sup> -CCTACCCMCCACTRGCRCTACCDTTAG-5 <sup>-</sup>	zum Startcodon
	H M L N L X N X A E E 5 <sup>°</sup> -CA <b>y</b> Atgct <b>y</b> Aa <b>yytnkch</b> aa <b>yytn</b> gc <b>y</b> ga <b>r</b> ga <b>r</b> -3 <sup>°</sup>	
NT-Primer 2	3 <sup>-</sup> -GTRTACGARTTRRANCGRTTRRANCGRCTYCT-5 <sup>-</sup>	zum Startcodon

Anhand der Restriktionskartierung wurden für die cDNA-Fragmentklone von *P. antidotale* und *N. munroi* je zwei Klassen unterteilt. Je zwei Klone dieser Klassen, d.h. vier cDNA-Klone für 5'- und 3'-cDNA-Enden insgesamt, wurden daher von den Enden einzelsträngig ansequenziert. Die Sequenzierung und Sequenzanalyse der klonierten PCR-cDNA-Fragmente bestätigte die erfolgreiche molekulare Klonierung der 5'- und 3'-Endsequenzen von ppc-cDNA. Die überlappenden Sequenzinformationen aus einer Einzelstrangsequenzierung konnten zu einer Gesamtsequenz zusammengesetzt werden (**Anhang C**) und wurden auf proteinkodierende Abschnitte überprüft. Jede klonierte DNA enthält die Endbereiche für das 5'- und das 3'-Ende einer ppc-cDNA. Dazu gehört das 3'-Ende einer proteinkodierenden Sequenz, ein 3'- untranslatierter Bereich mit dem Poly-A-Schwanz, eine SfiI-Schnittstelle, ein 5'- untranslatierter Bereich und eine proteinkodierende Teilsequenz. In keinem Fall konnte ein PCR-Fragment nachgewiesen werden, das aus einem 5'- und 3'-Ende unterschiedlicher ppc-cDNA-Spezies besteht. Nur in einem Fall befindet sich in der SfiI-Schnittstelle ein kleines zusätzliches Fragment mit SfiI-Schnittenden.

#### 3.5.3.2. Analyse der klonierten cDNA-Enden aus P. antidotale und N. munroi

Die nichttranslatierten cDNA-Sequenzbereiche sind die neu gewonnenen Bezugspunkte zur PCRgestützten Klonierung von Vollängen-cDNA einer C<sub>3</sub>- oder C<sub>4</sub>-PEPCase. Für die gezielte Vollängenklonierung einzelner PEPCasen müssen die identifizierten cDNA-Enden in verschiedene Klassen eingeteilt werden. Um die PEPCase-Fragmente in unterschiedliche Gruppen der Gras-PEPCasen einzuordnen, wurden die aminoterminalen Proteinsequenzen aus den 5'- cDNA-Enden miteinander verglichen (ClustalX-Vergleich, **Anhang C**). Aus den cDNAs der Klonpaare Nm02/Nm06, Nm04/Nm10 bzw. Pa08/Pa10 wurden identische Aminosäuresequenzen abgeleitet. *P. antidotale* und *N. munroi* weisen daher mindestens drei bzw. zwei Klassen verschiedener cDNA-Sequenzen auf. Weiterhin wurde eine Verwandtschaftsanalyse der Aminosäuresequenzen aus *P. antidotale* und *N. munroi* zusammen mit den bisher bekannten Gras-PEPCasen durchgeführt (**Abbildung 28**). Sie bestätigt die vorgenommene Klasseneinteilung für die PEPCasen aus *P. antidotale* und *N. munroi*.



Abbildung 28: Stellung der PEPCasen aus *P. antidotale* und *N. munroi* im Verwandtschaftsbaum der Gras-PEPCasen. Die aus *N. munroi* und *P. antidotale* ermittelten PEPCasen sind mit ihren Klonnummern angegeben. Die C<sub>4</sub>-PEPCasen sind grau hinterlegt. Die aus den 5'-cDNA-Enden abgeleiteten Aminosäuresequenzen wurden mit ClustalX verglichen. Das Phylogramm wurde nach der "Neighbour Joining"-Methode aus einem Sequenzblock von 92 Aminosäuren berechnet und eine "Maximum Likelihood"-Analyse zur Vertrauensabschätzung der Astverzweigungen (in %) durchgeführt (Material und Methoden). Die PEPCase aus der dikotylen Pflanze *Arabidopsis thaliana* diente als Referenz. Die evolutionäre Distanz ist in Substitutionen pro 100 Aminosäuren (siehe Maßstab) angegeben.

## 4. Diskussion

Die C<sub>4</sub>-PEPCase ist der Nachfolger einer in ihren enzymatischen und regulatorischen Eigenschaften veränderten Urform mit C<sub>3</sub>-Enzymeigenschaften. Während der Evolution monokotyler und dikotyler C<sub>4</sub>-Pflanzen wurden die Enzymeigenschaften der C<sub>4</sub>-PEPCase an die Bedürfnisse der C<sub>4</sub>-Photosynthese angepaßt. Daher unterscheidet sich die Enzymatik und Regulation der PEPCase aus Blättern von C<sub>3</sub>- und C<sub>4</sub>-Pflanzen (TING & OSMOND 1973, O'LEARY 1984, CHOLLET ET AL. 1996). Bis jetzt sind die molekularen Grundlagen der spezifischen C<sub>4</sub>-Enzymeigenschaften unbekannt. Die vergleichende molekulare und biochemische Charakterisierung der PEPCase-Enzymfamilie aus C<sub>4</sub>-Pflanzen und ihrer nächstverwandten C<sub>3</sub>-Pflanzen sollte einen Hinweis auf die einzelnen Schritte der Evolution spezifischer C<sub>4</sub>-Enzymeigenschaften geben. In der vorliegenden Arbeit wurde daher die Gattung *Flaveria* als Modellsystem der C<sub>4</sub>-Photosynthese ausgewählt und die molekulare Evolution der C<sub>4</sub>-PEPCase aus *F. trinervia* (C<sub>4</sub>) untersucht.

• Der Ursprung der C<sub>4</sub>-PEPCase (ppcA) wurde mit Hilfe der ppcB- und der ppcC-Isoform aus der C<sub>4</sub>-Pflanze *F. trinervia* bestimmt. Auf der Grundlage rekombinanter Proteine wurden die enzymatischen und regulatorischen Eigenschaften der PEPCase-Isoformen ermittelt und jene Enzymeigenschaften festgestellt, die während der Evolution der C<sub>4</sub>-PEPCase verändert wurden.

• Aus der C<sub>4</sub>-PEPCase aus *F. trinervia* und der orthologen C<sub>3</sub>-PEPCase aus *F. pringlei* wurden chimäre PEPCasen hergestellt und die Determinanten der C<sub>4</sub>-Enzymeigenschaften grob lokalisiert. Die Feinkartierung einer C<sub>4</sub>-Determinante wurde durch gerichtete Mutagenese vorgenommen.

• Um die schrittweise Evolution der C<sub>4</sub>-Enzymeigenschaften der PEPCase in *Flaveria* festzustellen, wurden ppcA-PEPCasen aus den C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-intermediären Pflanzen *F. pubescens* und *F. brownii* isoliert. Die analysierten Sequenz- und Enzymeigenschaften wurden mit den bekannten ppcA-PEPCasen aus *F. pringlei* und *F. trinervia* verglichen.

• Das Verständnis von der Phylogenie der C<sub>4</sub>-PEPCase der Gräser ist gering. Daher wurde eine C<sub>4</sub>-PEPCase aus dem chloridoiden C<sub>4</sub>-Gras *Chloris gayana* kloniert und mit den bekannten C<sub>4</sub>-PEPCasen der panicoiden Gräsern verglichen.

## 4.1. Evolution der PEPCase-Isoformen in *F. trinervia* (C<sub>4</sub>)

Bisher waren nur die C<sub>4</sub>-ppcA-PEPCase aus *F. trinveria* und das orthologe Enzym aus *F. pringlei* bekannt (SVENSSON ET AL. 1997). Die Klonierung der ppcB- und der ppcC-PEPCase aus *F. trinervia* (KARIN ERNST, dieses Institut) vervollständigte den ersten Satz aller exprimierten PEPCasen einer dikotylen C<sub>4</sub>-Pflanze. Der Aminosäuresequenzvergleich aller PEPCase-Isoformen aus *F. trinervia* und der ppcA-PEPCase aus *F. pringlei* hebt die sehr nahe Verwandtschaft (> 90 % Sequenzidentität) der PEPCasen aller Genklassen hervor. Die bekannten PEPCase-Isoformen aus C<sub>4</sub>-Gräsern sind dagegen nicht derartig nah verwandt (DONG ET AL. 1998). In *F. trinervia* muß die Evolution der C<sub>4</sub>-PEPCase daher ein relativ junges Ereignis darstellen.

Wo liegt der evolutionäre Ursprung der C<sub>4</sub>-PEPCase? Die phylogenetische Analyse verdeutlicht, daß sowohl die ppcB- als auch die ppcA-PEPCase aus einer Genduplikation entstand. Ihr gemeinsamer Vorfahr (ppcB\*) leitete sich von dem Vorfahr (ppcC\*) der heutigen ppcC-PEPCase ab. Das Modell für die phylogenetische Entwicklung der ppcA-PEPCase in *F. trinervia* ist in **Abbildung 29** widergegeben. Die Existenz der ppcA-PEPCase in *F. pringlei* beweist, daß die Ausbildung aller drei Genklassen der Artentstehung von *F. trinervia* und *F. pringlei* vorausging. Die ppcA-PEPCase wurde in *F. trinervia* nach der Abspaltung von der ppcB-Genklasse als freie Form an die Bedürfnisse des C<sub>4</sub>-Stoffwechsels angepaßt. Es gibt deutliche Hinweise, daß in *F. trinervia* das ppcA-Gen nochmals dupliziert wurde, da verschiedene ppcA-cDNA-Klone isoliert wurden (POETSCH ET AL. 1991).



Abbildung 29: Ein Modell für die phylogenetische Entwicklung der ppc-Genfamilie in Flaveria. Genduplikationsereignisse sind als Verzweigung und die Artentstehung durch Pfeile gekennzeichnet. Der Photosynthesemodus ist farblich angegeben (gelb:  $C_3$ -Photosynthese; grün:  $C_4$ -Photosynthese). Die ppcA-Genklasse in *F. trinervia* (fett gedruckt) besteht aus mehr als einem Gen.

Warum blieb die ppcA-PEPCase in *F. pringlei* und anderen Nicht-C<sub>4</sub>-Pflanzen der Gattung *Flaveria* erhalten (siehe **Kapitel 4.3.**), und welche Funktion übt sie dort heute aus? Die ppcB-PEPCase *F. trinervia* und die ppcA-PEPCase aus *F. pringlei* entwickelte sich seit der Trennung von ihrem letzten gemeinsamen Vorläufer relativ langsam (**Abbildung 16**). Aufgrund dieser Tatsache könnte das ppcA-Enzym aus *F. pringlei* die gleiche Aufgabe wie das ppcB-Enzym aus *F. trinervia* ausüben. Im Vergleich dazu wurde die C<sub>4</sub>-ppcA-PEPCase aus *F. trinervia* einem erhöhten Selektionsdruck ausgesetzt, der sich in der mehr als dreifach höheren Aminosäure-Substitutionsrate seit der Abspaltung der ppcA- von der ppcB-Linie äußert und eng mit der schnellen Entwicklung spezifischer C<sub>4</sub>-Enzymeigenschaften zusammenhängt.

In welchen Enzymparametern unterscheiden sich die PEPCase-Isoformen aus F. trinervia? Zunächst fällt die ppcB- und die ppcC-PEPCase aus F. trinervia durch den niedrigen K<sub>0.5</sub>-PEP und die geringe Aktivierbarkeit mit Glukose-6-Phosphat (G-6-P) auf. Diese Isoformen verhalten sich daher wie klassische C3-PEPCasen (TING & OSMOND 1973) und gleichen in den Eigenschaften der ppcA-PEPCase aus F. pringlei. Der K<sub>0.5</sub>-PEP der C<sub>4</sub>-ppcA-PEPCase aus F. trinervia ist dagegen sehr hoch und wird effektiv durch die Aktivierung mit G-6-P verringert. Die starke pH-Abhängigkeit des K<sub>0,5</sub>-PEP, die Kooperativität der Substratbindung und die starke Aktivierbarkeit durch G-6-P stellen ein weiteres Merkmal der C<sub>4</sub>-PEPCase dar. Spezifische Determinanten sollten darum in dem C<sub>4</sub>-Enzym die pH-Abhängigkeit der PEP-Substratbindung und der allosterischen Aktivierung kontrollieren. Es fällt auf, daß die spezifische Aktivität (k<sub>kat</sub>) der orthologen ppcA-PEPCasen aus F. trinervia und F. pringlei nahezu identisch ist. Sie ist aber dreimal kleiner als die spezifische Aktivität der ppcB- und der ppcC-Isoform aus F. trinervia. D.h., die Katalyse der orthologen ppcA-PEPCasen ist wenig effizient. Die SDS-PAGE zeigt, daß die niedriger bestimmte spezifische Aktivität der ppcC-PEPCase auf eine Verunreinigung der Enzymisolate zurückzuführen ist. Die Spezifitätskonstante (kkat/K0.5-PEP) verdeutlicht weiterhin, daß die C<sub>4</sub>-PEPCase viel ineffizienter als die orthologe Form aus F. pringlei arbeitet. Die geringe Malathemmbarkeit ist eine weitere spezifische Eigenschaft der C<sub>4</sub>-PEPCase aus F. trinervia, die für die Funktion des Enzyms bei der hohen Malatkonzentration des C<sub>4</sub>-Zyklus notwendig ist (HATCH 1987). Die ppcB- und der ppcC-Isoformen aus F. trinervia sind dagegen viel empfindlicher gegenüber Malat, wenn auch die ppcC-Isoform eine signifikant geringere Malatinhibierung als die ppcB-Isoform zeigt. Diese Isoformen sollten daher unterschiedliche Aufgaben im Stoffwechsel ausüben. Der phylogenetischen Nähe entsprechend ähnelt die ppcA-PEPCase aus F. pringlei in ihrer Malathemmbarkeit der ppcB-PEPCase aus F. trinervia.

Welche Funktion üben die nichtphotosynthetischen PEPCase-Isoformen im Stoffwechsel von *F. trinervia* aus? Die Gewebe- bzw. Zellspezifität der ppcB- und ppcC-PEPCase ist in *F. trinervia* noch nicht untersucht worden. Transkriptanalysen zeigen die ubiquitäre Verteilung dieser Isoformen in Blatt, Sproß und Wurzel. Die erhöhte Expression in Sproß und Wurzel läßt auf eine besondere Funktion in diesen Organen schließen (ERNST & WESTHOFF 1997). Promotorstudien mit Fusionsgenen aus dem ppcB-Promotor und einem Reportergen lokalisierten die ppcB-Genaktivität im Phloemgewebe der ganzen Pflanze und in den Wurzelspitzen (ERNST & WESTHOFF 1997). Die ppcB-Isoform könnte über die Malatsynthese Protonen für die Beladung des Phloems mit Saccharose bereitstellen (VANBEL 1993). Im Wurzelgewebe wird Malat für die Aminosäuresynthese und für die Aufnahme von Ionen aus dem Boden benötigt (MARTINOIA & RENTSCH 1994, LÓPEZ-MILLÁN ET AL. 2000). Die relativ geringe Malatsensitivität der ppcC-PEPCase läßt auf eine Funktion in einer Stoffwechselsituation schließen, in der höhere Malat-Konzentrationen als bei der ppcB-Isoform erreicht werden. Promotorstudien wurden jedoch noch nicht durchgeführt.

Von der ppcB- und der ppcC-PEPCase aus *F. pringlei* ist weder die Proteinsequenz noch die gewebe- bzw. zellspezifische Genexpression bekannt. Als orthologe Partner der ppcB- und der ppcC-PEPCase aus *F. trinervia* könnten sie ähnliche enzymatische und regulatorische Charakteristika zeigen (HERMANS & WESTHOFF 1990, ERNST & WESTHOFF 1997). *F. pringlei* und *F. trinervia* unterscheiden sich in der Expression der ppcB- und ppcC-Gene im Wurzelgewebe (ERNST & WESTHOFF 1997). Veränderte Enzymeigenschaften der ppcB- und ppcC-Isoform in *F. pringlei* sind daher nicht auszuschließen.

Was läßt sich aus den Enzymeigenschaften der untersuchten PEPCasen zur Evolution der C<sub>4</sub>-PEPCase aus *F. trinervia* ableiten? Die Enzymeigenschaften der ppcA-PEPCase aus *F. pringlei* stimmen noch heute weitgehend mit den Eigenschaften der nichtphotosynthetischen ppcB- und ppcC-Isoform aus *F. trinervia* überein. Die niedrige spezifische Enzymaktivität der orthologen ppcA-PEPCasen wurde nach der Abspaltung der ppcA-Genklasse von der ppcB-Genklasse im gemeinsamen Vorfahr von *F. trinervia* und *F. pringlei* etabliert. Die geringe Effizienz war vermutlich eine Voraussetzung für den Erhalt der ppcA-Isoformen und für den Erwerb von C<sub>4</sub>-Enzymeigenschaften. Eine zusätzlich exprimierte PEPCase mit geringer Effizienz interferiert weniger mit dem Grundstoffwechsel. Für die Funktion im C<sub>4</sub>-Zyklus wird die geringe Effizienz der C<sub>4</sub>-PEPCase durch die Erhöhung der Enzymkonzentration ausgeglichen, die typisch für die Mesophyllzellen in C<sub>4</sub>-Pflanzen ist. Erst während der Evolution der *F. trinervia*-Linie folgte die Selektion weiterer C<sub>4</sub>-spezifischer Determinanten der ppcA-PEPCase. Sie betraf die Erhöhung des  $K_{0,5}$ -PEP, die Erhöhung der Kooperativität der Substratbindung und die Erhöhung der Aktivierbarkeit durch G-6-P. Um auch bei den hohen Malatkonzentrationen des C<sub>4</sub>-Zyklus arbeiten zu können, wurde die Malatsensititität der C<sub>4</sub>-Isoform stark herabgesetzt.

### 4.2. Determinanten spezifischer C<sub>4</sub>-Eigenschaften in der ppcA-PEPCase aus F. trinervia

Zusammen heben der phylogenetische Vergleich und die Enzymcharakterisierung hervor, daß die ppcA-PEPCase aus *F. pringlei* den idealen Ersatz für den letzten gemeinsamen C<sub>3</sub>-Vorfahr der C<sub>4</sub>-ppcA-PEPCase aus *F. trinervia* darstellt. Die Erhöhung des K<sub>0,5</sub>-PEP scheint eine wichtige Anpassung der C<sub>4</sub>-ppcA-PEPCase aus *F. trinervia* an die Bedürfnisse der C<sub>4</sub>-Photosynthese zu sein. Die starke Regulation des K<sub>0,5</sub>-PEP durch Glukose-6-Phosphat (G-6-P) ist eine weitere wichtige Anpassung des C<sub>4</sub>-Enzyms. Mit der Hilfe der orthologen ppcA-PEPCase aus *F. trinervia* und *F. pringlei* wurden daher die C<sub>4</sub>-Determinanten des K<sub>0,5</sub>-PEP und der Aktivierung mit G-6-P näher untersucht.

Die ppcA-PEPCasen wurden zur groben Lokalisierung der C<sub>4</sub>-Determinaten in fünf Regionen unterteilt. Zuerst wurden zwei Sätze chimärer PEPCasen aus der C<sub>4</sub>-PEPCase (FT966) und der orthologen C<sub>3</sub>-PEPCase (FP966) erstellt und charakterisiert (**Kapitel 3.3.**). Die systematische Analyse der chimären PEPCasen führte zur Identifizierung von zwei Primärsequenzabschnitten, Region 2 und Region 5, in denen C<sub>4</sub>-Determinanten den K<sub>0,5</sub>-PEP und die Aktivierung durch G-6-P modulieren. Region 2 umfaßt die interne Sequenz der Aminosäuren 296 bis 437, Region 5 die carboxyterminalen Aminosäuren 645 bis 966. Region 5 bestimmt haupsächlich den K<sub>0,5</sub>-PEP, interagiert dafür aber mit Region 2. In Region 2 liegen die Determinanten für die Regulation des K<sub>0,5</sub>-PEP durch den allosterischen Aktivator G-6-P.

HERMANS & WESTHOFF (1992) postulierten C<sub>4</sub>-spezifische Aminosäuren für alle C<sub>4</sub>-PEPCasen. Tatsächlich ist Serin 774 in der carboxyterminalen Region 5 der C<sub>4</sub>-PEPCase aus *F. trinervia* und in allen anderen bekannten C<sub>4</sub>-PEPCasen konserviert. In der C<sub>3</sub>-PEPCase aus *F. pringlei* und in allen anderen Nicht-C<sub>4</sub>-PEPCasen ist dagegen ein Alanin 774 stark konserviert. Die Ausnahme bildet ein Prolin in der C<sub>3</sub>-PEPCase aus der Erbse (*Pisum sativum*). Durch gerichtete Mutagenese wurde daher der Einfluß der Aminosäure 774 auf den K<sub>0,5</sub>-PEP und auf die G-6-P-Aktivierung näher untersucht. Der alleinige Austausch von Ala<sub>774</sub> gegen Ser<sub>774</sub> in dem C<sub>3</sub>-Enzym FP966 (FP966-A774S) übte einen moderaten Einfluß auf den K<sub>0,5</sub>-PEP und keinen Einfluß auf die Aktivierung mit G-6-P aus. Nur die Kopplung von Ser<sub>774</sub> mit den ersten vier Regionen von FT966 (FT645FP321-A774S) führte zu den Eigenschaften des C<sub>4</sub>-PEPCase. Im umgekehrten Fall erzwang der alleinige Austausch von Ser<sub>774</sub> gegen Ala<sub>774</sub> in der C<sub>4</sub>-PEPCase FT966 (FT966-S774A) einen intermediären K<sub>0,5</sub>-PEP. Der K<sub>0,5</sub>-PEP des aktivierten Enzyms wurde dagegen vollständig verändert. Erst die Kopplung von Ala<sub>774</sub> an die ersten vier Regionen aus FP966 (FP645FT321-S774A) führte zu C<sub>3</sub>-Eigenschaften in Bezug auf den K<sub>0,5</sub>-PEP. Anhand der Resultate aus der Feincharakterisierung wurde die Aminosäure 774 als C<sub>4</sub>-Hauptdeterminante der Region 5 identifiziert, die nicht ohne die Interaktion mit dem Aminoterminus auskommt. Wie die geringe Änderung der Wechselzahl k<sub>kat</sub> bei den chimären Enzymen zeigt, beeinflußt die Aminosäure 774 hauptsächlich die Substrataffinität des Enzyms zu PEP und deren Modulation durch den allosterischen Aktivator G-6-P.

Um den Einfluß der Region 2 auf den  $K_{0,5}$ -PEP und auf die G-6-P-Aktivierbarkeit genauer zu prüfen, wurden Enzymchimären erstellt, die nur aus dem Austausch von Region 2 bestehen. Zusätzlich wurde der Austausch von Region 2 mit der Mutagenese der Aminosäure 774 kombiniert (**Abbildung 23, Kapitel 3.3.4.**). Sie wurden im Rahmen einer institutseigenen Diplomarbeit (ENGELMANN 2001) charakterisiert. Die Ergebnisse legen dar, daß Region 2 alleine einen signifikanten Einfluß auf den K<sub>0,5</sub>-PEP und die Aktivierbarkeit durch G-6-P ausübt. Doch nur in Kombination mit der gerichteten Mutagenese der Aminosäure 774 wird eine nahezu vollständige Veränderung beider Enzymparameter erreicht. Region 2 und die Aminosäure 774 stellen daher die C<sub>4</sub>-Hauptdeterminanten für den K<sub>0,5</sub>-PEP und die Aktivierung durch G-6-P dar.

Wie wirkt die Aminosäure 774 als C<sub>4</sub>-Determinante? KAI ET AL. (1999) zeigte anhand der Kristallstruktur der *E. coli*-PEPCase, daß zwei flexible Schlaufen zum katalytischen Zentrum gehören und die Türen eines Reaktionsraumes bilden. Nur die Struktur der ersten Schlaufe wurde im Komplex mit dem Inhibitor Aspartat bestimmt. Die zweite Schlaufe liegt in direkter aminoterminaler Nachbarschaft zur stark konservierten  $\alpha$ -Helix, in der Ser<sub>774</sub> bzw. Ala<sub>774</sub> sitzt.

Abbildung 30: Serin<sub>774</sub> stabilisiert den Verankerungspunkt der flexiblen, katalytisch aktiven Schlaufe 2. Die Abbildung wurde aus der Überlagerung der Kristallstruktur der *E. coli* PEPCase (unterbrochene Struktur) und der Primärstruktur der C<sub>4</sub>-PEPCase aus *F. trinervia* mit Swiss-MODEL berechnet (*http://www.expasy.ch*) und mit der Hilfe des Swiss-PdbViewer (*http://www.expasy.ch*) dargestellt. Die Aminosäure Serin<sub>774</sub> bildet im Vergleich zu einem Alanin<sub>774</sub> eine zusätzliche Wasserstoffbrücke (grün) mit dem Sauerstoff (rot) der Amidbindung einer Aminosäure der gleichen  $\alpha$ -Helix (rot-orange) aus.



Eine Erklärung für die Wirkung des Ser<sub>774</sub> in den C<sub>4</sub>-PEPCasen liegt in Ausbildung einer zusätzlichen Wasserstoffbrücke durch die Hydroxylgruppe des Aminosäurerests, zu der Alanin nicht fähig ist (**Abbildung 30**). Sie erlaubt die Stabilisierung der  $\alpha$ -Helix, an der die flexible katalytische Schlaufe 2 aufgehängt ist. Durch eine verminderte Flexibilität der Schlaufe 2 könnte der Zugang des Substrates zum katalytischen Zentrum behindert sein. Welchen genauen Einfluß das Ser<sub>774</sub> anstelle von Ala<sub>774</sub> in C<sub>4</sub>-PEPCasen auf die Katalyse ausübt, sollte die Strukturanalyse einer C<sub>4</sub>-PEPCase und einer nah verwandten C<sub>3</sub>-Isoform klären.

Was kann der Vergleich der Aminosäuresequenzen über die Determinanten der Region 2 aussagen? Region 2 enthält dreizehn Aminosäuren, die sich in der C<sub>3</sub>- und der C<sub>4</sub>-ppcA-Isoform unterscheiden. Die Aminosäure 347 (Lysin: C<sub>4</sub> bzw. Arginin: C<sub>3</sub>) wurde durch HERMANS & WESTHOFF (1992) als generelle C<sub>4</sub>-Determinante in Erwägung gezogen. Dies gilt weiterhin nur für das Modellsystem *Flaveria*, aber nicht für andere C<sub>4</sub>-PEPCasen aus dikotylen Pflanzen, wie z.B. *Amaranthus hypochondriacus*. Position 347 liegt jedoch innerhalb von Region 2 in einer zwischen bakteriellen und pflanzlichen PEPCasen variablen Region und könnte an der Bindung des allosterischen Aktivators G-6-P beteiligt sein.

Aus der Struktur der *E. coli*-PEPCase läßt sich ein Vorschlag zur Interaktion von Region 2 und der carboxyterminalen C<sub>4</sub>-Determinante Ser<sub>774</sub> ableiten. **Abbildung 31** verdeutlicht, daß Region 2 und die katalytische Schlaufe 2 in der Kristallstruktur über Wasserstoffbrücken in Verbindung stehen. Die Bindung des Aktivators G-6-P an den hypervariablen Bereich der Region 2 könnte zu einer Konformationsänderung führen, die auf die katalytische Schlaufe 2 übertragen wird und den K<sub>0,5</sub>-PEP beeinflußt. Die strukturelle Überlagerung der pflanzlichen PEPCasen mit der *E. coli*-PEPCase ist in der Region 2 wegen der variablen Region nicht möglich. Die variable Region entspricht dem Sequenzabschnitt zwischen  $\alpha$ -Helix 11 und  $\alpha$ -Helix 13 im *E. coli*-Enzym (KAI ET AL. 1999). Möglicherweise ist wegen dieser fehlenden Sequenzhomologie die bakterielle PEPCase nicht durch G-6-P aktivierbar. Die Tatsache, daß die C<sub>4</sub>-PEPCasen mono- und dikotyler Pflanzen durch unterschiedliche Aktivatoren beeinflußt werden, stellt einen Hinweis auf die Bedeutung der variablen Region als Bindungsort für allosterische Aktivatoren dar (O'LEARY 1982, RAJAGOPALAN 1994). Jedoch existiert kurz vor dem carboxyterminalen Ende der pflanzlichen PEPCasen ein wesentlich variablerer Sequenzabschnitt.



Abbildung 31: Die Struktur der PEPCase aus *E. coli* als Modell der Interaktion von C<sub>4</sub>-Determinanten der Region 2 und Region 5. Die Struktur der  $\beta$ -Faltblätter (grüne Pfeile) und ausgewählte Teile der  $\alpha$ -Helices (rot) sind dargestellt. Die Interaktion der katalytischen Schlaufe 2 mit der Region 2 über Wasserstoffbrücken (grün) ist gekennzeichnet. Die für die Bindung des Inhibitors L-Aspartat (gelb) verantwortlichen Aminosäuren sind mit namentlich gekennzeichnet. Die Abbildung wurde mit dem Programm Swiss-PdbViewer (*http://www.expasy.ch*) aus den Daten der kristallisierten *E. coli*-PEPCase (KAI ET AL. 1999, BERMAN ET AL. 2000) erstellt.

Welche Determinanten bestimmen die geringe Malatinhibierung der C<sub>4</sub>-PEPCase? Die C<sub>4</sub>-Determinanten für eine hohe Malat-Toleranz und die Beeinflussung durch den allosterischen Aktivator G-6-P wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter untersucht. Die Sequenzanalyse der *Flaveria*-PEPCasen weist im Zusammenhang mit den bekannten Strukturdaten der *E. coli*-PEPCase jedoch auf mindestens drei Aminosäurepositionen hin, die für die C<sub>4</sub>-PEPCase aus *F. trinervia* spezifisch sind. Sie könnten aufgrund ihrer sterischen Anordnung einen Einfluß auf die Bindung von Malat ausüben. KAI ET AL. (1999) zeigten anhand der dreidimensionalen Struktur der *E. coli*-PEPCase, daß dort die Aminosäuren Lys<sub>773</sub>, Arg<sub>832</sub>, Arg<sub>587</sub> und Asn<sub>881</sub> den Inhibitor L-Aspartat binden. Arg<sub>587</sub> gehört zur hochflexiblen Schlaufe 1 des katalytischen Zentrums (**Abbildung 31**). Diese vier Aminosäuren entsprechen den Aminosäuren Lys<sub>829</sub>, Arg<sub>888</sub>, Arg<sub>641</sub> und Asn<sub>964</sub> in den ppcA-PEPCasen aus *Flaveria*. Vergleicht man alle bekannten PEPCasen aus *Flaveria* mit der Aminosäuresequenz des Enzyms aus *E. coli*, fällt die C<sub>4</sub>-PEPCase aus *F. trinervia* besonders auf. In der unmittelbaren Umgebung der Aminosäure Arg<sub>888</sub> sind die Aminosäuren an Position 884 und 890 verändert. Die Aminosäuren Arg<sub>884</sub> und Ser<sub>890</sub> der Nicht-C<sub>4</sub>-PEPCasen sind durch Gly<sub>884</sub> und Pro<sub>890</sub> ersetzt. Auch in der unmittelbaren Umgebung von Lys<sub>829</sub> liegt in der C<sub>4</sub>-PEPCase ein Asn<sub>831</sub>, in allen anderen PEPCasen aus *Flaveria* ein Asp<sub>831</sub>. Die spezifisch hohe Malat-Toleranz des C<sub>4</sub>-Enzyms aus *F. trinervia* wird möglicherweise durch die Aminosäuren Asn<sub>831</sub>, Gly<sub>884</sub> und Pro<sub>890</sub> verursacht, die den malatbindenden Aminosäuren sterisch nahestehen. Die Bedeutung dieser Aminosäuren für die Malathemmbarkeit ließe sich experimentell durch eine Punktmutagenese klären, in der die spezifischen Aminosäuren des C<sub>4</sub>-Enzyms von *F. trinervia* gegen die des C<sub>3</sub>-Enzyms aus *F. pringlei* getauscht würden.

## 4.3. Intermediäre ppcA-PEPCasen in Flaveria - F. brownii und F. pubescens

Die Evolution der C<sub>4</sub>-Enzymeigenschaften kann mit der Hilfe der ppcA-PEPCasen aus unterschiedlich weit entwickelten C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-intermediären *Flaveria*-Arten schrittweise erfaßt werden. *F. pubescens* (C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-intermediär) und *F. brownii* (C<sub>4</sub>-ähnlich) wurden ausgewählt, um unterschiedlich weit entwickelte, orthologe ppcA-PEPCasen zu klonieren. Im Vergleich mit C<sub>3</sub>-Arten aus *Flaveria* wurden in den Blättern von *F. pubescens* und *F. brownii* erhöhte Transkriptspiegel für die ppc-mRNA nachgewiesen. In den Blättern dieser Pflanzen wurde bereits früher eine erhöhte PEPCase-Enzymaktivität festgestellt (NAKAMOTO ET AL. 1983, BAUWE & CHOLLET 1986).

*F. pubescens* und *F. brownii* werden aufgrund von CO<sub>2</sub>-Gaswechsel- und  $\delta^{13}$ C-Messungen den C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-intermediären Pflanzen zugerechnet, wobei *F. brownii* eher zu den C<sub>4</sub>-Spezies zählt (APEL & MAASS 1981, KU ET AL. 1983, HOLADAY ET AL. 1984). Während *F. pubescens* und *F. brownii* zur phylogenetischen Gruppe der *Flaveria*-Arten mit 5 bis 6 Phyllarien gehören, ist die am höchsten entwickelte C<sub>4</sub>-Pflanze *F. trinervia* der Gruppe mit 3 bis 4 Phyllarien zugeteilt (POWELL 1978). *F. brownii* unterscheidet sich zusätzlich durch ihre ppc-Genstruktur (HERMANS & WESTHOFF 1990) sowie als einzige mehrjährige "Fast-C<sub>4</sub>"-Pflanze (POWELL 1978) von *F. trinervia*. Daher könnte es in *Flaveria* zwei unabhängige Äste mit der Entwicklung der C<sub>4</sub>. Photosynthese geben. **Abbildung 32** zeigt die phylogenetische Anordnung einiger *Flaveria*-Arten nach POWELL (1978).



Abbildung 32: Verwandtschaftsbeziehung und physiologische Einteilung verschiedener *Flaveria*-Arten nach **POWELL (1978).** Die für die Untersuchung der molekularen Evolution der C<sub>4</sub>-PEPCase verwendeten Arten sind fett geschrieben.

Je ein ppc-cDNA-Vollängenklon wurde aus Blatt-cDNA-Büchereien von *F. brownii* und *F. pubescens* isoliert. Die Analyse der 3'-cDNA-Enden und die phylogenetische Analyse der Aminosäuresequenzen ordnet sie in die Gruppe orthologer ppcA-PEPCasen aus *Flaveria* ein. Die ppcA-PEPCase aus *F. pubescens* ist mit dem orthologen Enzym aus *F. pringlei* fast identisch. Interessanterweise finden sich alle Aminosäureaustausche der ppcA-PEPCase aus *F. pubescens* in der ppcA-PEPCase aus *F. brownii* wieder. Die phylogenetische Analyse der Aminosäuresequenzen deutet einen Selektionsdruck für die ppcA-PEPCase aus *F. brownii* an, der stärker als bei den ppcA-PEPCasen aus *F. pringlei* und *F. pubescens* wirkte. Der Selektionsdruck gestaltete sich aber schwächer als bei der C<sub>4</sub>-PEPCase aus *F. trinervia*.

Welche Eigenschaften zeigen die ppcA-Enzyme aus den C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-intermediären Pflanzen? Zur Charakterisierung der Enzymeigenschaften der neuen ppcA-PEPCasen aus *F. brownii* und *F. pubescens* wurden bakterielle Expressionsplasmide hergestellt. Die Isolierung der rekombinanten Enzyme und die Charakterisierung der enzymatischen und regulatorischen Eigenschaften wurde im Rahmen der Diplomarbeit von SASCHA ENGELMANN (ENGELMANN 2001) durchgeführt. Bei pH 8 ist der K<sub>0,5</sub>-PEP der ppcA-PEPCase aus *F. pubescens* (K<sub>0,5</sub>-PEP = 53  $\mu$ M) signifikant höher als bei der C<sub>3</sub>-ppcA-PEPCase aus *F. pringlei*. Aber nur der K<sub>0,5</sub>-PEP der ppcA-PEPCase aus *F. brownii* ist intermediär (K<sub>0,5</sub>-PEP = 108  $\mu$ M). Die Aktivierung beider orthologer ppcA-PEPCase aus *F. pringlei*. Im

Gegensatz zur C<sub>4</sub>-PEPCase aus *F. trinervia* wird der K<sub>0,5</sub>-PEP nicht durch einen Sprung von pH 8 auf pH 7,6 beeinflußt. Diese Ergebnisse stimmen mit den Daten von BAUWE & CHOLLET (1986) überein, die Blattextrakte zur Bestimmung der Enzymparameter verwendeten. Die qualitative Analyse zeigte dort, daß die PEPCase aus *F. pubescens* im Vergleich mit den PEPCasen anderer C<sub>3</sub>-Pflanzen weitgehend C<sub>3</sub>-Eigenschaften für den K<sub>0,5</sub>-PEP besitzt. Dies traf für alle bekannten PEPCasen aus den C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-intermediären Pflanzen, so auch auf *F. chloraefolia* und *F. anomala* zu (BAUWE & CHOLLET 1986). Der K<sub>0,5</sub>-PEP der Probe von *F. brownii* war dagegen signifikant höher. Während er etwa halb so groß wie für die Blatt-PEPCase aus *F. trinervia* (C<sub>4</sub>) war, wies er jedoch in Bezug auf PEP eine Kooperativität wie für C<sub>3</sub>-Enzyme auf. Die ppcA-PEPCase aus *F. brownii* kann daher als echte C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>-intermediäre Isoform gelten.

Die Ursache für den unterschiedlichen  $K_{0,5}$ -PEP der ppcA-PEPCase aus *F. brownii*, *F. pubescens* und *F. pringlei* sollten wegen der hohen Sequenzidentität leicht in einer gerichteten Mutagenese überprüfbar sein. In Übereinstimmung mit der C<sub>4</sub>-PEPCase aus *F. trinervia* enthält die *F. brownii*ppcA-PEPCase in der Region 2 (Aminosäuren 296-437) ein Lys<sub>347</sub> und ein Asp<sub>396</sub> (**Abbildung 26**). Nur Lys<sub>347</sub> ist spezifisch für das *F. brownii*-Enzym. Asp<sub>396</sub> tritt auch in *F. pubescens* auf. In dem C<sub>3</sub>-Enzym aus *F. pringlei* stehen an diesen Positionen ein Arg<sub>347</sub> und ein Glu<sub>396</sub>. Aufgrund der Charakterisierung der ppcA-Enzymchimären wird Region 2 als Träger von C<sub>4</sub>-Determinanten für den K<sub>0,5</sub>-PEP und dessen Regulation durch G-6-P verantwortlich gemacht, die mit der carboxyterminalen C<sub>4</sub>-Determinante an Position 774 interagiert (**Kapitel 4.2.**). Da Lys<sub>347</sub> im variablen Bereich der Region 2 liegt, könnte diese Aminosäure eine Determinante für den K<sub>0,5</sub>-PEP sein. Die Position der carboxyterminalen C<sub>4</sub>-Determinante wird in der ppcA-PEPCase aus *F. brownii* und aus *F. pubescens* von Alanin belegt und verweist daher auf C<sub>3</sub>-ähnliche Enzymeigenschaften.

Aus der Analyse der unterschiedlich stark entwickelten orthologen ppcA-PEPCasen aus *Flaveria* wird deutlich, daß die carboxyterminale  $Ser_{774}/Ala_{774}$ -Determinante erst im letzten Schritt der Evolution der C<sub>4</sub>-PEPCase genutzt wird. Diese Hypothese wird durch die jüngsten Daten zur Evolution der C<sub>4</sub>-PEPCase in der Gattung *Alternanthera (Amaranthaceae)* gestützt (UDO GOWIK, dieses Institut). Interessanterweise steht nur in der Aminosäuresequenz der C<sub>4</sub>-PEPCase von *A. pungens* (C<sub>4</sub>) ein Serin an der Position der carboxyterminale C<sub>4</sub>-Determinante. Als echtes intermediäres Enzym könnte die *F. brownii*-PEPCase durch die Umwandlung von Ala<sub>774</sub> zu Ser<sub>774</sub> den C<sub>4</sub>-Status für den K<sub>0,5</sub>-PEP erreichen, falls die Aminosäuren 347 und 396 als die C<sub>4</sub>-Determinanten der Region 2 auftreten.

## 4.4. Evolution der PEPCase im Kontext der globalen Evolution der C<sub>4</sub>-Photosynthese

Die Entstehung der C<sub>4</sub>-Photosynthese bei Gräsern wird durch fossile Funde auf die Zeit vor 15 - 12,5 Millionen Jahren datiert. Die Abnahme der atmosphärischen CO<sub>2</sub>-Konzentration wird für diese Entwicklung verantwortlich gemacht (EHLERINGER ET AL. 1991). Die starke Ausbreitung der C<sub>4</sub>-Gräser in den Prärien fand in der Zeit vor 5 - 6 Millionen Jahren statt. Anatomische, biochemische und molekularbiologische Analysen zeigen, daß die evolutionäre Geschichte der C<sub>4</sub>-Gräser auf der mehrfachen Entstehung der C<sub>4</sub>-Photosynthese innerhalb nah verwandter Gras-Unterfamilien basiert (KELLOG 2001). Die *Chloridoideae*, *Arundinoideae* und *Panicoideae* bilden die Gras-Unterfamilien mit C<sub>4</sub>-Photosynthese (RENVOIZE & CLAYTON 1992). Die *Pooideae* und die *Bambusoideae* bilden dagegen weiter entfernt verwandte Unterfamilien ohne C<sub>4</sub>-Photosynthese (**Abbildung 33**).

Bisher sind nur die C<sub>4</sub>-PEPCasen und PEPCase-Isoformen der Gattungen *Sorghum*, *Zea* und *Saccharum* bekannt, die den *Panicoideae* angehören (LEPINIEC ET AL. 1993, YANAGISAWA ET AL. 1988). Für eine genauere Analyse der molekularen Evolution der Gras-C<sub>4</sub>-PEPCasen fehlen die Sequenzen der PEPCasen der *Arundinoideae* und der *Chloridoideae*. Sie könnten die Frage nach der polyphyletisches Entstehung der C<sub>4</sub>-Photosynthese in Gräsern klären. Daher wurde die Klonierung einer PEPCase aus *Chloris gayana* (*Chloridoideae*), die im Blatt exprimiert wird, durchgeführt.

Mehrere Indizien unterstützen die Funktion der klonierten *C. gayana*-PEPCase als C<sub>4</sub>-Enzym. Die Stammbaumanalyse ordnet sie in die Gruppe der Gras-C<sub>4</sub>-PEPCasen ein. Da viele identische cDNA-Klone in der Blatt-cDNA-Bücherei anhand der Restriktionsanalyse identifiziert wurden, sollte sie die dominierende PEPCase in den Blättern von *C. gayana* darstellen. Eine detailliertere Transkriptanalyse steht jedoch noch aus. Der hohe GC-Gehalt in der proteinkodierenden DNA-Sequenz der PEPCase aus *C. gayana* ist ein ebenfalls ein besonderes Merkmal der C<sub>4</sub>-PEPCase aus den panicoiden Gräsern (DONG ET AL. 1998). Ein Serin an der Position der carboxyterminalen C<sub>4</sub>-Determinante darf als Indikator für spezifische C<sub>4</sub>-Enzymeigenschaften gewertet werden. Da die Basenzusammensetzung für das Alanin-Codon (GCN) einen höheren GC-Gehalt zuläßt als für das Serin-Codon (UCN bzw. AG[C/U]) und die dritte Codonposition eine variable Base darstellt, kann das Serin keine Folge des hohen GC-Gehaltes sein. Es wurde vielmehr in den C<sub>4</sub>-PEPCasen der Gräser als Produkt einer Selektion erworben und erhalten.



Abbildung 33: Systematik der Gräser (*Poaceae/Gramineae*) nach RENVOIZE & CLAYTON (1992). Unterfamilien mit  $C_4$ -Gattungen sind grün hinterlegt. Unterfamilien mit ausschließlich  $C_3$ -Gattungen sind gelb markiert. Das vorhergesagte Entstehungszentrum der Gräser ist als gelber Kreis symbolisiert. Innerhalb der  $C_4$ -Unterfamilien bestehen nur die *Chloridoideae* rein aus  $C_4$ -Pflanzen (fett kursiv gedruckt). Die *Arundinoideae* und die *Panicoideae* setzen sich sowohl aus  $C_4$ - als auch aus  $C_3$ -Pflanzen zusammen

Die nahe Verwandtschaft der C<sub>4</sub>-PEPCase aus *C. gayana* mit den C<sub>4</sub>-PEPCasen der *Panicoideae* wirft die Frage auf, ob die C<sub>4</sub>-PEPCase der Gräser monophyletischen Ursprungs ist. D.h. eine frühe Genduplikation in einem gemeinsamen Vorfahr aller C<sub>4</sub>-Grasgruppen führte zur Entwicklung einer Ur-C<sub>4</sub>-PEPCase. Mit der bakteriellen PEPCase als Referenz, favorisiert die rekonstruierte Phylogenie der Gras-PEPCasen (**Abbildung 34**) die frühe Abspaltung aller Gras-C<sub>4</sub>-PEPCasen von den übrigen PEPCase-Isoformen, sowie von den PEPCasen der Angiospermen und der Gymnospermen (TOH ET AL. 1994). Daher sollten die Gräser vor den dikotylen Pflanzen das C<sub>4</sub>-Syndrom entwickelt haben.



Abbildung 34: Rekonstruierte Phylogenie der Gras-PEPCasen. Die bakterielle PEPCase aus *E. coli* bildet den Bezugspunkt für den Ursprung der C<sub>4</sub>-PEPCasen (fett kursiv, grün hinterlegt) und der C<sub>3</sub>-Isoformen monokotyler Gräser (gelb hinterlegt). Die Analyse der Proteinsequenzen wurde mit MOLPHY (Vers. 2.3b3, ADACHI & HASEGAWA 1994) durchgeführt. Im radiären Phylogramm wird die phylogenetische Distanz berücksichtigt (Einheitslänge in Substitutionen pro 100 Aminosäuren). Die phylogenetische Distanz zwischen dem *E. coli*-Enzym und den Pflanzenenzymen ist sehr hoch und daher nicht proportional dargestellt (Doppelstrich).

Eine starker Selektionsdruck auf die C<sub>4</sub>-PEPCase in Gräsern wird als Ursache für die große phylogenetische Distanz zu den übrigen  $C_3$ -Isoformen diskutiert (TOH ET AL. 1994). Ein Indiz dafür stellt vielleicht der hohe GC-Gehalt der stark transkribierten C<sub>4</sub>-ppc-Gene aus Gräsern dar. GC-Reichtum einer DNA wird als fehlerreicher Reparaturmechanismus in den Zusammenhang mit der starken Expression von Genen schon in den gemeinsamen Vorläufern monokotyler Angiospermen und Gymnospermen gebracht. (JANSSON ET AL. 1994). Die phylogenetische Entfernung der C4-PEPCase aus C. gavana zu den C4-PEPCasen der Panicoideae und auch die relativ weite phylogenetische Entfernung der C4-PEPCasen innerhalb der Panicoideae kann jedoch nicht durch den GC-Druck auf die C<sub>4</sub>-PEPCasen erklärt werden (TOH ET AL. 1994). Die C<sub>4</sub>-PEPCasen der Gräser und ein Teil der C3-Isoformen liegen zudem fast gleich von dem gemeinsamen Ursprung entfernt (Abbildung 34). Daher kann der GC-Druck nicht für die Abgeschiedenheit der Gras-C<sub>4</sub>-PEPCasen im Phylogramm verantwortlich sein. Sogar die bisher bekannten PEPCasen aus Reis und Weizen gruppieren nahe mit den zwei unterschiedlichen Zweigen der C<sub>3</sub>-PEPCasen aus S. bicolor und Z. mays (Abbildung 34). Reis (O. sativa) gehört den Bambusoideae und Weizen (T. aestivum) den Pooideae an. Die Bambusoideae und die Pooideae sind nur entfernter mit den Panicoideae verwandt (RENVOIZE & CLAYTON 1992). In den Gräsern wurde daher vielleicht eine einzige, stark exprimierte ppc-Genklasse für die Integration in verschiedenen C<sub>4</sub>-Photosynthese-Modi mehrfach unabhängig genutzt.

Im Gegensatz zu der Situation bei den Gräsern liegen die C<sub>4</sub>-PEPCasen der Gattungen *Flaveria* und *Amaranthus* in verschiedenen taxonomischen Gruppen der dikotylen Angiospermen verteilt und bilden keine Gruppe. Die C<sub>4</sub>-PEPCase aus *Flaveria* ist nah mit den C<sub>3</sub>-Isoformen aus den gleichen Gattung verwandt. Ein weiteres Beispiel ist die Gattung *Alternanthera (Amaranthaceae)*, aus der drei weitere, nah verwandte PEPCasen bekannt sind (in Bearbeitung von UDO GOWIK, dieses Institut). Die phylogenetische Analyse (**Abbildung 27**) gruppiert die C<sub>4</sub>-PEPCase der Spezies *A. pungens* (C<sub>4</sub>) ebenfalls nahe bei den PEPCasen aus *A. tenella* (C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>) und aus *A. sessilis* (C<sub>3</sub>). *Flaveria* und *Alternanthera* bezeugen daher eine mehrfach unabhängige Bildung der C<sub>4</sub>-Photosynthese in dikotylen Pflanzen, die erst in historisch jüngerer Zeit stattfand. Kein ppc-Gen der dikotylen Angiospermen ist GC-reich (JANSSON ET AL. 1994, TOH ET AL. 1994).

In der Zusammenfassung kann die neu klonierte PEPCase aus dem C<sub>4</sub>-Gras *C. gayana* (*Chloridoideae*) als eine C<sub>4</sub>-Isoform angesehen werden, die mit der nahen Verwandtschaft zu den C<sub>4</sub>-PEPCasen der *Panicoideae*-Grasgruppe den monophyletischen Ursprung der Gras C<sub>4</sub>-PEPCasen andeutet. Die Klonierung der übrigen PEPCase-Isoformen aus *C. gayana* sollte die Frage klären, ob sie sich wie die anderen Isoformen der bekannten *Panicoideae*-Grasgruppe entwickelten. Weitere C<sub>4</sub>-PEPCasen und Isoformen aus C<sub>4</sub>-Pflanzen der *Arundinoideae*-Grasgruppe sollten kloniert werden, um den Ursprung der C<sub>4</sub>-PEPCasen aus Gräsern genauer aufzuklären. Die fehlenden PEPCasen ließen sich schnell über die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Methode der inversen cDNA-PCR klonieren.

## 5. Zusammenfassung

In monokotylen und dikotylen Pflanzen stellt die Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPCase) das primäre CO<sub>2</sub>-fixierende Enzym der C<sub>4</sub>-Photosynthese dar. Die Evolution der enzymatischen und regulatorischen Eigenschaften der C<sub>4</sub>-PEPCase folgte den Bedürfnissen des C<sub>4</sub>-Stoffwechsels. Die Gattung *Flaveria* wurde als Modellsystem der C<sub>4</sub>-Photosynthese in dikotylen Pflanzen ausgewählt und die molekulare Evolution der C<sub>4</sub>-ppcA-PEPCase aus *F. trinervia* (C<sub>4</sub>) untersucht. Die Grundlage der Arbeit bilden die molekular klonierten PEPCase-Isoformen der ppcA-, ppcB- und ppcC-Genklassen aus *F. trinervia* (C<sub>4</sub>) und die ppcA-PEPCase aus *F. pringlei* (C<sub>3</sub>).

Die phylogenetische Analyse ermittelte den Ursprung der ppcA-PEPCase in der ppcC-Genklasse, die über eine Genduplikation die ppcB-Genklasse abspaltete. Aus der ppcB-Genklasse entstand über eine Genduplikation die ppcA-PEPCase, die in *F. trinervia* schnell zur C<sub>4</sub>-Isoform evolvierte. Die Enzymcharakterisierung der PEPCase-Isoformen erfolgte mit isolierten, rekombinanten Proteinen. Ein niedriger K<sub>0,5</sub>-PEP, eine geringe Aktivierbarkeit durch Glukose-6-phosphat (G-6-P), eine hohe spezifische Aktivität und die starke Inhibierung durch L-Malat stellen ursprüngliche Eigenschaften dar, die an der C<sub>4</sub>-ppcA-PEPCase verändert wurden. Die Determinanten der C<sub>4</sub>-Enzymeigenschaften wurden über chimäre ppcA-PEPCasen grob kartiert. Die aminoterminale Region 2 und die carboxyterminale Region 5 enthalten die entscheidenden C<sub>4</sub>-Determinanten für den K<sub>0,5</sub>-PEP und dessen allosterische Regulation durch den Aktivator G-6-P. Serin<sub>774</sub> wurde in einer Feinkartierung als Haupt-C<sub>4</sub>-Determinante der Region 5 identifiziert, die mit Region 2 interagiert und in allen C<sub>4</sub>-PEPCasen existiert.

Um Evolutionszwischenstufen der C<sub>4</sub>-PEPCase in *Flaveria* zu isolieren, wurde die ppcA-PEPCase aus *F. pubescens* (C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub>) und *F. brownii* (C<sub>4</sub>-ähnlich) molekular kloniert. Die Sequenzanalyse und die phylogenetische Analyse ordnet die neuen ppcA-Enzyme näher der ppcA-PEPCase aus *F. pringlei* als dem C<sub>4</sub>-ppcA-Enzym aus *F. trinervia* zu. Die ppcA-PEPCase aus *F. brownii* besitzt kein Serin<sub>774</sub>, wurde aber als intermediäres Enzym in Bezug auf den K<sub>0,5</sub>-PEP identifiziert.

Darüber hinaus wurde die Evolution der C<sub>4</sub>-PEPCase in monokotylen C<sub>4</sub>-Pflanzen näher untersucht, indem aus dem C<sub>4</sub>-Gras *Chloris gayana* (*Chloridoideae*) die C<sub>4</sub>-PEPCase molekular kloniert wurde. Die Sequenzanalyse und die phylogenetische Analyse gruppiert sie den C<sub>4</sub>-PEPCasen der panicoiden Gräser zu. Die nahe Verwandtschaft der C<sub>4</sub>-PEPCase aus *C. gayana* mit den C<sub>4</sub>-PEPCasen der Gras-Unterfamilie *Panicoideae* deutet den Ursprung der C<sub>4</sub>-PEPCasen aller Gräser von einem gemeinsamen Vorfahr an.

## 6. Literatur

Adachi, J. and Hasegawa, M. (1994) MOLPHY: programs for molecular phylogenetics, ver.2.1.2. Institute of Statistical Mathematics. Tokyo.

Adams, C.A., Leung, F. and Sun, S.S.M. (1986) Molecular properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from  $C_3$ ,  $C_3$ - $C_4$  intermediate, and  $C_4$  *Flaveria* species. *Planta* 167: 218-225.

Altschul, S.F., Boguski, M.S., Gish, W., and WootTon, J.C. (1997) Issues in searching molecular sequence databases. *Nature Genet*. 6:119-129.

Amann, E., Ochs, B. and Abel, K. J. (1988) Tightly regulated tac promoter vectors useful for the expression of unfused and fused proteins in *Escherichia coli*. *Gene* 69(2):301-15.

Anderson, D.E. (1974) Taxonomy of the genus *Chloris* (*Gramineae*). *Brigham Young Univ. Sci. Bull. Biol. Ser.* 19:1–133.

Andreo, C.S., Gonzales, D.H. and Iglesias, A.A. (1987) Higher plant phosphoenolpyruvate carboxylase. *FEBS Lett.* 213:1-8.

Apel, P. and Maas, I. (1981) Photosynthesis in species of *Flaveria* CO<sub>2</sub> compensation concentration, O<sub>2</sub> influence on photosynthetic gas exchange and  $\delta$ 13C values in species of *Flaveria* (Asteraceae). *Biochem.Physiol.Pflanzen* 176:396-399.

Ashworth, J.M. and Kornberg, H.L. (1966) The anaplerotic fixation of carbon dioxide by *Escherichia coli. Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 165(999):179-88.

Bakrim, N., Prioul, J.-L., Deleens, E., Rocher, J.-P., Arrio-Dupont, M., Vidal, J., Gadal, P. and Chollet, R. (1993) Regulatory phosphorylation of  $C_4$  phospho*enol*pyruvate carboxylase. A cardinal event influencing the photosynthesis rate in *Sorghum* and maize. *Plant Physiol.* 101:891-897.

Bandurski, R.S., (1955) Further studies on the enzymatic synthesis of oxaloacetate from phosphoenolpyruvate and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* 217:137-150.

Bandurski, R.S. and Greiner, C.M. (1953) The enzymatic synthesis of oxalacetate from phosphoryl-enolpyruvate and carbon dioxide. *J. Biol. Chem.* 204:781-786.

Bandurski, R.S., Greiner, C.M. and Bonner, J. (1953) Enzymatic carboxylation of phosphoenolpyruvate to oxalacetate. *Fed. Proc.* 12:173.

Bauwe, H. and Chollet, R. (1986) Kinetic properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>, and C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediate species of *Flaveria (Asteraceae)*. *Plant Physiol.* 82:695-699.

Bauwe, H., Keerberg, O., Bassüner, R., Pärnik, T. and Bassüner, B. (1987) Reassimilation of carbon dioxide by *Flaveria* (*Asteraceae*) species representing different types of photosynthesis. *Planta* 172:214-218.

Basra, A.S. and Malik, C.P. (1996) Non-photosynthetic fixation of carbon dioxide and possible biological roles in higher plants. *Biol. Rev.* 60: 357-401.

Berman, H.M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T.N., Weissig, H., Shindyalov, I.N. and Bourne, P.E. (2000) The Protein Data Bank. *Nucleic Acids Research*, 28:235-242.

Benton, W.D. and Davis, R.W. (1977) Screening lambda gt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. *Science* 196:180-182.

Bläsing, O.E. (1995) Molekularbiologische Untersuchungen zur ppcA-PEP-Carboxylase der C<sub>3</sub>-Pflanze *Flaveria pringlei*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254.

Carter, P.J., Nimmo, H.G., Fewson, C.A. and Wilkins, M.B. (1991) Circadian rhythms in the activity of a plant protein kinase. *EMBO J.* 10(8): 2063-2068.

Cheng, S.H., Moore, B.D., Edwards, G.E. and Ku, M.S.B. (1988) Photosynthesis in *Flaveria* brownii, a C<sub>4</sub>-like species. Leaf anatomy, characteristics of CO<sub>2</sub> exchange, compartmentation of photosynthetic enzymes, and metabolism of  ${}^{14}CO_2$  *Plant Physiol.* 87:867-873.

Chollet, R. and Ogren, W.L. (1975) Regulation of photorespiration in C<sub>3</sub> and C<sub>4</sub> species. *Bot. Rev.* 41: 137-179.

Chollet, R., Vidal, J. and O'Leary, M.H. (1996) Phosphoenolpyruvate carboxylase: A ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* 47:273-298.

Church, G.M. and Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:1991-1995.

Crétin, C., Santi, S., Keryer, E., Lepiniec, L., Tagu, D., Vidal, J. and Gadal., P. (1991a) The phospho-enolpyruvate carboxylase gene family of *Sorghum*: promoter structures, amino acid sequences and expression of genes. *Gene* 99: 87-94.

Crétin, C., Bakrim, N., Kéryer, E., Santi, S., Lepiniec, L., Vidal, J. and Gadal, P. (1991b) Production in *E. coli* of active *Sorghum* phosphoenolpyruvate carboxylase which can be phosphorylated. *Plant Mol.Biol.* 17:83-88.

Devi, M.T. and Raghavendra, A.S. (1993) Photorespiration in  $C_3$ - $C_4$  intermediate species of *Alternanthera* and *Parthenium*: Reduced ammonia production and increased capacity of  $CO_2$  refixation in the light. *Photosynth. Res.* 38:177-184.

Devi, M.T., Rajagopalan, A.V. and Raghavendra, A.S. (1995) Predominant localization of mitochondria enriched with glycine-decarboxylating enzymes in bundle sheath cells of Alternanthera tenella, a  $C_3$ - $C_4$  intermediate species. *Plant Cell Environ.* 18:589-594.

Duff, S.M.G., Andreo, C.S., Pacquit, V., Lepiniec, L., Sarath, G., Condon, S.A., Vidal, J., Gadal, P. and Chollet, R. (1995) Kinetic analysis of the non-phosphorylated, in vitro phosphorylated, and phosphorylation-site-mutant (Asp8) forms of intact recombinant C<sub>4</sub> phosphoenolpyruvate carboxylase from sorghum. *Eur. J. Biochem.* 228:92-95.

Doncaster, H. and Leegood, R.C.L. (1987) Regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase activity in maize leaves. *Plant Physiol.* 84:82-87.

Dong, L.Y., Ueno, Y., Hata, S. and Izui, K. (1997) Effects of site-directed mutagenesis of conserved Lys606 residue on catalytic and regulatory functions of maize C<sub>4</sub>-form phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Cell. Physiol.* 38:1340-1345.

Dong, L.Y., Masuda, T., Kawamura, T., Hata, S. and Izui, K. (1998) Cloning, expression, and characterization of a root-form phosphoenolpyruvate carboxylase from *Zea mays*: Comparison with the C<sub>4</sub>-form enzyme. Plant Cell Physiol 39: 865-873

Edwards, G.E. and Walker, D.A. (1983) C<sub>3</sub>, C<sub>4</sub>: Mechanism, and Cellular and Environmental Regulation, of Photosynthesis. Blackwell Scientific Publications, Oxford-London.

Edwards, G.E. and Ku, M.S.B. (1987) Biochemistry of C<sub>3</sub>-C<sub>4</sub> intermediates. In Hatch, M.D., and Boardman, N.K. *The Biochemistry of Plants* 10: 275-325. Academic Press, Inc., New York.

Ehleringer, J.R., Sage, R.F., Flanagan, L.B. and Pearcy, R.W. (1991) Climate change and the evolution of  $C_4$  photosynthesis. *TREE* 6(3):95-99.

Ehleringer, R.E., Cerling, T.E. and Helliker, B.R. (1997) C<sub>4</sub> photosynthesis, atmospheric CO2, and climate. *Oecologia* 112:285-299.

Engelmann, S. (2001) Biochemie der C<sub>4</sub>-Phosphoenolpyruvat-Carboxylaseund ihrer C<sub>3</sub>- und C<sub>3</sub>- C<sub>4</sub>-Isoformen im Formenkreis *Flaveria*. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Ernst, K. and Westhoff, P. (1997) The phosphoenolpyruvate carboxylase (ppc) family of *Flaveria trinervia* (C<sub>4</sub>) and *Flaveria pringlei* (C<sub>3</sub>): molecular characterization and expression analysis of the *ppcB* and *ppcC* genes. *Plant Mol. Biol.* 34:427-443.

Faloona, F. and Mullis, K.B., (1987) Specific synthesis of DNA via polymerase chain reaction. *Methods Enzym. Mol.* 155:335-350.

Feinberg, A.P. and Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabelling restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.* 132:6-32.

Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791.

Fujita, N., Miwa, T., Ishijima, S., Izui, K. and Katsuki, H. (1984) The primary structure of phosphoenolpyruvate carboxylase of *Escherichia coli*. Nucleotide sequence of the ppc gene and deduced amino acid sequence. *J.Biochem.* 95:909-916.

Gao, J. and Woo, K.C. (1995) Site-directed mutagenesis of Lys<sup>600</sup> in phospho*enol*pyruvate carboxylase of *Flaveria trinervia*: Its roles in catalytic and regulatory functions. *FEBS Lett.* 375:95-98.

Gao, J. and Woo, K.C. (1996) Regulation of phospho*enol*pyruvate carboxylase in *Zea mays* by protein phosphorylation and metabolites and their roles in photosynthesis. *Aust.J.Plant Physiol.* 23:25-32.

Gao, J. and Woo, K.C. (1996) Site-directed mutagenesis of *Flaveria trinervia* phospho*enol*pyruvate carboxylase: Arg<sup>450</sup> and Arg<sup>767</sup> are essential for catalytic activity and Lys<sup>829</sup> affects substrate binding. *FEBS Lett.* 392:285-288.

Gehrig, H.H., Heute, V. and Kluge, M. (1998) Toward a better knowledge of the molecular evolution of phosphoenolpyruvate carboxylase by comparison of partial cDNA sequences. *J. Mol. Evol.* 46:107-114.

Gehrig, H., Faist, K. and Kluge, M. (1998) Identification of phosphoenolpyruvate carboxylase isoforms in leaf, stem and roots of the obligate CAM plant *Vanilla planifolia* Salib. (*Orchidaceae*): a physiological and molecular approach. *Plant Mol. Biol.* 38(6):1215-1223.

Guex, N. and Peitsch, M.C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18:2714-2723.

Gilbert, D. (2000) Free software in molecular biology for Macintosh and MS Windows computers. *Methods. Mol. Biol.* 132:149-184.

Gitelman, I. and Davis, C.A. (1997) A novel DNA molecular weight ladder. *Technical Tips Online*, *http://research.bmn.com*.

Haberland, G.F. (1904) Physiologische Pflanzenanatomie, Willhelm Engelmann, Leipzig.

Hartwell, J., Gill, A., Nimmo, G. A., Wilkins, M. B., Jenkins, G. I. and Nimmo, H. G. (1999) Phosphoenolpyruvate carboxylase kinase is a novel protein kinase regulated at the level of expression. *Plant J.* 20(3):333-342.

Hatch, M.D. and Slack, C.R. (1970) Photosynthetic CO<sub>2</sub>-fixation pathways. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 21: 141-162.

Hatch, M.D. (1987) C<sub>4</sub> photosythesis: a unique blend of modified biochemistry, anatomy and ultrastructure. *Biochem. Biophys. Acta* 895:81-106.

Hatch, M.D. (1992) C<sub>4</sub> photosynthesis: an unlikely process full of surprises. *Plant Cell Environ*. 33(4):333-342.

Hattersley, P.W. and Watson, L. (1987) Diversification of photosynthesis. In: *Gras evolution and domestication*, edited by Chapman, G.P. Cambridge: Cambridge University Press, 38-116.

Hermans, J. and Westhoff, P. (1990) Analysis of expression and evolutionary relationships of phosphoenolpyruvate carboxylase genes in *Flaveria trinervia* ( $C_4$ ) and *F. pringlei* ( $C_3$ ) *Mol.Gen.Genet.* 224:459-468.

Hermans, J. and Westhoff, P. (1992) Homologous genes for the  $C_4$  isoform of phosphoenolpyruvate carboxylase in a  $C_3$ - and a  $C_4$ -*Flaveria* species. *Mol.Gen.Genet.* 234:275-284.

Holaday, H.S., Lee, K.W. and Chollet, R. (1984)  $C_3$ - $C_4$  intermediate species in the genus *Flaveria*: leaf anatomy, ultrastructure, and the effect of  $O_2$  on the CO<sub>2</sub> compensaton concentration. *Planta* 160:25-32.

Holmes, D.S. and Quigley, M. (1981) A rapid boiling method for the separation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* 114:193-197.

Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* 96:23-28.

Ishijima, S., Katagiri, F., Kodaki, T., Izui, K., Katsuki, H., Nishikawa, K., Nakashima, H. and Ooi, T. (1985) Comparison of amino acid sequences between phosphoenolpyruvate carboxylase from *Escherichia coli* (allosteric) and *Anacystis nidulans* (non-allosteric): Identification of conserved and variable regions. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 133:436-441.

Izui, K., Ishijima, S., Yamaguchi, Y., Katagiri, R., Murata, T., Shigesada, K., Sugiyama, R. and Katsuki, H. (1986) Cloning and sequence analysis of cDNA encoding active phosphoenol-pyruvate carboxylase of the C<sub>4</sub> pathway from maize. *Nucl.Acids Res.* 14:1615-1628.

Jiao, J.-A. and Chollet, R. (1989) Regulatory seryl-phosphorylation of  $C_4$  phosphoenolpyruvate carboxylase by a soluble protein kinase from maize leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 269:526-535.

Jiao, J. and Chollet, R. (1991) Posttranslational regulation of phospho*enol*pyruvate carboxylase in C4 and Crassulacean acid metabolism plants. *Plant Physiol.* 95:981-985.

Jones, D.T., Taylor, W.R. and Thornton, J.M. (1992) The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. *Comput. Appl. Biosci.* 8(3): 275-82.

Kai, Y., Matsumura, H., Inoue, T., Terada, K., Nagara, Y., Yoshinaga, T., Kihara, A., Tsumura, K. and Izui, K. (1999) Three-dimensional structure of phosphoenolpyruvate carboxylase: a proposed mechanism for allosteric inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(3):823-8.

Kawamura, T., Shigesada, K., Yanagisawa, S. and Izui, K. (1990) Phosphoenolpyruvate carboxylase prevalent in maize roots: isolation of a cDNA clone and its use for analyses of the gene and gene expression. *J. Biochem.* 107:165-168.

Kellogg, E.A. (2001) Evolutionary History of the Grasses. Plant Physiol. 125:1189-1205.

Khandjian, E.W. (1986) UV crosslinking of RNA to nylon membranes enhances hybridization signals. *Molecular Biology Reporter* 11:107-115.

Ku, M.S.B., Monson, R.K., Littlejohn, R.O.Jr., Nakamoto, H., Fisher, D.B. and Edwards, G.E. (1983) Photosynthetic characteristics of  $C_3$ - $C_4$  intermediate *Flaveria* species. 1. Leaf anatomy, photosynthetic responses to  $O_2$  and  $CO_2$ , and activities of key enzymes in the  $C_3$  and  $C_4$  pathways. *Plant Physiol.* 71:944-948.

Ku, M.S.B., Wu, J., Dai, Z., Scott, R.A., Chu, C. and Edwards, G.E. (1991) Photosynthetic and photorespiratory characteristics of *Flaveria* species. *Plant Physiol*. 96:518-528.

Ku, M.S.B., Kano-Murakami, Y. and Matsuoka, M. (1996) Evolution and Expression of C<sub>4</sub> photosynthesis genes. *Plant Phys.* 111:949-957.

Langdale, J.A. and Nelson, T. (1991) Spatial regulation of photosynthetic development in C<sub>4</sub> plants. *Trends Genet.* 7:191-196.

Latzko, E. and Kelly, J. (1983) The multi-faceted function of phosphoenolpyruvate carboxylase in C3 plants. *Physiol.Vég.* 21:805-815.

Lepiniec, L., Keryer, E., Philippe, H., Gadal, P. and Crétin, C. (1993) *Sorghum* phosphoenolpyruvate carboxylase gene family: Structure, function and molecular evolution. *Plant Mol.Biol.* 21:487-502.

Lepiniec, L., Vidal, J., Chollet, R., Gadal, P. and Crétin, C. (1994) Phosphoenolpyruvate carboxylase: Structure, regulation and evolution. *Plant Sci.* 99:111-124.

López-Millán, A.F., Morales, F., Andaluz, S., Gogorcena, Y., Abadía, A., De Las Rivas, J. and Abadía, J. (2000) Responses of sugar beet roots to iron deficiency. Changes in carbon assimilation and oxygen use. *Plant Physiol.* 124: 885-897.

Lou, H., McCullough, A.J. and Schuler, M.A. (1993) 3'Splice site selection in dicot plant nuclei is position dependent. *Mol. Cell. Biol.* 13 (8):4485-4493.

MacMaster, G.K. and Carmichael, G.G. (1977) Analysis of single and double-stranded nucleic acids on polyacrylamide and agarose gels by using glyoxal and acridine orange. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:4835-4838.

Marchuk, D., Drumm, M., Saulino, A. and Collins, F.S. (1990) Construction of T-vectors, a rapid and general system for cloning of unmodified PCR products. *Nucleic Acids Res.* 19:1154.

Martinoia, E. and Rentsch, D. (1994) Malate Compartmentation - Responses to a Complex Metabolism. *Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol* 45: 447-467.

Matsumura, H., Terada, M., Shirakata, S., Inoue, T., Yoshinaga, T., Izui, K. and Kai, Y. (1999) Plausible phosphoenolpyruvate binding site revealed by 2.6 A structure of  $Mn_2^+$ -bound phosphoenolpyruvate carboxylase from Escherichia coli. *FEBS Lett.* 458(2):93-96.

McNaughton, G.A.L., Wilkins, M.B. and Nimmo, H.G. (1989) Purification, oligomerization state of maize leaf phospho*enol*pyruvate carboxylase. *Biochem. J.* 261:349-355.

Melzer, E. and O'Leary, M. (1987) Anaplerotic fixation by phosphoenolpyruvate carboxylase in C<sub>3</sub> plants. *Plant Physiol.* 84:58-60.

Merkelbach, S., Gehlen, J., Denecke, M., Hirsch, H.-J. and Kreuzaler, F. (1993) Cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding active phosphoenolpyruvate carboxylase of the C3 plant *Solanum tuberosum*. *Plant Mol.Biol.* 23:881-888.

Metcalfe, C.R. (1960) Anatomy of the Monocotyledons. I. Gramineae. Clarendon Press: Oxford.

Monson, R.K., Moore, B.D., Ku, M.S.B. and Edwards, G.E. (1986) Co-function of  $C_3$ - and  $C_4$ -photosynthetic pathways in  $C_3$ ,  $C_4$  and  $C_3$ - $C_4$  intermediate *Flaveria* species. *Planta* 168:493-502.

Monson, R.K. and Moore, B.D. (1989) On the significance of  $C_3$ - $C_4$ -intermediate photosynthesis to evolution of  $C_4$  photosynthesis. *Plant Cell Environ.* 12:689-699. Moore, B.D., Ku, M.S.B. and Edwards, G.E. (1989) Expression of C4-like photosynthesis in several species of Flaveria. *Plant Cell Environ.* 12:541-549.

Nakamoto, H., Ku, M.S.B. and Edwards, G.E. (1983) Photosynthetic characteristics of  $C_3$ - $C_4$  intermediate *Flaveria* species II. Kinetic properties of phosphoenolpyruvate carboxylase from  $C_3$ ,  $C_4$  and  $C_3$ - $C_4$  intermediate species. *Plant Cell Physiol.* 24 (8):1387-1393.

Nimmo, G.A., McNaughton, G.A.L., Fewson, C.A., Wilkins, M.B. and Nimmo, H.G. (1987) Changes in the kinetic properties and phosphorylation state of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Zea mays* leaves in response to light and dark. *FEBS Lett.* 213:18-22.

Ogren, W.L. (1984) Photorespiration: pathways, regulation, and modification. *Annu.Rev.Plant Physiol.* 35:415-442.

O'Leary, M.H. (1982) Phosphoenolpyruvate carboxylase: an enzymologists view. *Annu.Rev.Plant Physiol.* 33:297-315.

Page, R.D.M. (1996) TREEVIEW: An application to display phylogenetic trees on personal computers. *Computer Applications in the Biosciences* 12:357-358.

Poetsch, W., Hermans, J. and Westhoff, P. (1991) Multiple cDNAs of phosphoenolpyruvate carboxylase in the C4 dicot *Flaveria trinervia*. *FEBS Lett.* 292:133-136.

Powell, A.M. (1978) Systematics of *Flaveria (Flaveiinae-Asteraceae)*. Ann. Missouri Bot. Gard. 65:590-636.

Prescott, L.M., Harley, J.P. and Klein, D.A. (1999) *Microbiology*. Dubuque, IA [etc.], Wm.C. Brown.

Rajagopalan, A.V., Devi, M.T. and Raghavendra, A.S. (1994) Molecular biology of  $C_4$  phospho*enol*pyruvate carboxylase: Structure, regulation and genetic engineering. *Photosynth.Res.* 39:115-135.

Renvoize, S.A. and Clayton, W.D. (1992) Classification and the evolution of the grasses. In Grass evolution and domestication, G.P. Chapman, ed. (Cambridge: Cambridge University Press) p. 3-37.

Sabe, H., Miwa, T., Kodaki, T., Kodaki, T., Izui, K., Hiraga, S. and Katsuki, H. (1984) Molecular cloning of the phosphoenolpyruvate carboxylase gene, ppc, of *Escherichia coli. Gene* 31:279-283.

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R.G., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A., (1987) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 230:1350-1354.

Saitou, N. and Nei, M. (1987) The neighbour-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4:406-425.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. *Cold Spring Harbor Press*, Cold Spring Harbor, New York.

Sanger, F., Nicklen, S. and Caulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 74:5463-5467.

Schäffner, A.R. and Sheen, J. (1992) Maize C<sub>4</sub> photosynthesis involves differential regulation of phosphoenolpyruvate carboxylase genes. *Plant J.* 2: 221-232.

Schägger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analyt. Biochem.* 166:368-379.

Schlegel, H.G. und Zaborosch, C. (1992) Allgemeine Mikrobiologie. Stuttgart [etc.], Thieme.

Schöneberg, U., Vahrson, W., Priedemuth, U. and Wittig, B. (1994) *Analysis and interpretation of DNA and protein sequences using MacMolly Tetra*. (3. ed.), KAROI-Verlag Bornemann, Bielefeld.

Southern, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98:503-517.

Sugimoto, T., Kawasaki, T., Kato, T., Whittier, R.F., Shibata, D. and Kawamura, Y. (1992) cDNA sequence and expression of a phosphoenolpyruvate carboxylase gene from soybean. *Plant Mol.Biol.* 20:743-747.

Svensson, P., Blaesing, O.E. and Westhoff, P. (1997) Evolution of the enzymatic characteristics of  $C_4$  phospho*enol*pyruvate carboxylase: a comparison of the orthologous *PPCA* phosphoenolpyruvate carboxylases of *Flaveria trinervia* ( $C_4$ ) and *F. pringlei* ( $C_3$ ). *Eur. J. Biochem.* 246:452-460.

Taybi, T., Patil, S., Chollet, R. and Cushman, J.C. (2000) A minimal serine/threonine protein kinase circadianly regulates phosphoenolpyruvate carboxylase activity in crassulacean acid metabolism-induced leaves of the common ice plant. *Plant Physiol.* 123(4):1471-82.

Terada, K. and Izui, K. (1991) Site-directed mutagenesis of the conserved histidine residue of phospho*enol*pyruvate carboxylase--His138 is essential for the second partial reaction. *Eur.J.Biochem.* 202:797-803.

Terada, K., Murata, T. and Izui, K. (1991) Site-directed mutagenesis of PEPC from *E. coli*: The role of His<sup>579</sup>in the catalytic and regulatory functions. *J. Biochem.* 109:49-54.

Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J. (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence neighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl.Acids Res.* 22:4673-4680.

Thompson, J.D., Gibson, T.J., Plewniak, F., Jeanmougin, F. and Higgins, D.G. (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25:4876-4882.

Ting, I.P. and Osmond, C.B. (1973) Multiple forms of plant phosphoenolpyruvate carboxylase associated with different metabolic pathways. *Plant Physiol.* 51:448-453.

Ting, I.P. and Osmond, C.B. (1973) Photosynthetic phosphoenolpyruvate carboxylase. Characteristics of allozymes from leaves of  $C_3$  and  $C_4$  plants. *Plant Physiol.* 51:439-447. Toh, H., Kawamura, T. and Izui, K. (1994) Molecular evolution of phosphoenolpyruvate carboxylase. *Plant Cell Environ.* 17:31-43.

Uedan, K. and Sugiyama, T. (1976) Purification and characterization of phosphoenolpyruvate carboxylase from maize leaves. *Plant Physiol*. 57:906-910.

Vanbel, A.J.E. (1993) Strategies of Phloem Loading. *Annu Rev Plant Physiol Plant Molec Biol* 44: 253-281.

Van den Borre, A. and Watson, L. (1997). On the classification of *Chloridoideae (Poaceae)*. *Australian Systematic Botany* 10:491–531.

Vennesland, B., Tchen, T.T. and Loewus, F.A. (1954) Mechanism of enzymatic carbon dioxide fixation into oxaloacetate. *J. Ann. Chem. Soc.* 76:3358-3359.

Wang, Y. and Chollet, R. (1993) In vitro phosphorylation of purified tobacco-leaf phosphoenolpyruvate carboxylase. *FEBS Lett.* 328:215-218.

Watson, L. and Dallwitz, M.J. (1992). Grass Genera of the World: Descriptions, Illustrations, Identification, and Information Retrieval; including Synonyms, Morphology, Anatomy, Physiology, Phytochemistry, Cytology, Classification, Pathogens, World and Local Distribution, and References. http://biodiversity.uno.edu/delta/. Version: 18th August 1999.

Weber, K. and Osborne, M. (1969) The reliability of molecular weight determinations by dodecylsulfate gel electrophoresis, *J. Biol. Chem.* 244:4406-12.

Wedding, R.T., Black, M.K. and Meyer, C.R. (1989) Activation of higher plant phosphoenolpyruvate carboxylases by glucose-6-phosphate. *Plant Physiol.* 90:648-652.

Wedding, R.T., Black, M.K. and Meyer, C.R. (1990) Inhibition of phosphoenolpyruvate carboxylase by malate. *Plant Physiol*. 92:456-461.

Wedding, R.T., O'Brien, C.E. and Kline, K. (1994) Oligomerization and the Affinity of maize phospho*enol*pyruvate carboxylase for its substrate. *Plant Physiol.* 104:613-616.

Weigend, M. and Hincha, D.K. (1992) Quaternary structure of phosphoenolpyruvate carboxylase from CAM-C<sub>4</sub>- and C<sub>3</sub>-plants - no evidence for diurnal changes in oligomeric state. *J. Plant. Physiol.* 140:653-660.

Westhoff, P., Offermann-Steinhard, K., Höfer, M., Eskins, K., Oswald, A. and Streubel, M. (1991) Differential accumulation of plastid transcripts encoding photosystem II components in the mesophyll and bundle-sheath cells of monocotyledonous NADP-malic enzyme-type C<sub>4</sub> plants. *Planta* 184:377-388.

Wyrich, R., Dressen, U., Brockmann, S., Streubel, M., Chang, C., Qiang, D., Paterson, A.H. and Westhoff, P. (1998) The molecular basis of  $C_4$  photosynthesis in *Sorghum*: isolation, characterization and RFLP mapping of mesophyll- and bundle-sheath-specific cDNAs obtained by differential screening. *Plant Mol. Biol.* 37 (2):319-335.

Yano, M. and Izui, K. (1997) The replacement of Lys620 by serine desensitizes Escherichia coli phosphoenolpyruvate carboxylase to the effects of the feedback inhibitors L-aspartate and L-malate. *Eur. J. Biochem.* 247:74-81.
### 7. Anhang A: ppcA-cDNA-Klone von Flaveria brownii und F. pubescens

Die Vektorrestsequenzen sind unterstrichen und die enthaltenen Klonierungsschnittstellen am Anfang und Ende der Sequenz durch Namen gekennzeichnet. Start- und Stopcodon der proteinkodierenden Sequenz sind fett gedruckt.

#### a) DNA-Sequenz und Aminosäureübersetzung des ppc-cDNA-Klons pcFbppcA1:

ECOR I GA ATT CGG CAC GAG CAA TAT TCA GGG TTG GAG GGG AAT TAA GCA AGG GTG TGA GTA ATG GCT -46 -37 -28 -19 -10 E K L A S I D A Q L R L L -1 77 v AAC AAG AAT GTG GAG AAA TTA GCA TCG ATC GAC GCT CAA TTG AGG CTT TTA GTC CCG GGG AAA GTT 42 L L L 24 33 L I E Y D A 15 51 60 69 K F Е D L Κ L S D L D L D Т 0 TCT GAG GAT GAC AAG CTT ATT GAG TAT GAT GCT TTG CTT TTG GAT AAG TTT CTG GAT ATT CTT CAG 135 E " 
 90
 99
 108

 H
 G
 E
 D
 L
 K
 E
 A
 V
 Q

 CAT
 COC
 COL
 117 126 108 Q E C Y E L L S A gat TTG cat GGG gaa gat ctc aag gaa gcg gtt caa gaa tgc tat gag cta tca gct gaa tat gaa 192 T D P 156 165 K K L E E L 174 G S 183 L T S 201 147 14/ H D P v G к G D GGA AAA CAT GAC CCG AAG AAA CTG GAG GAG CTT GGA AGT GTG TTG ACA AGT TTA GAT CCA GGG GAT 222 K A F 213 231 240 249 258 267 L N L A E E ΙA S H M A N L т v v TCC ATT GTC ATT GCA AAA GCT TTT TCT CAC ATG CTT AAC TTG GCC AAT CTG GCT GAA GAA GTT CAG 279 Y R R 288 R I K 297 L K R 306 G D F 315 F A D E 324 333 Ν Ι А А т т Α ATT GCT TAC CGC CGA AGA ATC AAA CTG AAG AGA GGC GAT TTT GCT GAT GAG GCT AAT GCA ACA ACT 354 Е Т F 345 363 372 381 390 399 345 D I E 363 K R L 372 V Н К 381 L N K E V S S P E E GAA TCA GAT ATT GAA GAA ACT TTC AAG AGA CTT GTG CAT AAG CTT AAC AAG TCT CCT GAA GAG GTT 411 420 429 438 447 456 465 438 V L T V D L A H P A L N Q T K т TTT GAT GCA CTC AAG AAC CAA ACA GTT GAC TTG GTC TTG ACT GCT CAT CCA ACT CAG TCT GTC CGC 486 495 K H G R I R 513 A Q L 504 522 531 477 504 N C L Q LL У А к R S D Ι AGA TCT TTG CTT CAA AAG CAT GGA AGG ATT CGT AAC TGT CTG GCC CAG TTA TAT GCC AAA GAC ATC 588 • • F 543 D D K 552 Q E L 561 D E A 579 E I Q 570 L H R 597 т Ρ A A F R ACC CCT GAT GAT AAG CAG GAA CTG GAT GAG GCT TTG CAT AGA GAA ATC CAA GCT GCA TTC CGT ACT 609 618 627 636 645 654 663 T P P T P Q D E M Y IRR R A G M S Е D F H GAT GAA ATC AGG AGG ACC CCA CCA ACA CCA CAA GAT GAA ATG AGA GCT GGA ATG AGT TAC TTC CAT 693 K F L 702 R R V 675 I W К 684 711 720 L K N 720 729 711 D T A oð4 GVP т E I G GAA ACA ATC TGG AAG GGT GTT CCT AAA TTC TTA CGT CGT GTT GAC ACT GCC CTA AAG AAT ATA GGG 768 I Q F 786 750 759 777 795 741 A P E R v Y Ν L S W M G т Ν Ρ S G D R ATT AAT GAA CGT GTT CCC TAT AAC GCA CCT CTA ATT CAA TTC TCT TCA TGG ATG GGT GGT GAC CGT 807 N P R 816 825 834 V T P E V T R D V 843 852 861 A R M M G D GAT GGC AAT CCA AGG GTA ACT CCT GAG GTA ACG AGG GAT GTT TGT TTA CTA GCC AGA ATG ATG GCT 882 S Q I 918 W R C 873 M Y F 891 E D L 900 M F E 909 M S M 927 Е Ν N S TCA AAC ATG TAC TTT TCT CAG ATA GAG GAT CTA ATG TTT GAG ATG TCT ATG TGG CGT TGC AAT AGT 948 957 939 966 975 984 993 т. Ү v AEE т а v E v R R R R КD к н Y T E GAA GTA CGT GTT CGA GCA GAA GAA CTG TAT AGA ACA GCA AGA AAA GAT GTG AAG CAC TAT ATA GAG D 1059 1005 1014 1023 1032 1041 K Q V P P T E P Y R V I L G D 1050 V R F W Κ TTC TGG AAA CAG GTT CCT CCC ACT GAA CCT TAT CGT GTA ATT CTT GGT GAT GTA AGG GAC AAA TTA 1125 F 1089 1098 1107 H L L A H G M S 1071 1080 T I E R S 1116 R S R Ν D ΙP Y D ΕA tat aat aca att gaa cga tca cgc cat tta tta gcc cat gga atg tct gat att cca gat gaa gct 1164 1146 1155 1173 1137 1182 1191 E Q F E L C Y R N V L E P т L S Т. D GTT TAT ACC AAT GTT GAA CAG TTC TTG GAA CCA CTG GAG CTA TGC TAC AGA TCA CTA TGT GAC TCT 1203 1212 1221 1230 1239 1248 1257 R V I A D G S L L D F L R Q V S T F G D G GGT GAC CGT GTG ATT GCT GAT GGA AGC CTT CTT GAT TTT CTA AGA CAA GTG TCA ACT TTT GGG CTC 1269 1278 1287 1296 1305 1314 1323

V K L D I R Q E S D R H T D V L D A I TCA CTT GTA AAA CTT GAT ATA AGA CAA GAA TCT GAC CGA CAC ACT GAC GTC CTT GAT GCA ATC ACT 1335 1344 1353 1362 1371 1380 1389 H L K I G S Y R E W S E E K R Q E W L L A CAA CAT TTA AAA ATT GGG TCC TAT CGT GAG TGG TCT GAA GAA AAA CGC CAA GAG TGG CTT CTA GCT 
 1401
 1410
 1419
 1428
 1437
 1446
 1455

 S
 G
 K
 R
 P
 L
 F
 G
 S
 D
 L
 P
 K
 T
 E
 V
 K
 D
 V
 GAA CTC AGT GGA AAA CGT CCT CTT TTC GGT TCA GAC CTT CCA AAA ACT GAG GAA GTT AAG GAT GTT 1467 1476 1485 1494 1503 1512 1521 L D T F N V I A E L P S D C F G A Y I I S M TTA GAC ACG TTT AAT GTT ATA GCA GAA CTC CCA TCT GAC TGT TTC GGT GCT TAC ATT ATC TCA ATG 1533 1542 1551 1560 1569 1578 1587 A T S P S D V L A V E L L Q R E C H V K H P GCC ACA TCA CCT TCT GAT GTC CTT GCT GTT GAG CTT CTC CAA CGC GAA TGC CAT GTA AAA CAT CCA 1599 1608 1617 1626 1635 1644 1653 R V V P L F E K L A D L E A A P A S M A TTA CGC GTG GTC CCC CTA TTT GAA AAA CTG GCT GAC CTG GAG GCG GCC CCT GCG TCC ATG GCC CGC 1665 1674 1683 1692 1701 1710 1719 L F S I D W Y R N R I D G K Q E V M I G Y S CTT TTC TCA ATC GAT TGG TAC AGA AAC CGG ATC GAC GGT AAA CAA GAA GTC ATG ATT GGG TAC TCT 1731 1740 1749 1758 1767 1776 1785 S G K D A G R F S A A W Q L Y K A Q E E I GAT TCA GGA AAA GAT GCA GGC CGG TTT TCT GCT GCA TGG CAG CTC TAC AAA GCT CAA GAA GAG ATT 
 1797
 1806
 1815
 1824
 1833
 1842
 1851

 I
 K
 V
 A
 K
 F
 G
 V
 K
 V
 I
 F
 H
 G
 G
 T
 V
 V G ATT AAA GTT GCA AAA GAG TTT GGA GTC AAA CTT GTT ATA TTT CAT GGG CGT GGT GGA ACT GTC GGT 1863 1872 1881 1890 1899 1908 1917 G G G P T H L A L L S Q P P D T I H G S L AGA GGT GGT GGG CCC ACA CAT TTG GCG CTT CTC TCT CAA CCA CCA GAC ACC ATT CAC GGG TCT TTA 
 1995
 2004
 2013
 2022
 2031
 2040
 2049

 Q
 R
 F
 C
 A
 A
 T
 L
 E
 H
 G
 N
 P
 P
 I
 S
 P
 P
 E
 CTT CAG AGA TTT TGT GCA GCT ACA CTT GAG CAT GGG ATG AAC CCA CCA ATC TCA CCA CGG CCC GAG 2061 2070 2079 2088 2097 2106 2115 E L M D Q M A V V A T E E Y R S T V F K TGG CGT GAA CTT ATG GAC CAG ATG GCT GTT GTT GCA ACC GAG GAG TAC CGT TCT ACT GTG TTC AAG 2127 2136 2145 2154 2163 2172 2181 E P R F V E Y F R L A T P E L E Y G R M N I GAA CCA CGT TTT GTG GAG TAT TTC CGC CTT GCA ACA CCT GAA CTG GAG TAC GGG CGT ATG AAT ATC 
 2193
 2202
 2211
 2220
 2229
 2238
 2247

 G S R P S K R K P S G G I E S L R A I P W I
 GGA AGT CGC CCA TCA AAA AGA AAA CCT AGT GGT GGC ATT GAA TCA CTC AGA GCC ATT CCA TGG ATC 2259 2268 2277 2286 2295 2304 2313 A W T Q T R F H L P V W L G F G T A F K КН TTT GCA TGG ACT CAG ACC AGG TTC CAT CTC CCA GTT TGG CTT GGG TTT GGG ACG GCG TTC AAA CAT 2325 2334 2343 2352 2361 2370 2379 A I K K D S K N L Q M L Q E M Y K T W P F F GCC ATT AAA AAA GAC AGC AAG AAT CTT CAA ATG CTT CAA GAA ATG TAC AAA ACA TGG CCT TTC TTT 
 2391
 2400
 2409
 2418
 2427
 2436
 2445

 T
 I
 D
 L
 V
 E
 M
 V
 F
 A
 K
 G
 D
 P
 G
 I
 A
 A
 L
 R V T. N CGG GTC ACC ATT GAT TTA GTT GAA ATG GTG TTT GCT AAA GGT GAC CCT GGC ATT GCT GCC CTG AAC 2457 2466 2475 2484 2493 2502 2511 CLLVSEDLWPFGESLRANYEE Κ GAC AAG CTC CTT GTT TCT GAA GAT CTA TGG CCC TTT GGA GAA TCT TTA AGA GCA AAC TAT GAA GAA 2523 2532 2541 2550 2559 2568 2577 T K D Y L L K I A G H K D L L E G D P Y L K ACC AAA GAT TAT CTT CTC AAG ATT GCT GGA CAT AAG GAC CTT CTA GAG GGT GAT CCC TAC TTA AAA 2589 2598 2607 2616 2625 2634 2643 Q R I R L R D A Y I T T L N V C Q A Y T L K CAA AGA ATC AGG CTG CGT GAT GCA TAC ATC ACA ACC TTA AAT GTA TGC CAA GCT TAT ACC CTA AAG 
 2655
 2664
 2673
 2682
 2691
 2700
 2709

 R I R D P N Y H V T L R P H I S K E Y A A E
 R AGG ATC CGC GAC CCG AAC TAT CAT GTG ACA TTA AGG CCT CAT ATT TCC AAA GAA TAC GCA GCT GAG 2721 2730 2739 2748 2757 2766 2775 P S K P A D E L I H L N P T S E Y A P G L E CCG AGC AAA CCA GCT GAT GAG CTT ATC CAC CTG AAC CCA ACC AGT GAG TAC GCA CCT GGT TTG GAG 
 2787
 2796
 2805
 2814
 2823
 2832
 2841

 T
 L
 I
 M
 K
 G
 I
 A
 G
 M
 Q
 N
 T
 G
 I
 A
 G
 M
 Q
 N
 T
 G
 I
 A
 G
 M
 Q
 N
 T
 G
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I
 I GAC ACC CTC ATC TTG ACC ATG AAA GGG ATT GCT GCT GGG ATG CAG AAC ACC GGT **TAG** GTC AAC CGT 2853 2862 2871 2880 2889 2898 2907 TAT GCA AGT ATA TAG TTA TCT ATT TTT CAT GCT TTT GGA TGT TGT CAC ATG CCT TGT TTA CTG CAT 2919 2928 2937 2946 2955 2964 GTG TTC TTG AGT GTT TGT ATG CAT CAT CAA TCC ATG CAT TGC AGA AGT TGT ACT GTG TGC ATC ATT 2994 3021 2985 3003 3012 3030 3039

GAT GGT GGT TTA TAT TAT TGT ACA CTT GAG TAC AAG TGA TTA A**AT AAA T**TG TGT GCT TTC TAC TTA 3051 3060 3069 3078 3087 3096 3105 Xho I AAA AAA AAA AAA AAA AAA <u>AAC TCGAG</u> 3117 3126

b) DNA-Sequenz und Aminosäureübersetzung des ppc-cDNA-Klons pcFpubppcA1:

ECOR T GAATT CGG CAC GAG ATT CAA ACT CAC ACA CTT CAT ATC TCA TAG TCT CAT ACT TCA TCT ATA -145 -136 -127 -118 -109 -100AAT ACC CAA TCC CCA ATT CAT TTT GCT TAA AGT CTC AAC ACT GAG CAT AAC CAA TAT TCA GGG TTG -85 -76 -67 -58 -49 -40 -31 M A N R N L E K L A S I I т р GAG GGG AAT TAA GCA AGG GTG TGA GTA **ATG** GCT AAC AGG AAT TTG GAG AAA TTA GCA TCG ATC GAC -19 -10 -1 9 18 27 L R L L V P G K V S E D D K L I E Y 36 D GCT CAA TTG AGG CTT TTA GTC CCG GGG AAA GTT TCT GAG GAT GAC AAG CTT ATT GAG TAT GAT GCT 48 57 66 75 84 93 102 L D K F L D I L Q D L H G E D L K E A V L т. TTG CTT TTG GAT AAG TTT CTG GAT ATT CTT CAG GAT TTG CAT GGG GAA GAT CTC AAG GAA GCG GTT 114 123 132 141 150 159 168 Q E C Y E L S A E Y E G K H D P K K L E E L CAA GAA TGC TAT GAG CTA TCA GCT GAA TAT GAA GGA AAA CAT GAC CCG AAG AAA CTG GAG GAG CTT 
 180
 189
 198
 207
 216
 225
 234

 V
 L
 T
 S
 L
 P
 G
 D
 S
 I
 V
 I
 A
 K
 A
 F
 S
 H
 180 GGA AGT GTG TTG ACA AGT TTA GAT CCA GGG GAT TCC ATT GTC ATT GCA AAA GCT TTT TCT CAC ATG 
 246
 255
 264
 273
 282
 291
 300

 L A N L A E E V Q I A Y R R R I K L K F
 L N KR CTT AAC TTG GCC AAT CTG GCT GAA GAA GTT CAG ATT GCT TAC CGC CGA AGA ATC AAA CTG AAG AGA 
 312
 321
 330
 339
 348
 357
 366

 F A D E A N A T T E S D I E E T F K R L
 GGC GAT TTT GCT GAT GAG GCT AAT GCA ACA ACT GAA TCA GAT ATT GAA GAA ACT TTC AAG AGA CTT 
 378
 387
 396
 405
 414
 423
 432

 K L N K S P E E V F D A L K N Q T V D
 Image: Compare the second secon vн GTG CAT AAG CTT AAC AAG TCT CCT GAA GAG GTT TTT GAT GCA CTC AAG AAC CAA ACA GTT GAC TTG 
 444
 453
 462
 471
 480
 489
 498

 T A H P T Q S V R R S L L Q K H G R I R
 V L GTC TTG ACT GCT CAT CCA ACT CAG TCT GTC CGC AGA TCT TTG CTT CAA AAG CAT GGA AGG ATT CGT 510 519 528 L A Q L Y A K D I 537 546 555 564 T P D D K Q E L D E A Ν C т. AAC TGT CTG GCC CAG TTA TAT GCC AAA GAC ATC ACC CCT GAT GAT AAG CAG GAA CTG GAT GAG GCT 576 585 594 603 612 621 630 L H R E I Q A A F R T D E I R R T P P T P TTG CAT AGA GAA ATC CAA GCT GCA TTC CGT ACT GAT GAA ATC AGG AGG ACC CCA CCA ACA CCA CAA 
 642
 651
 660
 669
 678
 687
 696

 M R A G M S Y F H E T I W K G V P K F I
 F L GAT GAA ATG AGA GCT GGA ATG AGT TAC TTC CAT GAA ACA ATC TGG AAG GGT GTT CCT AAA TTC TTA 708 717 726 735 744 753 V D T A L K N I G I N E R V P Y N A 762 P T. R R CGT CGT GTT GAC ACT GCC CTA AAG AAT ATA GGG ATT AAT GAA CGT GTT CCC TAT AAC GCA CCT CTA 774 783 792 801 810 819 828 F S S W M G G D R D G N P R V T P E V T і о ATT CAA TTC TCT TCA TGG ATG GGT GGT GGC CGT GAT GGC AAT CCA AGG GTA ACT CCT GAG GTA ACG 840 849 858 867 876 885 894 V C L L A R M M A S N M Y F S Q I E D I R D D T. AGG GAT GTT TGT TTA CTA GCC AGA ATG ATG GCT TCA AAC ATG TAC TTT TCT CAG ATA GAG GAT CTA 906 915 924 933 942 951 960 E M S M W R C N S E L R V R A E E L Y R ATG TTT GAG ATG TCT ATG TGG CGT TGC AAT AGT GAA CTA CGT GTT CGA GCA GAA GAA CTG TAT AGA 
 972
 981
 990
 999
 1008
 1017
 1026

 R R D V K H Y I E F W K Q V P P T E P Y
 т А v ACA GCA AGA AGA GAT GTG AAG CAC TAT ATA GAG TTC TGG AAA CAG GTT CCT CCC ACT GAA CCT TAT 1038 1047 1056 1065 1074 1083 1092 I L G D V R D K L Y N T R E R S R H L L CGT GTA ATT CTT GGT GAT GTA AGG GAC AAA TTA TAT AAT ACA CGT GAA CGA TCA CGC CAT TTA TTA 1104 1113 1122 1131 1140 1149 1158 G M S D I P D E A V Y T N V E Q F L E н GCC CAT GGA ATG TCT GAT ATT CCA GAT GAA GCT GTT TAT ACC AAT GTT GAA CAG TTC TTG GAA CCA 1170 1179 1188 1197 1206 1215 1224 L E L C Y R S L C D C G D R V I A D G S L L CTG GAG CTA TGC TAC AGA TCA CTA TGT GAC TGT GGT GAC CGT GTG ATT GCT GAT GGA AGC CTT CTT 1236 1245 1254 1263 1272 1281 1290 FLRQVSTFGLSLVKLDIRQES D GAT TTT CTA AGA CAA GTG TCA ACT TTT GGG CTC TCA CTT GTA AAA CTT GAT ATA AGA CAA GAA TCT 1311 1320 1329 1338 1347 1356 1302

1368 1377 1386 1395 1404 1413 1422 S E E K R Q E W L L A E L S G K R P L F G S G S TCT GAA GAA AAA CGC CAA GAG TGG CTT CTA GCT GAA CTC AGT GGA AAA CGT CCT CTT TTC GGT TCA 1434 1443 1452 1461 1470 1479 1488 D L P K T E E V K D V L D T F N V L A E L P GAC CTT CCA AAA ACT GAG GAA GTT AAG GAT GTT TTA GAC ACG TTT AAT GTT TTA GCA GAA CTC CCA 1500 1509 1518 1527 1536 1545 1554 S D C F G A Y I I S M A T S P S D V L A V E TCT GAC TGT TTC GGT GCT TAC ATT ATC TCA ATG GCC ACA TCA CCT TCT GAT GTC CTT GCT GTT GAG 1566 1575 1584 1593 1602 1611 1620 L L Q R E C H V K H P L R V V P L F E K L A CTT CTC CAA CGC GAA TGC CAT GTA AAA CAT CCA TTA CGC GTG GTC CCC CTA TTT GAA AAA CTG GCT 1632 1641 1650 1659 1668 1677 1686 D L E A A P A A M A R L F S I D W Y R N R GAC CTG GAG GCG GCC CCT GCG GCC ATG GCC CGC CTT TTC TCA ATC GAT TGG TAC AGA AAC CGG ATC 1698 1707 1716 1725 1734 1743 1752 D G K Q E V M I G Y S D S G K D A G R F S A GAC GGT AAA CAA GAA GTC ATG ATT GGG TAC TCT GAT TCA GGA AAA GAT GCA GGC CGG TTT TCT GCT 1764 1773 1782 1791 1800 1809 1818 A W Q L Y K A Q E E I I K V A K E F G V K L GCA TGG CAG CTC TAC AAA GCT CAA GAA GAG ATT ATT AAA GTT GCA AAA GAG TTT GGA GTC AAA CTT 1830 1839 1848 1857 1866 1875 1884 V I F H G R G G T V G R G G G P T H L A L L GTT ATA TTT CAT GGG CGT GGT GGA ACT GTC GGT AGA GGT GGG GCC ACA CAT CTG GCG CTT CTC 1896 1905 1914 1923 1932 1941 1950 S Q P P D T I H G S L R V T V Q G E V I E Q TCT CAA CCA CCA GAC ACC ATT CAC GGG TCT TTA AGA GTC ACA GTT CAG GGT GAG GTC ATT GAG CAG 
 1962
 1971
 1980
 1989
 1998
 2007
 2016

 F
 G
 E
 H
 L
 C
 F
 T
 L
 Q
 R
 F
 C
 A
 T
 L
 E
 S F Е Н TCG TTT GGT GAG GAA CAT TTG TGT TTT AGA ACA CTT CAG AGA TTT TGT GCA GCT ACA CTT GAG CAT 
 2028
 2037
 2046
 2055
 2064
 2073
 2082

 G M N P P I S P R P E W R E L M D Q M A V
 GGG ATG AAC CCA CCA ATC TCA CCA CGG CCC GAG TGG CGT GAA CTT ATG GAC CAG ATG GCT GTT GTT 
 2094
 2103
 2112
 2121
 2130
 2139
 2148

 T
 E
 Y
 R
 S
 I
 V
 F
 K
 E
 P
 R
 V
 F
 R
 L
 A
 GCA ACC GAG GAG TAC CGT TCT ATT GTG TTC AAG GAA CCA CGT TTT GTG GAG TAT TTC CGC CTT GCA 
 2160
 2169
 2178
 2187
 2196
 2205
 2214

 T P E L E Y G R M N I G S R P S K R K P S
 G ACA CCT GAA CTG GAG TAC GGG CGT ATG AAT ATC GGA AGT CGC CCA TCA AAA AGA AAA CCT AGT GGT 2226 2235 2244 2253 2262 2271 2280 G I E S L R A I P W I F **A** W T Q T R F H L P GGC ATT GAA TCA CTC AGG GCC ATT CCA TGG ATC TTT GCA TGG ACT CAG ACC AGG TTC CAT CTC CCA 2292 2301 2310 2319 2328 2337 2346 V W L G F G T A F K H A I K K D S K N L Q I о м GTT TGG CTT GGG TTT GGG ACG GCG TTC AAA CAT GCC ATT AAA AAA GAC AGC AAG AAT CTT CAA ATG 2358 2367 2376 2385 2394 2403 2412 L Q E M Y K T W P F F R V T I D L V E M V CTT CAA GAA ATG TAC AAA ACA TGG CCT TTC TTT CGG GTC ACC ATT GAT TTA GTT GAA ATG GTG TTT 
 2424
 2433
 2442
 2451
 2460
 2469
 2478

 A K G D P G I A A L N D K L L V S E D L W 1
 W P GCT AAA GGT GAC CCT GGC ATT GCT GCC CTG AAC GAC AAG CTC CTT GTT TCT GAA GAT CTA TGG CCC 2490 2499 2508 2517 2526 2535 2544 F G E S L R A N Y E E T K D Y L L K I A G H G H TTT GGA GAA TCT TTA AGA GCA AAC TAT GAA GAA ACC AAA GAT TAT CTT CTC AAG ATT GCT GGA CAT 2556 2565 2574 2583 2592 2601 2610 K D L L E G D P Y L K Q R I R L R D S Y I AAG GAC CTT CTA GAG GGT GAT CCC TAC TTA AAA CAA AGA ATC AGG CTG CGT GAT TCA TAC ATC ACA 2622 2631 2640 2649 2658 2667 2676 T L N V C Q A Y T L K R I R D P N Y H V T L ACC TTA AAT GTA TGC CAA GCT TAT ACC CTA AAG AGG ATC CGC GAC CCG AAC TAT CAT GTG ACA TTA 2688 2697 2706 2715 2724 2733 2742 P H I S K E Y A A E P S K P A D E L I H L R Р AGG CCT CAT ATT TCC AAA GAA TAC GCA GCT GAG CCG AGC AAA CCA GCT GAT GAG CTT ATC CAC CTG 2754 2763 2772 2781 2790 2799 2808 N P T S E Y A P G L E D T L I L T M K G I A AAC CCA ACC AGC GAG TAC GCA CCT GGT TTG GAG GAC ACC CTC ATC TTG ACC ATG AAA GGG ATT GCT 2820 2829 2838 2847 G M Q N T G 2856 2865 2874 GCT GGA ATG CAG AAC ACC GGT **TAG** GTT AAC CGT TAT GCA AGT ATA TAG TTA TCT TTT TTT CAT GCT 2886 2895 2904 2913 2922 2931 2940 TTT GGA TGT TGT CAC ATG CCT TGT TTA CTG CAT GTG TTC TTG AGT GTG TGT ATG CAT CAT CAA TCC 2952 2961 2970 2979 2988 2997 ATG CAT TGC AGA AGT TGT ACT ATG TGC ATC ATT GAT GGT GGT TTA TCC AAG AAA CTA ATG ACT TAT 3045 3063 3072 3018 3027 3036 3054 Xho I tgt aca ctt gag tac aag tga tta t**at aaa t**tg tgt gct ttc tgc tta aaa aaa aaa aaa aaa aaa aaa c $\underline{\mathsf{tcgag}}$ 3084 
 3093
 3102
 3111
 3120
 3129
 3138

# Anhang B: ppc-cDNA-Klon aus Chloris guyana

DNA-Sequenz und Aminosäureübersetzung des ppc-cDNA-Klons pcChgppc22:

Die Vektorrestsequenzen sind unterstrichen und die enthaltenen Klonierungsschnittstellen am Anfang und Ende der Sequenz durch Namen gekennzeichnet. Start- und Stopcodon der proteincodierenden Sequenz, als auch das Serin der binär-variablen Ser/Ala-Position sind fett gedruckt.

АТКАЕКН EcoR I М GAA TTC GGC ACG AGG CTT CCC TGC CCG GCA GCC ATG GCT ACC AAG GCC GAG AAG CAC CAC 12 21 D D K T D L V TCC ATT GAC GCG CAG CTC AGG CTC CTG GCT CCC GGC AAG GTC TCG GAG GAC GAC AAG CTC GTC GAG 63 I L Q 45 L I D R 54 F L D 72 36 81 90 ΙL L н Y D L  $\mathbf{L}$ G Α N S Α L R TAC GAT GCC CTG CTC ATC GAC CGC TTC CTG GAC ATC CTC CAG AAC CTC CAT GGC TCA GCC CTC CGT 147 V K R D 102 111 120 129 V Q E C Y E M S A E Y D 156 DET E L R GAA CTC GTC CAG GAG TGC TAC GAG ATG TCC GCC GAG TAC GAC GTG AAG CGC GAC GAG ACG CGC CTG 168 177 L G A K L S 186 G L D 195 P A D 204 213 A I T V A 222 A I D s E S F GAC GAG CTG GGC GCC AAG CTG AGC GGG CTG GAC CCG GCC GAC GCC ATC ACC GTG GCC AGC TCC TTC 261 E V Q 243 252 270 279 234 288 LAE L A N S H M L N I A Q R R R S TCG CAC ATG CTC AAC CTG GCC AAC CTT GCC GAG GAG GTG CAG ATC GCG CAG CGC CGC AGG AGC AAG 300 309 F S D 318 327 E G S A T T 336 E S D 345 I E E 354 G D т L K Н CTC AAG CAC GGC GAC TTC TCC GAC GAG GGC TCC GCC ACC ACC GAG TCC GAC ATC GAG GAG ACG CTC 375 E I G 384 ĸ S P 393 Q E V 366 402 F D 411 420 366 L V S 411 T. K N к R K S Α 0 AAG AGG CTC GTC TCC GAG ATC GGC AAG TCG CCG CAG GAG GTG TTC GAC GCG CTC AAG AAC CAG ACC 450 P T Q 459 S L R 432 441 468 477 486 2 V L ТАН R S L Н Т V E L L O K GTC GAG CTC GTG CTC ACC GCT CAC CCC ACC CAG TCC CTC AGG AGG TCC CTC CAG AAG CAC ACC 507 L T Q 498 R N C 516 525 LYAKDI 534 543 552 534 T E D ЕКК К Ι Е L AAG ATC CGC AAC TGC CTC ACC CAG CTG TAC GCC AAG GAC ATC ACC GAG GAT GAG AAG AAG GAG CTC 573 A E I 582 Q A A 591 F R T 600 D E I 564 A L Q 609 618 D Е R R s 0 GAC GAG GCT CTG CAG GCA GAG ATC CAA GCT GCC TTT AGA ACC GAC GAG ATC AGG AGG TCC CAG CCC 630 639 648 657 666 675 684 657 У F Н G M S ЕТІ M R Y т р Q D E W K G V P ACC CCG CAG GAC GAA ATG CGT TAC GGG ATG AGC TAC TTC CAC GAG ACC ATC TGG AAG GGC GTG CCC 732 I N E 705 V D T 714 A L K 723 S I G 741 R L P 696 750 696 L R R K F Y D AAG TTC CTG CGC CGC GTC GAC ACC GCT CTC AAG AGC ATT GGC ATC AAC GAG CGC CTG CCC TAC GAC 771 F S S 780 W M G 789 G D R 798 762 807 816 Р v т к D G N v Р R т Р Α GCT CCG GTC ATC AAG TTC TCT TCC TGG ATG GGT GGT GAC CGT GAC GGA AAC CCG AGG GTT ACA CCC 828 837 846 855 V C L L A R M A 864 A N L 873 882 ozo TRD E V Y V S S GAG GTG ACA AGG GAT GTG TGC CTG CTG GCC AGA ATG ATG GCC GCA AAC CTG TAC GTC TCT TCG ATT 939 \* R A 894 L M F 903 E L S 912 M W R 921 C N D 930 E L R 948 E D D E GAA GAT CTC ATG TTT GAG CTC TCC ATG TGG CGT TGC AAC GAC GAG CTT CGT GCC CGC GCT GAC GAG 996 978 К Н Ү 1005 960 969 987 1014 987 I E F ЕТ К WR н Τ. S R А т р Е S Е А CAC CTT GCT TCA AGG GAG ACC AAG AAG CAC TAC ATT GAG TTC TGG AGG GCG ATT CCT GAG AGT GAG 1026 1035 1044 1053 1062 1071 R V L L G Y V R D K L Y N T R E R A 1080 Р L CCT TAC CGT GTG CTG CTC GGG TAC GTG AGG GAC AAA CTG TAC AAC ACG CGC GAA CGT GCG CTC CAC 1092 v 1146 1137 1101 1110 1119 YSEIKEEA 1128 I T М G т V E F M L S Е ATG CTG ACC AAG GGA TAC TCT GAA ATC AAG GAG GAG GCA ACC ATC ACA AGC GTT GAG GAG TTC ATG 1176 1185 S L C D C 1158 1167 1194 1203 1212 5 C G LEV С Ү К К Т D А D G GAG CCC CTT GAG GTG TGC TAC AAA TCC CTG TGC GAC TGC GGC GAC AAG ACC ATC GCG GAC GGG TTG 1224 1233 1242 1251 1260 1269 1278 D F M R Q V N T F G L S L A K L D I R L L CTG CTG GAC TTC ATG CGT CAG GTG AAC ACC TTC GGG CTG TCC CTG GCC AAG CTG GAT ATC CGG CAG 1290 1299 1308 1317 1326 1335 1344

E R H T D A V D A I T T H L G I G S Y K GAG TCG GAG CGG CAC ACG GAC GCC GTG GAC GCC ATC ACC ACG CAC CTG GGC ATC GGC TCC TAC AAG 1356 1365 1374 1383 1392 1401 1410 E W P E E K R Q E W L L S E L Q G K R P L L GAG TGG CCC GAA GAG AAG AGG CAG GAG TGG CTG CTC TCC GAG CTG CAG GGC AAG CGC CCG CTG CTG 1422 1431 1440 1449 1458 1467 1476 V P D L P V T E E V E A V L G C F K V L A E GTG CCC GAC CTG CCC GTC ACC GAG GAG GTC GAG GCC GTG CTC GGC TGC TTC AAG GTC CTG GCT GAG 1488 1497 1506 1515 1524 1533 1542 L P R D S F G P Y I I S M A T A P S D V L CTC CCC CGC GAC AGC TTC GGC CCG TAC ATC ATC TCC ATG GCC ACG GCC CCG TCC GAC GTG CTC GCC 
 1554
 1563
 1572
 1581
 1590
 1599
 1608

 V E L L Q R E C G V R Q P L P V V P L F E R
 GTC GAG CTC CTG CAG AGG GAG TGC GGC GTC CGC CAG CCG CTG CCC GTG GTG CCC CTG TTC GAG AGG 1620 1629 1638 1647 1656 1665 1674 A D L Q N A P A S V E R L F S I D W Y L N т. L N CTC GCT GAC CTG CAG AAC GCC CCC GCT TCC GTG GAG CGC CTC TTC TCC ATC GAC TGG TAC CTG AAC 1686 1695 1704 1713 1722 1731 1740 R I G G K Q Q I M V G Y S D S G K D A G R L CGC ATC GGT GGC AAG CAG CAG ATC ATG GTT GGG TAC TCG GAC TCC GGC AAG GAC GCC GGG CGT CTG 1752 1761 1770 1779 1788 1797 1806 S A A W Q L Y Q A Q E L V A Q V A K K Y D V TCG GCC GCG TGG CAG CTG TAC CAG GCG CAG GAG CTG GTG GCC CAG GTG GCC AAG AAG TAC GAC GTC 1818 1827 1836 1845 1854 1863 1872 K V T F F H G R G G T V G R G G G P T H L A AAG GTC ACC TTC TTC CAC GGC AGG GGT GGC ACC GTC GGC AGG GGC GGT GGC CCC ACC CAC CTG GCC 1884 1893 1902 1911 1920 1929 1938 I L S Q P P E T I N G S L R V T I Q G E V I ATC CTG TCC CAG CCG CCG GAG ACC ATC AAC GGC TCC CTC CGT GTC ACC ATC CAG GGA GAG GTC ATC E ' 1950 1959 1968 1977 1986 1995 2004 H S F G E E H L C F R T L Q R F T A A T L GAG CAC TCC TTC GGG GAG GAG CAC CTC TGC TTC CGC ACC CTG CAG CGC TTC ACC GCC GCC ACG CTC 2016 2025 2034 2043 2052 2061 2070 E H G M H P P I S P K P E W R K L M D E M A GAG CAC GGC ATG CAC CCG CCC ATC TCG CCC AAG CCC GAG TGG CGC AAG CTC ATG GAC GAG ATG GCC 
 2082
 2091
 2100
 2109
 2118
 2127
 2136

 V
 V
 A
 T
 D
 A
 Y
 R
 S
 V
 V
 K
 E
 P
 R
 F
 V
 Y
 F
 R
 FR GTC GTC GCC ACC GAC GCC TAC CGC TCC GTC GTC GTC GAG GAG CCG CGC TTC GTC GAG TAC TTC AGA 2148 2157 2166 2175 2184 2193 2202 S A T P E T E Y G R M N I G S R P A K R R P TCG GCC ACG CCT GAG ACT GAG TAC GGC CGC ATG AAC ATT GGT AGT CGT CCG GCC AAG AGG AGG CCC 2214 2223 2232 2241 2250 2259 2268 G G G I T T L R A I P W I F **S** W T Q T R F H GGC GGT GGC ATC ACC ACC CTG CGT GCC ATC CCC TGG ATC TTC TCC TGG ACC CAG ACC AGG TTC CAC 2280 2289 2298 2307 2316 2325 2334 L P V W L G V G S A F K S A I D K D I K N F CTC CCC GTC TGG CTC GGA GTT GGC AGC GCC TTC AAG AGC GCC ATC GAC AAG GAC ATC AAG AAC TTC 2346 2355 2364 2373 2382 2391 2400 LLKDMYREWPFFRVTLDLLEM CAG CTG CTC AAG GAC ATG TAC AGG GAG TGG CCC TTC TTC AGA GTC ACC CTC GAC CTG CTC GAG ATG 
 2412
 2421
 2430
 2439
 2448
 2457
 2466

 V F A K G D P G I A A L Y D K L L V T D E
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2
 2</td GTG TTC GCC AAG GGA GAC CCC GGC ATC GCC GCT CTC TAC GAC AAG CTG CTC GTC ACT GAT GAG CTC 2478 2487 2496 2505 2514 2523 2532 K P F G E Q L R S K Y A E T E Q L L L Q I A AAG CCA TTC GGT GAG CAG CTT AGG AGC AAA TAT GCG GAG ACG GAG CAG CTT CTC CTT CAG ATC GCC 2544 2553 2562 2571 2580 2589 2598 H K E I L E A D P Y L K Q R L R L R D P Y G GGG CAC AAG GAA ATT CTT GAG GCC GAT CCT TAC CTG AAG CAG CGC CTG CGC CTG CGT GAC CCC TAC 
 2610
 2619
 2628
 2637
 2646
 2655
 2664

 I T T L N V F Q A Y T L K Q I R D P N F K
 ATC ACC ACC CTC AAC GTC TTC CAG GCC TAC ACC CTC AAG CAG ATC AGG GAC CCC AAC TTC AAG GTG 
 2676
 2685
 2694
 2703
 2712
 2721
 2730

 Y
 Q
 P
 L
 N
 K
 E
 Q
 L
 V
 K
 L
 N
 P
 A
 S
 Y
 A
 S
 Y
 A
 A
 Y
 A
 Y
 A
 Y
 A
 Y
 A
 Y
 A
 Y
 A
 Y
 A
 Y
 A
 Y
 A
 Y
 Y
 A
 Y
 A
 Y
 A
 Y
 A
 Y
 A
 Y
 A
 Y
 A
 Y
 A
 Y
 A
 Y
 A
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y
 Y AAG ACG CAG CCG CCG CTC AAC AAG GAG CAA GAC CTG GTC AAG CTC AAC CCG GCC AGC GAG TAC GCG 2742 2751 2760 2769 2778 2787 2796 P G L E D T L I I T M K G I A A G M Q N T G CCG GGA CTG GAG GAC ACC CTC ATC ACC ATG AAG GGT ATC GCC GCC GGT ATG CAG AAC ACC GGC 2808 2817 2826 2835 2844 2853 2862 TAG AAT ACC GGC TCG GCA GAG TGC TCG AGG CCT GTG CAG CCA TGC GGT TTA CCA GCC TGC AAT TTA 2874 2883 2892 2901 2910 2919 2928 TTA CAA CTT CAA CTG TTG TTC CCT TAT TAC ACC CCC CAC CAC GTG TTT GTG TTT TTT ATT TAT TTT 2949 2958 2967 2976 2985 2940 2994 CAC ACT TGA AGG GCA GAC AAA CCC TTC CTA TCT ATG TTT CCT TGT GAC AAA ATA CAT CCA TCT GGG 3015 3024 3033 3042 3051 3060 3006 ATG TAA TGA **ATA AAT** ACC ATC TAT TTT TAT TAT GCT ATT CCT TTG TTT TCT TAC TAA AAA AAA AAA 3081 3090 3099 3108 3072 3117 3126 Xho I AAA AAA AAA AAA AAA A<u>CT CGA G</u> 3138 3147

# Anhang C: ppc-cDNA-Klone der inversen cDNA-PCR aus Neurachne munroi

#### und Panicum antidotale

Die Vergleiche wurde mit ClustalX (Vers. 1.8.1, siehe Material und Methoden) durchgeführt. Die flankierenden Sequenzbereiche der Primer sind wegen ihrer Degeneration nicht aufgeführt.

a) 3'-Enden der cDNA ohne Primersequenzen bis Poly-A-Bereich:

Die Stop-Codons der proteincodierenden DNA-Sequenz sind fett gedruckt und grau hinterlegt. Die konservierten Aminosäuren des C-Terminus sind über der DNA-Sequenz abgebildet und identische DNA-Sequenzpositionen

O N T G Stop N02 CATTGCTGCTGGCATGCAGAACACGGGCTAGGCTGCTCGTTCACTGCAGAGTGAGCA--CTAACGGCACCACGCTACTACA N06 CATTGCTGCTGGCATGCAGAACACGGGCTAGGCTCGCTCACTGCAGAGTGAGCA--CTAACGGCACCACGCTACTACA N04 TATAGCCGCCGGTCTGCAGAACACCGGGT**TAG**GACAAGGAAGGGATCTATCACTTCTG-ATCATCTGCTCAAGGGCTTTGTA N10 TATAGCCCGCCGGTCTGCAGAACACCCGGT**TAG**GACAAGGAAGGGATCTATCACTTCTG-ATCATCTGCTCAAGGGCTTTGTA P02 CATAGCTGCCGGCCTGCAGAACACTGGT**TAA**GACAAGGAGAAGATCCAATTGTTCTG-ATCATTTGCTTTAGGCCTTTGTA P08 TATCGCCGCTGGGATGCAGAACACTGGCTAGGCCAGATCCTCGGTGTACAAATAAC---CCATCTGAGAAGAGGTGGTGAA TATCGCCGCTGGGATGCAGAACACTGGCTAGGCCAGATCCTCGGTGTACAAATAAC---CCATCTGAGAAGAGGTGGTGAA P10 P12 CATTGCTGCTGGGATGCAGAACACTGGT**TAA**GCCAAGAAATTTTCTCCCCGGAAAGGACACCATTTGCACCTTG--AGTGTA N02 N06 N04 ATTT-TGCCCATTGTAG--CTGCATC---TTTGTTCGTCTCCCTACACCGTGAGAAAATAATG--GCGTTATCGCCGA--N10 ATTT-TGCCCATTGTAG--CTGCATC---TTTGTTCGTCTCCCTACACCGTGAGAAAATAATG--GCGTTATCGCCGA--P02 TTAC-TGCTTATTTTAA--CTGCATCGT-CTTTGATCGTCTCCCTACACCGTGAGAAAATAATG--GCGTTTCCGCCGA--P08 CGATACATGTTAAGCAG-GTA-GTTCGC-CGGCACTAGCGTGTTCTCTGCAGGAGTTTTTTT-ATGTCGGAGCCTTTT P10  ${\tt CGATACATGTTAAGCAG-GTATGTTCGC-CGGCACGAGTGTGTTCTCTTCTGCAGGAGTTTTTT--ATGTCGGAGCCTTTT}$ P12 CCTT--GAATCTGATCA--CTTGCTCCCGGCGCAATACTTTTGCCGATGTAGCTGCTTCTTTCACTTCCCCACTGGCAATA N02 TGTGTTACTGTATGCAG-TGTTATAATGG---TAT--GGTCTATTTAAACATAAGATATGTGTTCTTCC-----TGTGTTACTGTATGCAG-TGTTACAATGG---TAT--GGTCTATTTAAACATAAGATATGCGTTCTTTTACATAAAAAAGT N06 AGTGGTGGTGAATAAAAGGGAGACAGTGATCATATCTGATCTGTTTGTAGACA-GTTAC-TTGTGACTTCACAATGGAACA N04 N10 AGTGGTGGTGAATAAAAGGGAGACAGTGATCATATCTGATCTGTTTGTAGACA-GTTAC-TTGTGACTTCACAATGGAACA P02 AGTGGTGTTAAATAAAAGGGAGGCAATGATCATACCCGATCTGTTCGTAGACA-GTTGTGCTGTAACTT---A----CA P08 GGTTTTGCTTGATGTAAATGTCAAGGGGAGCTTAT--TGGCTGTTGAAGCTT--GATGCGAAATAAATTATGGAACAACTA P10 GGTTTTGCTTGATGTAAATGTCAAGGGGAGCTTAT--TGGCTGTTGAAGCTT--GATGCGAAATAAATTATGGANCAACTA P12 ATGGATTTTGTACCGGAACATCAATATGAGAACTT---AACAATAAATAGAAATGAAGTGGACGCTGTTG--\* N02 N06 GTTTCTACTATGTAAGACAATTATTTATCTGTTGGAACATTTGTTAAGTGTTGCAATGATTCTCTCGTGTACTTTTCT N04 N10 TGGCA-ACAGCCTAAA-GTGTGTTTTCTGTTTTGCTTGAAGTAG--------P02 P08 P10 P12

b) Poly-A, Sequenz der Sfi I-Schnittstelle und 5'-G-Nukleotid-Extension der cDNA:

Die Erkennungssequenz der Sfi I-Schnittstelle ist klein und fett dargestellt, identische Positionen mit \* markiert.

N02	ААААААААААААААААААААААААААААААСАТGTCggccAAAAATggccGGGG
N06	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
N04	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAANANNANANCNTGTCggccATTATggccGGGG
N10	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAACCNTGTCggccATTATggccGGGG
P02	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGACATGTC <b>ggccATTATggcc</b> GGGG
P08	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
P10	AAAAAAAAAAAAACATGTC <b>ggccATTATggcc</b> GGGG
P12	AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
	*** * * * ******* ******

c) 5'-Bereich der cDNA:

Die ATG-Startcodons sind fett gedruckt. Die konservierten Aminosäuren der Serin-Phosphorylierungsstelle sind über der DNA Sequenz abgebildet. Identische Sequenzpositionen sind mit \* gekennzeichnet.

N02	ACTGCATCGTGATAGCACC
N06	ACAACTGCATCGTGATAGCACC
N04	ACAACCATCGCAACCTCCTCCTCCACGGCCTTGCCAGAATCCGTAACCACCAGCGGCACC
N10	ACAACCATCGCAACCTCCTCCTCCACGGCCTTGCCAGAATCCGTAACCACCAGCGGCACC
P02	
P08	
P10	
P12	GATCGAATCTGCGTCTTAGTTCAGTCTG
N02	AACACCACACCTCTGCTAGCTCCTTCCCGCCGCTACGCCATGGCGTCCTCCAAGCCCA
N06	AACACCACACCTNTGNTAGCTCCTTCCCGCCGCTACGCCATGGCGTCCTCCAAGCCCA
N04	-GCGGTTGGTTTGGGTTGGATCAGATTAGGCGGGCGCCATGGCGGCCTTGG
N10	CGCGGTTGGTTTGGGTTGGATCCAGATTAGGCGGGCGCCCATGGCGGCGCCTTGG
P02	
P08	
P10	
P12	TTTGTTGAGTTCTTGCATCGAATCGAGCCAGTGGTGGTTCCTGTGGGGAGTGTGGG <b>ATG</b> G
	S I D A Q>
N02	CCGGCCCCGTGGAGGCGGCACCACTCCATCGACGCGCAGCTCCGGCTCCTGGCCCCCGGC
N06	CCGGCCCCGTGGAG-CGGCACCACTCCATCGACGCGCAGCTCCGGCTCCTGGCCCCCGGC
N04	GGGCGAAGGTGGAG-CGGCTGTCGTCGATCGACGCGCAGCTGCGGATGCTGGTGCCCGGC
N10	GGGCGAAGGTGGAG-CGGCTGTCGTCGATCGACGCGCAGCTGCGGATGCTGGTGCCCGGC
P02	GGCCGAAGGTGGAG-CGGCTGTCGTCGATCGACGCACAGCTGCGGATACTGGTGCCGGGG
P08	GAG-CGGCACCAGTCGATCGACGCGCAGCTGCGGCTGCTGGCGCCAGGC
P10	GCGCCG <b>ATG</b> GAG-CGGCACCAGTCGATCGACGCGCAGCTGCGGCTGCTGGCGCCAGGC
P12	CGGGGAAGTTGGAG-AAGATGGCGTCGATCGACGCGCAGCTGCGGATGCTGGCGCCGGCG
	*** * ** ****** **** *** * *** * *
N02	AAGGTCTCCGAGGACGACAAGCTCGTCGAGTACGACGCCCTCCTCGTCGACCGCTTCCTC
N06	AAGGTCTCCGAGGACGACAAGCTCGTCGAGTACGACGCCCTCCTCGTCGACCGCTTCCTC
N04	AAGGTCTCGGAGGACGACAAGCTCATCGAGTACGACGCGCTCCTTCTTGACCGTTTCCTC
N10	AAGGTCTCGGAGGACGACAAGCTCATCGAGTACGACGCGCTCCTTCTTGACCGTTTCCTC
P02	AAGGTGTCGGACGACGACAAGCTCATCGAGTACGACGCGCTCCTCCTCGACCGCTTCCTC
P08	AAGGTCTCCGAGGACGACAAGCTCGTCGAGTACGACGCCCTCCTCGTCGACCGCTTCCTC
P10	AAGGTCTCCGAGGACGACAAGCTCGTCGAGTACGACGCCCTCCTCGTCGACCGCTTCCTC
P12	AAGCTGTCCGAGGACGACAAGCTGGTGGAGTACGACGCTCTCCTCCTCGACCGTTTCCTC
	*** * ** ** ********* * ******** ******

GACATTCTCCAGGACCTCCATGGCCCCAGCCTCCGCGAATTCGTCCAGGAGTGCTACGAG N02 N06 GACATTCTCCAGGACCTCCACGGCCCCAGCCTCCGCGAATTCGTCCAGGAGTGCTACGAG N04 GACATCCTGCAGGACCTCCGCGGCGACGACCTCAAGGAGATGGTTCAAGAATGCTATGAA GACATCCTGCAGGACCTCCGCGGCGACGACCTCAAGGAGATGGTTCAAGAATGCTATGAA N10 GACATCGTCCAGGACCTCCACGGCGACGACCTCAAGGAGATGGTTCAAGAATGCTATGAG P02 GACATCCTCCAGGACCTGCACGGCCCACACCTTCGTGAATTCGTGCAGGAGTGCTACGAG P08 P10 GACATCCTCCAGGACCTGCACGGCCCACACCTCCGTGAATTCGTGCAGGAGTGCTACGAG GACATCCTGCAGGACCTCCACGGCGAGGACCTCCGCGAGATGGTCCAAGAGTGCTATGAG P12 \*\*\*\*\* \* \*\*\*\*\*\*\* \*\*\* \*\*\* \*\* \* \*\* \*\* \*\* \*\*\*\*\* \*\* N02 N06 N04 GTAGCTGCTGAGTATGAAACGAAGCATGACTTACAAAAGCTTGATGAACTCGGCAAGATG GTAGCTGCTGAGTATGAAACGAAGCATGACTTACAAAAGCTTGATGAACTCGGCAAGATG N10 P02 GTAGCTGCTGAGTATGAAACGAAGCATGACTTGCAAAAGCTGGATGAACTTGGAAAGATG P08 P10 P12 ATAGCTGCTGAGTATGAAAGGAAGCATGACTCACAAAAACTTGATGAACTTGGCAACATG \* \* \* \*\* \*\*\*\* \*\* \*\* \*\* \* \* \* \*\* \*\* \* \* CTGGCCGGGCTGGCCCCGCCGACGCCATCGTCGTGGCAAGCTCCTTCTCG N02 N06 CTGACCGGGCTGGCCCCGCCGACGCCATCGTCGTGGCAAGCTCCTTCTCG N04 ATAACAAGCTTGGATCCCGGGGGACTCTATTGTGATTGCCAAGTCCTTTTCA N10 ATAACAAGCTTGGATCCCGGGGGACTCTATTGTGATTGCCAAGTCCTTTTCA P02 ATAACAAGCTTGGATCCTGGGGGACTCTATTGTGATGGCCAAATCTTTTTCA P08 CTCACCAGCCTGCCCCCGGTGACTCCATCGTCGTCGCCAGCTCCTTCTCG CTCACCAGCCTGCCCCCGGTGACTCCATCGTCGTCGCCAGCTCCTTCTCG P10 TTGACGAGCCTGGATCCTGGTGATTCAATTGTCATGGCCAAGGCATTCTCA P12 \* \* \* \*\* \*\* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\* \* \*\*\*

## Mein Dank geht an...

- Prof. Dr. Peter Westhoff, der diese Arbeit und mich geduldig betreut und alle Aktivitäten großzügig unterstützt hat. Sehr Herzlichen Dank !
- Herrn Prof. Dr. Strotmann für das Interesse an der Arbeit und die Bereitschaft als zweiter Gutachter zu wirken.
- den Schweden Dr. Per Svensson, f
  ür die Betreuung am Anfang, mit den langen Diskussionen, f
  ür die unvergessenen Aufenthalte in Schweden. Vielleicht sind wir verwandt?
- Ute Höcker, für den Langzeitgebrauch ihres geliebten iBooks.
- Udo Gowik und Sascha Engelmann, für die wertvollen Diskussionen und Zusammenarbeit.
- alle Mitglieder und Ehemaligen der Botanik IV f
  ür ihre Kritik, offene Ohren, derben Sp

   Sp

   ße, und Hilfsbereitschaft, die ich nicht vergessen werde. Merci, Marianne, f

   ür die Apfelst

   ückchen und die Nimm2-Bonbons !
- nicht zuletzt an das Gärtner-Team um Herrn Rogmann, für die schnelle grüne Hilfe.
- meine neuen Kollegen, die mich wohlwollend unterstützt haben.
- an Regina Pause, für das Korrekturlesen und das Unbezahlbare !

Hiermit versichere ich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ausschließlich unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt habe.

Düsseldorf, den 25. Juni 2001