

„Biochemische und molekulare Charakterisierung der  
pflanzlichen ATP-abhängigen Phosphofruktokinase aus  
*Spinacia oleracea*.“

INAUGURAL-DISSERTATION

zur

Erlangung des Doktorgrades

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Christian Winkler**

aus Hilden

**Düsseldorf 2006**

Aus dem Institut für Botanik III der Heinrich-Heine Universität  
Düsseldorf.

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

Referent: Prof. Dr. W. Martin  
Korreferent: Prof. Dr. R. Wagner

Tag der mündlichen Prüfung: 12. Dezember 2006

## Einleitung

|       |  |       |
|-------|--|-------|
| 1     | Phosphofruktokinase, ein Schrittmacherezym der Glykolyse.....                              | 01-03 |
| 1.1   | PP <sub>i</sub> -PFK in Pflanzen.....  | 04-05 |
| 1.2   | ATP-abhängige pflanzliche PFKs.....  | 05-07 |
| 1.3   | Effektoren der pflanzlichen Phosphofruktokinasen.....                                      | 07-08 |
| 1.3.1 | Die Rolle von Fruktose-Derivaten bei der Regulation pflanzlicher PFKs und PFPs.....        | 09-10 |
| 1.4   | <i>In silico</i> Analysen zur Phosphofruktokinase.....                                     | 10    |
| 1.4.1 | Spezifische Aminosäuren für die PP <sub>i</sub> und ATP abhängige Phosphofruktokinase..... | 10-11 |
| 1.4.2 | Evolution der PFK.....   | 11-14 |
| 1.5   | Zielsetzung.....   | 15    |

## Material und Methoden

|         |   |       |
|---------|---|-------|
| 2.1     | Verwendete Materialien.....   | 16    |
| 2.1.1   | Chemikalien.....  | 16    |
| 2.1.2   | Chromatographiematerialien (inkl. Konzentratoren und Dialyseeinheiten)..... | 16    |
| 2.1.3   | Antibiotika.....  | 17    |
| 2.1.4   | Antikörper.....   | 17    |
| 2.1.5   | Enzyme.....   | 17    |
| 2.1.5.1 | Restriktionsendonukleasen.....  | 17    |
| 2.1.6   | Geräte.....   | 17    |
| 2.1.7   | Kits.....   | 18    |
| 2.1.8   | Marker.....   | 18    |
| 2.1.9   | Oligonukleotide.....  | 18    |
| 2.1.9.1 | Oligonukleotide für PCR.....  | 18-19 |
| 2.1.9.2 | Oligonukleotide für 5'-RACE.....  | 19    |
| 2.1.9.3 | Oligonukleotide für 3'-RACE.....  | 19    |
| 2.1.9.4 | Oligonukleotide für Sequenzierung.....                                      | 19    |
| 2.1.10  | Vektoren.....   | 20    |
| 2.1.11  | Medien.....   | 20    |
| 2.2     | Verwendete Kulturen.....  | 21    |
| 2.3     | Kultivierung und Fraktionierung.....  | 21    |
| 2.3.1   | Haltung von <i>Escherichia coli</i> .....                                   | 21    |
| 2.3.2   | Haltung von <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....                           | 21    |

## Material und Methoden

|           |   |       |
|-----------|---|-------|
| 2.3.3     | Kultivierung von Spinat.....  | 21-22 |
| 2.3.4     | Bestimmung der optischen Dichte einer Bakterien- oder Hefesuspension.....       | 22    |
| 2.3.5     | Isolierung intakter Chloroplasten aus Spinat.....                               | 22    |
| 2.4       | Methoden im Umgang mit Proteinen.....   | 23    |
| 2.4.1     | Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....                              | 23    |
| 2.4.2     | Konzentrieren und Umpuffern von Proteinproben.....                              | 23    |
| 2.4.2.1   | Aceton Fällung von Proteinen.....   | 23    |
| 2.4.3     | Chromatographische Methoden.....  | 24    |
| 2.4.3.1   | Chromatographie über DEAE-Sepharose Fast Flow.....                              | 24    |
| 2.4.3.2   | Chromatographie über Gelfiltration.....   | 24    |
| 2.4.3.2.1 | Sephacryl S-400.....  | 24-25 |
| 2.4.3.2.2 | Superdex 200 HR 10/30.....  | 25    |
| 2.4.3.3   | Reactive Red Affinitätschromatographie.....                                     | 25    |
| 2.4.3.4   | MonoQ Anionentauscherchromatographie.....                                       | 26    |
| 2.4.3.5   | Chromatographie über Hydroxylapatit.....  | 26    |
| 2.4.3.6   | Affinitätschromatographie.....  | 26    |
| 2.4.3.6.1 | IMAC ( <i>engl.</i> Immobilized metal affinity chromatography).....             | 26-27 |
| 2.4.4     | Proteinreinigung über einen Saccharosegradienten.....                           | 27    |
| 2.4.5     | Enzymmessungen und Kinetiken zur Phosphofruktokinase.....                       | 27-28 |
| 2.4.6     | Massenspektroskopische Analysen von Proteinen.....                              | 28    |
| 2.4.6.1   | Tryptische Spaltung von Proteinen in SDS-Gelen.....                             | 28-29 |
| 2.4.6.2   | Proteinsequenzierung.....   | 30    |
| 2.4.7     | Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....                   | 30    |
| 2.4.8     | Färbung von Proteingelen.....   | 30    |
| 2.4.8.1   | Färben von Proteinen im Gel mit Coomassie Brilliant Blau.....                   | 30-31 |
| 2.4.8.2   | Silberfärbung von Proteingelen.....   | 31    |
| 2.4.9     | Western-Blot-Transfer.....  | 31-32 |
| 2.4.9.1   | Färbung von Nitrozellulosemembranen mit Ponceau-S.....                          | 32    |
| 2.4.9.2   | Immunodetektion von Proteinen.....  | 32    |
| 2.4.10    | Herstellen von Proteinrohextrakt.....   | 32    |
| 2.4.10.1  | Herstellung eines Proteinrohextraktes aus <i>Spinacia oleracea</i> .....        | 33    |
| 2.4.10.2  | Herstellung eines Proteinrohextraktes aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..... | 33    |
| 2.5       | Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren .....                                      | 33    |

## Material und Methoden

|           |   |       |
|-----------|---|-------|
| 2.5.1     | Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren.....          | 33    |
| 2.5.2     | Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren (DNA und RNA).....     | 34    |
| 2.5.3     | Präzipitation und Reinigung von Nukleinsäuren.....                      | 34-35 |
| 2.5.4     | Reinigung von polyadenylierter RNA aus isolierter Gesamt-RNA.....       | 35    |
| 2.5.5     | Extraktion von DNA aus Agarosegelen.....                                | 35    |
| 2.5.6     | Isolierung von Plasmid-DNA.....   | 35    |
| 2.5.6.1   | Präparation von Plasmid-DNA aus <i>Escherichia coli</i> .....           | 35    |
| 2.5.6.1.1 | Mini-Präparation.....   | 35-36 |
| 2.5.6.1.2 | Maxi-Präparation.....   | 36    |
| 2.5.6.3   | Plasmid-Präparation aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....           | 36    |
| 2.5.6.4   | Präparation chromosomaler DNA aus <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ..... | 36    |
| 2.5.7     | Enzymatische Modifikationen von DNA.....                                | 36    |
| 2.5.7.1   | Restriktion von DNA.....  | 36-37 |
| 2.5.7.2   | Dephosphorylieren von DNA.....  | 37    |
| 2.5.7.3   | Phosphorylieren von DNA.....  | 37    |
| 2.5.7.4   | Glätten von 5'-Überhängen.....  | 37    |
| 2.5.7.5   | Ligation.....   | 37    |
| 2.5.7.6   | cDNA-Synthese.....  | 37    |
| 2.5.7.7   | DNA-Sequenzierung.....  | 38    |
| 2.5.8     | Erstellen einer cDNA-Bibliothek aus <i>Spinacia oleracea</i> .....      | 38    |
| 2.5.8.1   | Amplifikation der primären Phagenbank.....                              | 39    |
| 2.5.8.2   | Rastern einer cDNA-Bibliothek nach einer spezifischen cDNA.....         | 39    |
| 2.5.8.2.1 | Radioaktive Sondenmarkierung.....                                       | 40    |
| 2.5.8.2.2 | Homologe Hybridisierung.....  | 40    |
| 2.5.8.2.3 | Einzelklon-Ausschleusung.....   | 40-41 |
| 2.5.9     | Transformation.....   | 41    |
| 2.5.9.1   | Transformation von <i>E. coli</i> .....                                 | 41    |
| 2.5.9.2   | Transformation von Hefezellen.....                                      | 41    |
| 2.5.10    | Polymerasekettenreaktion (PCR).....                                     | 41    |
| 2.5.10.1  | RACE-PCR.....   | 42    |
| 2.6       | Bioinformatische Methoden.....  | 42    |
| 2.6.1     | Phylogenetische Analysen.....   | 42    |

## Ergebnisse

|        |  |       |
|--------|--|-------|
| 3      | Reinigung der ATP-abhängigen Phosphofruktokinase aus <i>Spinacia oleracea</i> .....                                      | 43    |
| 3.1    | Rohextrakt aus <i>Spinacia oleracea</i> .....  | 43    |
| 3.1.1  | Reinigung der ATP-PFK mittels DEAE-Fractogel.....  | 43-44 |
| 3.1.2  | Gelfiltration als chromatographischer Reinigungsschritt der ATP-PFK .....  | 44-45 |
| 3.1.3  | Segregation der Proteine im Saccharose-Gradienten.....   | 45-46 |
| 3.1.4  | Selektive Affinitäts-Chromatographie mit einer „Reactive Red“ Farbstoffsäule.....  | 46-47 |
| 3.1.5  | Mono-Q-Ionenaustauschromatographie .....   | 47-48 |
| 3.1.6  | Präparative Fraktionierung über Hydroxylapatit.....  | 48-49 |
| 3.2    | Dokumentation des Reinigungserfolges mittels SDS-Gel.....  | 50-51 |
| 3.3    | Mikrosequenzierung der ATP-abhängigen Phosphofruktokinase.....   | 51    |
| 3.4    | Identifikation eines Phosphofruktokinase Orthologen .....  | 51-52 |
| 3.5    | Erste Amplifikation und Subklonierung der <i>PFK</i> -spezifischen DNA Sonde.....  | 52-53 |
| 3.6    | Selektion und Isolierung der <i>PFK</i> -Sequenz einer generierten cDNA-Bibliothek aus<br><i>Spinacia oleracea</i> ..... | 53    |
| 3.7    | Vervollständigung des primären <i>PFK</i> -Klons und Abgleich mit den bekannten Peptid-<br>fragmenten.....               | 54-56 |
| 3.8    | Identifikation der zu den Peptiden übereinstimmenden <i>PFK</i> -Sequenz aus <i>Spinacia</i><br><i>oleracea</i> .....    | 56-58 |
| 3.9    | Natives Molekulargewicht der <i>SoPFK1</i> .....   | 59    |
| 3.10   | Biochemische Parameter der Phosphofruktokinase.....  | 60-61 |
| 3.11   | <i>In silico</i> Charakterisierung der beiden Phosphofruktokinasen aus Spinat.....                                       | 61-62 |
| 3.11.1 | <i>In silico</i> Lokalisierung der Phosphofruktokinasen.....   | 63-64 |
| 3.12   | Indirekter, biochemischer Nachweis der <i>SoPFK1</i> Lokalisation.....   | 64-65 |
| 3.13   | Heterologe Expression der <i>SoPFK1</i> in Hefe.....   | 65-66 |
| 3.14   | Klassifizierung der pflanzlichen Phosphofruktokinase.....  | 67-68 |

## Diskussion

|       |  |       |
|-------|--|-------|
| 4.1   | Die Verknüpfung zwischen Protein und Gensequenz .....                            | 69-70 |
| 4.2   | Vorausgehende Arbeiten zur ATP-abhängigen PFK aus <i>Spinacia oleracea</i> ..... | 70    |
| 4.2.1 | Konvertierung der ATP-PFK zur $PP_i$ -PFK und <i>vice versa</i> .....            | 71    |
| 4.3   | Die plastidäre ATP-PFK aus Spinat.....   | 71-72 |
| 4.4   | Alternative Reinigungsmethoden der PFK .....                                     | 72-75 |

## Diskussion

|      |  |       |
|------|--|-------|
| 4.5  | Verlust des cytosolischen Isoenzym während der Reinigung ? .....             | 76-78 |
| 4.6  | Ein etabliertes Reinigungsschema zur Isolierung der ATP-PFK aus Spinat ..... | 78-81 |
| 4.7  | <i>In silico</i> Lokalisierungsstudien.....                                  | 81-84 |
| 4.8  | Heterologe Protein Expression in <i>S. cerevisiae</i> .....                  | 84-85 |
| 4.9  | Der <i>SoPFK2</i> -Klon ist kein Zufallstreffer.....                         | 85-86 |
| 4.10 | Phylogenetische Analysen der PFK-Proteine .....                              | 86-87 |
| 4.11 | Ausblick.....  | 88    |

## Zusammenfassung

|   |                      |    |
|---|----------------------|----|
| 5 | Zusammenfassung..... | 89 |
| 6 | Summary.....         | 90 |

## Literatur

|   |                |        |
|---|----------------|--------|
| 7 | Literatur..... | 91-103 |
|---|----------------|--------|

## Abkürzungen

|   |                  |         |
|---|------------------|---------|
| 8 | Abkürzungen..... | 104-105 |
|---|------------------|---------|

## Anhang

|  |                                |     |
|--|--------------------------------|-----|
|  | Danksagung.....                | 106 |
|  | Eidesstattliche Erklärung..... | 107 |

## Einleitung

### 1 Phosphofruktokinase, ein Schrittmacherenzym der Glykolyse

Ein wichtiges Kontrollenzym der Glykolyse in vielen Pro- und Eukaryoten ist die Phosphofruktokinase (PFK, EC 2.7.1.11). Das Enzym katalysiert die Phosphorylierung der C<sub>1</sub>-Hydroxyl-Gruppe von D-Fruktose-6-phosphat (D-Fru-6-P) und einem Adenosin-Triphosphat (ATP) zu D-Fruktose-1,6-bisphosphat (D-Fru-1,6-P<sub>2</sub>) und Adenosin-Diphosphat (ADP) [1]. Diese Reaktion läuft exergonisch ( $\Delta G_0 = -4,41$  kcal/mol) ab, und trägt entscheidend zur Geschwindigkeit der Glykolyse bei. Das Produkt D-Fru-1,6-P<sub>2</sub> tritt exklusiv in der Glykolyse auf, und wird in keinem anderen Stoffwechselweg verwendet. Abweichungen dieser Reaktion sind zum einen für *Pyrococcus furiosus* und *Thermococcus zilligii* beschrieben. Hier wird anstelle von ATP das Energieäquivalent ADP umgesetzt [2, 3]. Eine weitere Ausnahme der ATP-PFK findet sich in *Desulfurococcus amyloiticus*. Diese PFK katalysiert die zuvor genannte Reaktion bidirektional [4]. Um Geschwindigkeit und Effizienz der Glykolyse in Säugern zu regulieren, wird das Enzym durch spezifische Effektoren beeinflusst. Als Beispiel für die Regulation sei hier die der PFK aus Leberzellen von Säugern aufgeführt [5]. Dieses Enzym zeigt eine allosterische Inhibierung bei hohen ATP Konzentrationen. ATP kann dann durch Bindung an ein hochspezifisches Regulationszentrum die Affinität zu D-Fru-6-P herabsetzen. Die regulatorische Bindestelle entspricht dabei nicht der katalytischen Bindestelle. Einen gegenteiligen Effekt bewirkt das Energieäquivalent AMP. AMP wirkt aktivierend auf das Enzym und kann den inhibitorischen Einfluss von ATP wieder aufheben [6, 7]. Zudem erfolgt eine Regulation über den pH-Wert. Bei niedrigem pH-Wert erfolgt eine Inhibierung durch H<sup>+</sup>-Ionen, wodurch in Säugerzellen eine entstehende alkalische Azidose verhindert wird. Darüber hinaus kann PFK durch Zitrat, ein Zwischenprodukt des Zitratzyklus, inhibiert werden. Zitrat erhöht dabei den inhibitorischen Effekt von ATP und verhindert somit, dass weitere Biosynthesestufen aus der Glykolyse für den Zitratzyklus gebildet werden müssen. Für die PFK aus der Leber existiert neben den Inhibitoren ein 1980 entdeckter Aktivator [8]. Fruktose-2,6-bisphosphat (D-Fru-2,6-P<sub>2</sub>) steigert die Affinität der PFK zu D-Fru-6-P und bewirkt eine Reduktion des Hemmeffekts von ATP (siehe Abschnitt 1.4.5).

Für alle bekannten PFKs wurden bisher tetramere Konformationen beschrieben, mit Ausnahme der PFK aus *Saccharomyces cerevisiae*, welche aus zwei verschiedenen Untereinheiten in heterooktamerer Form zusammengesetzt ist [9].

ATP-PFK kann darüber hinaus postranslational modifiziert werden. Im Schweinespulwurm (*Ascaris suum*) konnte eine Phosphorylierung des Enzyms durch eine zyklische AMP-abhängige Protein-Kinase nachgewiesen werden; resultierend in einer dreifachen Erhöhung der Aktivität und einer geringeren Sensitivität gegenüber einer ATP-Inhibierung [10]. Für Säuger ließ sich bei der PFK aus Kaninchenmuskel ebenfalls eine Phosphorylierung detektieren [11]. Allerdings veränderte sich die Aktivität im Gegensatz zur PFK aus *Ascaris* nicht [12]. In der Bäckerhefe *Saccharomyces cerevisiae* erreichte man eine *in vitro* Phosphorylierung der PFK  $\beta$ -Untereinheit, mit dem Effekt einer erhöhten Stabilität durch einen Proteaseabbau in Verbindung mit einer leicht erhöhten Enzymaktivität [13].

Für *Escherichia coli* wurden bereits 1977 zwei Isoenzyme der ATP-abhängigen PFK ausführlich charakterisiert [14, 15, 16]. Das allosterische Enzym PFK1 reguliert 90 % der spezifischen Phosphorylierung und wird durch ähnliche Mechanismen wie die PFK in Säugerzellen reguliert. PFK2, welche keinerlei Sensitivität gegenüber Phosphoenolpyruvat (PEP) aufweist, katalysiert nur 10 % der gesamten PFK Aktivität in *E. coli*. Bisher sind unterschiedliche physiologische Rollen der PFKs nicht aufgeklärt [17].

1974 wurde erstmalig eine PFK aus der parasitären Amöbe *Entamoeba histolytica* beschrieben [18]. Das Enzym katalysiert ebenso die Phosphorylierung von D-Fru-6-P zu D-Fru-2,6-P<sub>2</sub>; allerdings unter Verwendung von PP<sub>i</sub> an Stelle von ATP. Diese exergonische Reaktion zeigt einen halb so großen Energiegewinn gegenüber der ATP abhängigen Reaktion ( $\Delta G = -2,08$  kcal/mol) [19, 20]. Für die später in den meisten Prokaryoten detektierte Pyrophosphat-Fruktose-6-Phosphat-1-Phosphotransferase (PFP; PP<sub>i</sub>-PFK, EC 2.7.1.90) [21, 22] war bisher keinerlei Regulation durch allosterische Effektoren bekannt. In *Euglena gracilis* [6] hingegen zeigt die PFP eine Regulation ähnlich der der ATP-PFK aus Säugerzellen. Man nimmt an, dass die PFP mit zur Regulation des Pyrophosphat-Angebots in der Zelle benötigt wird, denn PP<sub>i</sub> fällt bei Biosynthesen von Proteinen, Nukleinsäuren und Polysacchariden als Nebenprodukt an. Diesen Überschuss an PP<sub>i</sub> reguliert im Allgemeinen das Enzym Pyrophosphatase [EC 3.6.1.1]. Man findet jedoch in *Euglena gracilis*, *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* und *Trichomonas vaginalis* keinerlei messbare Pyrophosphatase-Aktivität. Diese Organismen verfügen über eine PP<sub>i</sub>-abhängige PFK, welche die von der Pyrophosphatase katalysierte Reaktion übernehmen kann. In *E. coli* wiederum, welches lediglich zwei ATP-PFKs besitzt, ist die Pyrophosphatase ein essentielles Enzym [22]. Da die

PFP reversibel phosphoryliert, kann es auch die Dephosphorylierung von D-Fru-1,6-P<sub>2</sub> zu D-Fru-6-P katalysieren. Diese Reaktion kann auch von der unidirektionalen Fruktose-1,6-bisphosphatase (FbPase) [EC 3.1.3.11] [23] ausgeführt werden, welche ebenfalls die irreversible Reaktion von D-Fru-1,6-P<sub>2</sub> zu D-Fru-6-P katalysiert. In *fbp* defizienten *E. coli*-Mutanten konnte eine Komplementierung dieser Reaktion durch eine PFP aus *Propionibacterium shermanii* erreicht werden [24].

Bakterielle PFPs, sowie PFPs aus Protisten wurden nur in homomerer Konformation gefunden, welche keinerlei Stimulierung durch D-Fru-2,6-P<sub>2</sub> aufweisen (siehe Abschnitt 1.4.5). Ein Sonderfall für eine bisher bekannte PP<sub>i</sub>-PFK wurde in *E. histolytica* beschrieben. Das 48 kDa große Protein (CAA\_57659.1) ließ sich nach 30 minütiger Vorinkubation mit 2 mM ATP in eine aktive ATP-PFK überführen [25]. Eine grundsätzliche Aktivierung der PFP ließ sich *in vitro* für das Enzym aus der Amöbe *Naegleria fowleri* allosterisch durch Zugabe von 0,5 mM AMP aktivieren [26]. Dabei wechselt das Enzym von einer inaktiven monomeren Konformation (45 kDa) in eine aktive tetramere Konformation (180 kDa).

Unterschiedliche physiologische Rollen für PP<sub>i</sub>- und ATP-abhängige PFK konnte von Alves *et al.* für die methylophilen Actinomyceten *Amycolatopsis methanolica* geklärt werden [27]. Die ATP-abhängige PFK ist involviert im Ribulosemonophosphat-Zyklus, in dem Formaldehyd assimiliert wird. ATP-PFK ist nur aktiv bei Wachstum auf C<sub>1</sub>-Quellen. PP<sub>i</sub>-abhängige PFK findet man bei Wachstum auf C<sub>6</sub>-Quellen. Dieses Enzym ist am Stoffwechselweg der Glykolyse beteiligt. Für einige Organismen ist das gleichzeitige Auftreten einer PP<sub>i</sub>-PFK und einer ATP-PFK bekannt. Darunter fallen beispielsweise das thermophile Eubakterium *Thermotoga maritima* sowie der Protist *Entamoeba histolytica* [28, 25]. In Pilzen und Tieren sind bisher nur ATP abhängige Phosphofruktokinasen bekannt.

Höhere Pflanzen besitzen im Cytosol drei Enzyme, welche bei der Konvertierung von D-Fru-6-P zu D-Fru-1,6-P<sub>2</sub> und umgekehrt involviert sind. Neben der unidirektional katalysierenden Fruktosebisphosphatase [EC 3.1.3.11, FbPase] besitzen Pflanzen auch eine ATP-abhängige Phosphofruktokinase [EC 2.7.1.11], welche irreversibel D-Fru-6-P zu D-Fru-1,6-P<sub>2</sub> phosphoryliert. Die bidirektional katalysierende PP<sub>i</sub>-abhängige Phosphofruktokinase [EC 2.7.1.90; PFP; PP<sub>i</sub>-PFK] ist ebenso in der Lage diese Reaktion zu katalysieren. Zusätzlich kann sie die Reaktion der FbPase substituieren. Dieses Enzym zeigt ähnlich zur PFP aus *E. gracilis* regulatorische Eigenschaften durch allosterische Effektoren. Neben den cytosolischen Enzymen gibt es ein Isoenzym der ATP-PFK in den Chloroplasten [30, 31, 32, 33]. Diese PFK ist involviert im Abbau von Stärke zu Triosephosphat [34], während die

cytosolische PFK, genau wie bei Säugerzellen, als Schrittmacherenzym in der Glykolyse katalysiert.

### 1.1 PP<sub>i</sub>-PFK in Pflanzen

Die im pflanzlichen Cytosol lokalisierte PFP besteht aus zwei Untereinheiten. Die  $\alpha$ -Untereinheit hat eine regulatorische Funktion, während die  $\beta$ -Untereinheit über eine katalytische Aktivität verfügt [35]. Neben den bekannten PFP-Nukleotidsequenzen aus *Citrus paradisi* [36] und *Saccharum officinarum* [37], sowie den PFP-Proteinen aus *Horderum vulgare* [38], *Ricinus communis* [39, 40, 41], *Ananas comosus* [42, 43], *Citrullus lanatus* [44, 45, 46] und *Brassica nigra* [47, 48] sollen hier vier PFP-Enzyme und deren Reinigung zusammen mit einigen biochemischen Parametern exemplarisch aufgeführt werden.

Turner und Plaxton gelang es 2003 die PFP aus der Frucht der Banane zu reinigen [49]. Dabei konnte durch chromatographische Trennmethode eine 1158fache Reinigung des Enzyms mit einer abschließenden spezifischen Aktivität von 13,9 U/mg erreicht werden. Immunoblotanalysen deckten auf, dass das Enzym ein 490 kDa Heterooktamer ist, bestehend aus gleichen Anteilen einer 66 ( $\alpha$ ) und einer 60 ( $\beta$ ) kDa großen Untereinheit ( $\alpha_4\beta_4$ ).

In der Kartoffel (*Solanum tuberosum* L.) findet man eine PFP bestehend aus einer 65 kDa und 60 kDa großen Untereinheit [50]. In Abwesenheit von PP<sub>i</sub> zeigt das native Enzym ein Molekulargewicht von 265 kDa, was darauf schließen lässt, dass es sich um ein Heterotetramer handelt. Das Verhältnis der Untereinheitenzusammensetzung entspricht dabei der aus Banane gereinigten PFP. In Anwesenheit von PP<sub>i</sub> dissoziiert das tetramere Enzym in ein Dimer mit einer M<sub>r</sub> von 130 kDa ( $\beta_2$ ). Diese Konformationsänderung geht einher mit einer Reduktion der Aktivität. D-Fru-2,6-P<sub>2</sub> ist in nanomolaren Konzentration in der Lage diese Dissoziation zu verhindern [50]. Auf molekularer Ebene sind bereits zwei vollständige cDNA-Klone, kodierend für die  $\alpha$ - und die  $\beta$ -Untereinheit mit einer Sequenzhomologie von 40 % bekannt [35].

Eine dritte Reinigung erfolgte aus Weizenkeimen von Yan *et al* [51], wobei zwei cytosolische PFP Enzyme gereinigt wurden. PFP1 konnte bis zur Homogenität gereinigt werden (500fach) mit einem nativen Molekulargewicht von 234 kDa. Das Enzym besteht aus gleichen Anteilen zweier Untereinheiten mit einer M<sub>r</sub> von 67 ( $\alpha$ ) und 60 ( $\beta$ ) kDa. Daraus lässt sich eine tetramere Konformation, analog der von Turner *et al.* (2003) postulierten PFP, folgern [49]. PFP2 wurde partiell gereinigt (100fach) mit einem nativen Molekulargewicht von 114 kDa. Für dieses Enzym konnte nur eine Untereinheit von 60 kDa detektiert werden,

welche der  $\beta$ -Untereinheit von PFP1 entspricht. Die kinetischen Eigenschaften der PFP Enzyme sind sehr ähnlich. Beide Enzyme zeigen identische  $K_m$ -Werte für  $PP_i$  ( $K_m= 10 \mu M$ ) und D-Fru-6-P ( $K_m= 4 mM$ ). PFP1 ist gegenüber PFP2 sensitiver in Bezug auf den Aktivator D-Fru-2,6-P<sub>2</sub>. Für PFP1 konnte ein  $K_a$ -Wert von 7 nM ermittelt werden. Der  $K_a$ -Wert für PFP2 liegt bei 26 nM. Daraus ergibt sich eine 50fache Aktivierung der PFP1, bzw eine 5–10fache Aktivierung der PFP2. Aus der spezifischen Untereinheitenzusammensetzung der Enzyme lässt sich folgern, dass die  $\beta$ -Untereinheit die katalytische Funktion besitzt, während die  $\alpha$ -Untereinheit regulatorische Eigenschaften aufweist [51].

Aus Spinat (*Spinacia oleracea*) wurde die PFP ebenfalls bereits isoliert [52]. Nach Ausfällung mit Polyethylenglykol, Chromatographie über Phosphozellulose, DEAE-Sepharose und Phenylsuperose ließen sich zwei äquimolare Untereinheiten des Enzyms von 65 und 60 kDa detektieren. Das gereinigte Enzym wies weder FbPase noch ATP-PFK Aktivität auf und wurde insgesamt 1000fach mit einer finalen spezifischen Aktivität von  $36,3 \mu mol \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  gereinigt [52].

In allen vier exemplarischen PFPs (Banane, Kartoffel, Weizen, Spinat) sind nur geringfügig abweichende Größen der Untereinheiten publiziert. Für die aus Banane und Spinat isolierten PFPs sind bisher noch keine korrespondierenden mRNA-Sequenzen bekannt. PFP scheint in den Pflanzen durch lateralen Gentransfer aus Bakterien aufgenommen worden zu sein. Diese Hypothese wurde bereits für PFP aus *Chlamydia trachomatis* postuliert [29]. Momentan ist noch keine allgemein akzeptierte Erklärung gefunden, warum Pflanzen neben der ATP-PFK eine weitere  $PP_i$ -PFK besitzen.

## 1.2 ATP-abhängige pflanzliche PFKs

ATP-PFK wurde bisher aus vielen Pflanzengattungen charakterisiert und/oder gereinigt [21, 31, 41, 53-59, 79]. Um einen ausreichenden Überblick über die pflanzliche ATP-PFK zu geben, sollen auch hier vier exemplarische PFKs aus Banane, Kartoffel, Karotte und Gurke vorgestellt werden [54, 49, 55, 60].

Mittels chromatographischer Trennmethode konnten aus der Frucht der Banane zwei ATP abhängige PFKs isoliert werden [49]. Dabei wurde die PFK I und die PFK II mit spezifischen Aktivitäten von 6.0 und 5.5  $\mu mol/mg$  gereinigt. Die nativen molekularen Massen ergaben für PFK I 210 und für PFK II 160 kDa. Das pH-Optimum für PFK I liegt bei 8.0, für PFK II bei 7.3. Eine genaue Lokalisation der ATP-PFK Isoenzyme konnte nicht erreicht werden [49].

Aus der Kartoffel (*Solanum tuberosum*) konnten vier gesonderte Formen der PFK isoliert werden, jedoch ebenfalls ohne eindeutige Lokalisation [55]. PFK I-III aggregieren als Tetramer mit einem Molekulargewicht von etwa 200 kDa. PFK IV befindet sich unter nativen Bedingungen in einem hochmolekularen Aggregationszustand von 800 kDa und bildet damit gegenüber den anderen PFKs eine Ausnahme. Diese „Hochkomplexe-Form“ wurde ebenso aus Karotten isoliert, wobei vier separate Untereinheiten der PFKs getrennt wurden [55]. PFK<sub>a</sub>, PFK<sub>b</sub>, PFK<sub>c</sub> und PFK<sub>d</sub> ergaben M<sub>r</sub>-Werte von 46.3, 49.5, 50 und 53.3 kDa. Alle Untereinheiten zeigten nach proteolytischer Restriktion (V8-Protease) ein differentielles Bandenmuster, und konnten somit klar als disjunkt identifiziert werden. PFK<sub>a</sub> und PFK<sub>b</sub> sind Untereinheiten der PFK I und II während PFK<sub>c</sub> und PFK<sub>d</sub> der PFK III und IV zugeordnet werden. Alle PFK-Enzyme sind aus mindestens zwei dieser Untereinheiten aufgebaut, mit Ausnahme von PFK I, welche nur aus PFK<sub>a</sub> Untereinheiten besteht.

Wong *et al.* (1987) gelang es, zwei ATP-abhängige PFK-Enzyme aus der Wurzel der Karotte zu isolieren, die jeweils eine molekulare Masse von >5000 kDa und 400 kDa aufwiesen [54]. Bezüglich ihrer Abundanz, ihrer molekularen Masse, sowie der physiologischen Aktivierung durch ortho-Phosphat (P<sub>i</sub>), wurden die bereits erwähnte „Hochmolekulare Form“ als cytosolisch, und die 400 kDa Form als plastidär deklariert. Das >5000 kDa Enzym katalysiert mit einer spezifischen Aktivität von 79 U/mg und unterliegt einem Metabolit reguliertem Aggregation/Disaggregations-Mechanismus, bei welchem drei unterschiedliche Formen vorzufinden und ineinander überführbar sind. Die isolierte PFK kann in einer großen Form (M<sub>r</sub> > 5 × 10<sup>6</sup> kDa), in einer Zwischenform (M<sub>r</sub> = 6 × 10<sup>5</sup> kDa) und in einer kleinen Form (M<sub>r</sub> = 2.4 × 10<sup>5</sup> kDa) vorliegen. Jede dieser Formen zeigt unterschiedliche Charakteristika abhängig von Metabolit und pH-Wert. Die Konvertierung der großen in die Zwischenform bzw. kleine Form der PFK wird durch ATP initiiert. Aus der kleinen bzw. Zwischenform kann durch Zugabe von D-Fru-6-P die große Form gebildet werden. Optimale pH-Bereiche liegen für die große, Zwischen-, und kleine Form bei 7.0, 5.5 und 8.6. *In vivo* konnten die Formen im Verhältnis 1:2:1 detektiert werden. Bei der Bestimmung der molekularen Zusammensetzung des Enzyms präsentierte sich ein 60 kDa Protein, welches durch Antikörperhybridisierung determiniert wurde. Die unterschiedlichen Formen der PFK ergeben sich durch Aggregation aus dieser Untereinheit.

Auch in *Cucumis sativus* konnte man das plastidäre Enzym vom cytosolischen Pendant trennen. Die cytosolische PFK katalysiert mit einer spezifischen Aktivität von 32 μmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>, während das plastidäre Isoenzym mit 52 μmol mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup> katalysiert [60]. Für beide Enzyme ließen sich je drei Polypeptide identifizieren, welche in äquivalenten

Mengen im nativen Protein aggregieren. Für das cytosolische Isoenzym sind Untereinheiten von 47.2; 42.4 und 40.4 kDa detektiert worden. Das plastidäre Pendant besteht aus 53.3; 41.5 und 39 kDa großen Untereinheiten [60]. Eine entsprechende Gelfiltration lieferte native Molekulargewichte beider Isoenzyme, wobei das plastidäre etwa  $180 \pm 9$  kDa und das cytosolische  $185 \pm 8$  kDa groß ist. Es wird angenommen, dass beide Isoenzyme in tetramerer Aggregation vorkommen [60].

1999 wurden in der Arbeitsgruppe der Botanik III (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) bereits von Frau Dr. A. Ramge zwei EST-Sequenzen von möglichen ATP-PFKs aus einer Reis cDNA-Bibliothek isoliert und sequenziert, die als eindeutige Orthologe der PFK-Sequenzen aus *Trypanosoma brucei* und *Treponema pallida* identifiziert werden konnten. Beide Reisproteine, sowie ein potentieller Spinatklon, wurden jeweils heterolog als GST-Fusionsprotein oder als Calmodulinfusionsprotein in *E. coli* exprimiert. Es ließ sich durch diese Experimente zwar lösliches Protein nachweisen, die Enzymaktivität allerdings nicht. Eine entsprechende Komplementierung der gereinigten *E.coli*-Klone mit Spinat-Extrakten blieb ebenfalls erfolglos (A. Ramge, P. Hohenberger, W. Martin; unveröffentlichte Arbeiten).

### 1.3 Effektoren der pflanzlichen Phosphofruktokinasen

Hohe Konzentrationen an nicht komplexiertem Magnesium ( $Mg^{2+}$ ) haben auf PFKs einen inhibitorischen Einfluss [64, 65]. Ausnahmen mit stimulierendem Effekt wurden für die PFK aus Hefe [66] und menschlichen Erythrocyten [67] gezeigt. Um optimale Aktivitäten der pflanzlichen, cytosolischen ATP-PFK zu gewährleisten, muss für das Enzym eine geringe, freie  $Mg^{2+}$  Konzentration vorliegen [62]. Für die cytosolische ATP-PFK in Spinat konnte gezeigt werden, dass bei sehr niedrigen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen die Aktivierung hoch,  $V_{max}$  jedoch gering ist. Bei hohen  $Mg^{2+}$ -Konzentrationen verhält es sich umgekehrt [53]. Durch Zugabe von EDTA kann freies  $Mg^{2+}$  komplexiert werden, wodurch der inhibitorische Effekt aufgehoben wird.  $P_i$  kann den Effekt von  $Mg^{2+}$  abschwächen. Man geht davon aus, dass freies  $Mg^{2+}$  den Aggregationszustand der cytosolischen ATP-PFK von der aktiven in die weniger aktive Form ändert [64,68,54]. Ist die Konzentration von  $Mg^{2+}$  wiederum gering, so dass freies ATP ( $ATP^{4+}$ ) vorliegt, inhibiert dieses die Aktivität der PFK-Isoenzyme. Dieses Szenario scheint allerdings nur eine Rolle bei *in vitro* Experimenten zu spielen. In der Zelle liegt freies ATP nur in sehr geringen Konzentrationen vor [62]. ATP bindet bei der Phosphorylierung von D-Fru-6-P zu D-Fru-1,6-P<sub>2</sub> primär an das Enzym, wobei eine

Konformationsänderung induziert wird. Diese strukturelle Änderung erhöht die Affinität zu dem sekundär bindenden Substrat D-Fru-6-P. Darüber hinaus kann  $\text{MgATP}^{2-}$  durch  $\text{MgUTP}^{2-}$ ,  $\text{MgITP}^{2-}$ ,  $\text{MgCTP}^{2-}$  und  $\text{MgGTP}^{2-}$ , mit absteigender Effizienz in der angegebenen Reihenfolge, von beiden Isoformen der ATP-PFK substituiert werden [69,49,60,70].

In Anwesenheit von 25 mM  $\text{P}_i$  erhöht sich im pH-Bereich von pH 6.0-8.0 die Aktivität der cytosolischen ATP-PFK aus Spinat um das zwei- bis vierfache. Im Gegensatz dazu verringert sich die spezifische Aktivität der plastidären ATP-PFK um bis zu 50 % [31, 53, 61, 62] Höhere Konzentrationen maximieren bzw. minimieren diesen Effekt nicht. In Endospermen von *Ricinus communis* hingegen zeigt sich eine Aktivierung um 10 % bei pH 7.5 und bei niedrigerem pH-Wert (6.5) eine Inaktivierung von 20 % [30]. Dabei hängt der aktivierende Effekt von der  $\text{MgCl}_2$ -Konzentration sowie der D-Fru-6-P Konzentration ab [53]. Bei niedrigen  $\text{P}_i$ -Konzentrationen ist die Substratsättigung erst bei 25 mM D-Fru-6-P erreicht. Bei höheren  $\text{P}_i$ -Konzentrationen zeigt sich bereits eine Sättigung bei 5 mM D-Fru-6-P. Monovalentes  $\text{P}_i$  verringert außerdem den inhibitorischen Effekt von freiem  $\text{Mg}^{2+}$  und hebt eine Inhibierung durch Phosphoenolpyruvat (PEP) oder 2-Phosphoglycerat (2-PGA) auf [53,69]. Der  $K_a$ -Wert der PFK aus Spinat für D-Fru-2,6- $\text{P}_2$  erhöht sich bei einer Konzentration von 10 mM  $\text{P}_i$  um das 1000fache, wobei der  $V_{\max}$  um 40 % sinkt [52].

Chlorid-Ionen können den aktivierenden Effekt von  $\text{P}_i$  auf cytosolische PFK maskieren. Kalium-Konzentrationen oberhalb von 200 mM heben den Effekt von  $\text{Cl}^-$  als auch  $\text{P}_i$  auf. Monovalente Ammonium-Ionen sind nur in Säugerzellen starke Aktivatoren der PFK [64]. Für die pflanzliche, cytosolische PFK konnte keinerlei Effekt für Ammonium-Ionen und Natrium-Ionen detektiert werden. Kalzium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) hingegen zeigt im Zusammenhang mit der cytosolischen ATP-PFK einen inhibitorischen Effekt. Bisher wurde postuliert, dass die PFK eine Bindestelle für  $\text{Ca}^{2+}$  besitzt. Unter physiologischen Bedingungen tritt dieser Effekt allerdings nicht auf, da die Konzentration an freiem  $\text{Ca}^{2+}$  *in vivo* sehr gering ist [62].

Pyrophosphat, Phosphodonor der PFK, wirkt *in vitro* bei Konzentrationen oberhalb von 1 mM inhibitorisch. Eine komplette Inhibierung der PFK konnte in Weizenkeimen bei einer Konzentration von 5 mM  $\text{PP}_i$  detektiert werden [51].

### 1.3.4 Die Rolle von Fruktose-Derivaten bei der Regulation pflanzlicher PFKs und PFPs

D-Fru-2,6-P<sub>2</sub> ist ein Regulator der pflanzlichen Phosphofruktokinase. Das Zuckerderivat wurde erstmalig 1980 als Aktivator der menschlichen PFK in der Leber beschrieben [71]. In Pflanzen wurde das Molekül ein Jahr später erwähnt [72]. Neben der aktivierenden Funktion zeigt es einen starken inhibitorischen Effekt auf die FbPase [73, 74], einem Schlüsselenzym der Sukrose-Synthese. Synthetisiert wird es durch das Enzym 6-Phosphofrukt-2-Kinase [EC 2.7.1.105, F2KP], welches in der Lage ist, D-Fru-6-P an der C<sub>2</sub>-Position zu phosphorylieren [73, 75, 76]. D-Fru-2,6-P<sub>2</sub> hat dabei unterschiedlichen Einfluss auf pflanzliche Phosphofruktokinasen: Cytosolische-PP<sub>i</sub>-abhängige-PFK wird in dessen Anwesenheit aktiviert, während pflanzliche ATP-abhängige-PFKs nicht sensitiv auf D-Fru-2,6-P<sub>2</sub> reagieren [77]. Diese Tatsache steht im Gegensatz zu den bisherigen Befunden anderer eukaryotischer ATP-PFKs, welche durch D-Fru-2,6-P<sub>2</sub> reguliert werden [78]. In Chloroplasten konnte D-Fru-2,6-P<sub>2</sub> bisher nicht detektiert werden [74]. Es wird vermutet, dass D-Fru-2,6-P<sub>2</sub> an der Bindestelle zwischen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit der PFP bindet [79]. *In vitro* reicht eine nanomolare Konzentration von D-Fru-2,6-P<sub>2</sub> aus, um PFP zu aktivieren (siehe Abschnitt 1.1). Es scheint allerdings problematisch, die physiologischen Eigenschaften von D-Fru-2,6-P<sub>2</sub> in Bezug auf die PFP zu interpretieren, da es deutliche Diskrepanzen zwischen den *in vitro* benötigten Konzentrationen und den *in vivo* vermuteten gibt [73, 52, 39, 81]. Die Affinität der PFP gegenüber D-Fru-2,6-P<sub>2</sub> wird negativ beeinflusst durch organische und inorganische Anionen, Nukleotide und phosphorylierte Zwischenprodukte [52]. Für die pflanzliche PFP aus Banane reicht aber eine *in vitro* Zugabe von 5  $\mu$ M D-Fru-2,6-P<sub>2</sub> zur 24fachen Aktivierung des Enzyms [49]. Kruger *et al.* postulierten 1987 zusätzlich, dass nach 15-minütiger Inkubation mit D-Fru-2,6-P<sub>2</sub> eine Dissoziation der PFP in eine weniger aktive dimere Konformation verhindert werden kann [50]. D-Fru-1,6-P<sub>2</sub> kann den aktivierenden Effekt von D-Fru-2,6-P<sub>2</sub> substituieren [82]. Für die ATP-abhängige, cytosolische PFK aus Spinat wurde gezeigt, dass nach einer 30-minütigen Inkubation mit 20  $\mu$ M D-Fru-2,6-P<sub>2</sub> die Substratspezifität zu PP<sub>i</sub> konvertiert werden kann [83].

D-Fru-6-P limitiert die cytosolische ATP-PFK nur bei geringen P<sub>i</sub>-Konzentrationen und hohen Konzentrationen an freiem Mg<sup>2+</sup> [53]. Eine Substitution von D-Fru-6-P durch D-Glu-6-P, D-Glu-1-P oder D-Fru-1-P ist in der durch PFK katalysierten Reaktion generell nicht möglich [49]. D-Fru-1,6-P<sub>2</sub> ist nicht nur Substrat für das PFP Enzym, sondern auch sein Aktivator [73].

## 1.4 *In silico* Analysen zur Phosphofruktokinase

### 1.4.1 Spezifische Aminosäuren für die PP<sub>i</sub>- und ATP-abhängige Phosphofruktokinase

Durch funktionelle und strukturelle Analysen konnten in den der PFK- sowie PFP-Sequenzen aus verschiedenen Organismen essentielle Aminosäuren für die spezifische Bindung der Phosphordonoren ATP bzw. PP<sub>i</sub> identifiziert werden [84,85]. In *E. coli* konnten zwei spezifische Aminosäure-Motive charakterisiert werden, an welchen sich die Positionierung im Folgenden orientiert. Erstens das Motiv GGDG (Pos. 101-104), welches direkt an der Bindung der Phosphatgruppen des ATPs beteiligt ist, und zweitens das Motiv PGTIDXD (Pos. 123-129). In allen ATP-abhängigen PFK-Enzymen findet man an den Positionen 104 und 124 ein Glycin [84,85]. Glycin trägt als einzige Aminosäure in ihrer Seitenkette ein Wasserstoffatom. Dadurch wird gewährleistet, dass bei der Bindung von ATP keine sterische Hinderung für die  $\alpha$ -Phosphatgruppe (124) und das Adenosingerüst (104) auftritt [85]. Typisch für PP<sub>i</sub>-abhängige Phosphofruktokinasen ist ein Lysinrest an Position 124. Der langkettige Seitenrest des Lysins scheint die Bindung von ATP sterisch zu hindern. Die bei der PFP auftretende Asparaginsäure an Position 104 verursacht eine unmittelbare räumliche Hinderung des ATP-Adenosingerüsts. Beide Aminosäuren sind entscheidend für die Erkennung von PP<sub>i</sub> [84-86]. In *Entamoeba histolytica* [84], *Trypanosoma brucei* [87], *Chlamydia trachomatis* [85], *S. coelicolor* [88] und *Leishmania donovani* [86] konnte darüber hinaus eine atypische Kombination gefunden werden. Hier befindet sich an Position 104 ein Glycin und an Position 124 ein Lysin. Für diese „Mischform“ konnte trotz der vermuteten sterischen Hinderung von Lysin, in den vorher genannten Organismen eine eindeutige Nutzung von ATP nachgewiesen werden [84,85]. Durch gezielte Mutagenese wurde bereits versucht, die Kosubstratspezifität von PP<sub>i</sub> nach ATP zu konvertieren. Durch eine Aminosäure-Mutation von Gly<sub>104</sub> und Gly<sub>124</sub> zu Asp<sub>104</sub> und Lys<sub>124</sub> konnte in *E.coli* kein Wechsel in der Spezifität von ATP nach PP<sub>i</sub> erreicht werden [84]. Dieser Konvertierungsprozess war erstmalig erfolgreich mit zwei generierten *pfk*-Mutanten aus *Entamoeba histolytica* [25]. Für die PP<sub>i</sub>-PFK wurde ein Aminosäureaustausch an Position 175 (entspricht der Position 104 in *E.coli*) von Asp nach Gly generiert. Allein dieser Austausch bewirkt einen Wechsel des Kosubstrates von PP<sub>i</sub> nach ATP mit einer 6-fachen Bevorzugung für ATP, betrachtet im Verhältnis von  $K_{cat}$  zu  $K_m$ . Bei einer Doppelmutante, bei der die beiden entscheidenden Aminosäuren zu Gly mutiert wurden, ließ sich die Präferenz des

Enzyms gegenüber ATP um das 10000-fache steigern. Dieses mutierte Enzym zeigte keinerlei Aktivität mit  $PP_i$  als Phosphordonor. Die Doppelmutante ist im Vergleich zur Einfachmutante unter Verwendung von ATP weniger aktiv [25].

Weitere spezifische Aminosäuren, die bei der Bindung von ATP sowie D-Fru-6-P involviert sind, konnten bisher nur für die kristallisierte ATP-PFK aus *E. coli* nachgewiesen werden [89]. Biochemische Analysen der ATP-PFK in *Trypanosoma brucei* lieferten außerdem Daten über Bindestellen von spezifischen Inhibitoren [87].

#### **1.4.2 Evolution der PFK**

Ein Großteil der in verschiedenen Protein- und Gendatenbanken annotierten homologen PFK-Sequenzen stammen aus Reis (*Oryza sativa*) und Ackerschmalwand (*Arabidopsis thaliana*). Das Genom von *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* cv. Nipponbare wurde im „International Rice Genome Sequencing Project (IRGSP) bereits vollständig sequenziert, und wird aktuell im „Oryza Map Alignment Projekt“ weiter charakterisiert [90-93, The rice Chromosome 10 consortia, 2003]. Mit nur 430 Mb besitzt Reis ein relativ kleines Genom unter den Gräsern. *Arabidopsis thaliana*, dessen Genom ebenfalls bereits vollständig sequenziert wurde, verfügt über 125 Mb [94]. Beide Pflanzen sind Modellorganismen für die Grundlagenforschung der Genetik, Cytologie und Molekularbiologie. Im Vergleich zu bekannten, ähnlichen Proteinen anderer Organismen konnten für das *Arabidopsis*-Genom bisher 69 % der Gene *in silico* klassifiziert werden [95], wovon 9 % biochemisch charakterisiert wurden. Man findet in *Arabidopsis thaliana* viele Genduplikationen, wobei für die elf glykolytischen Enzyme insgesamt 51 Gene identifiziert werden konnten. Als Beispiel lässt sich das Enzym Pyruvat-Kinase [EC 2.7.1.40] aufführen, für welches sieben kodierende Gene und fünf hypothetische Pyruvatkinase-Sequenzen identifiziert wurden. Dieses Enzym wird in der Regel in anderen Organismen von einem Gen kodiert. Die Ursache für die Redundanz vermutet man in mehreren Tandem-, als auch in kompletten Genomduplikationen [95]. Für das Enzym Phosphofruktokinase sind elf Sequenzen annotiert. Dabei sind einige Sequenzen als mögliche  $\alpha$ - bzw.  $\beta$ -Untereinheiten der PFP, andere jedoch nur als mögliche PFK-Enzyme annotiert [96].

Der Befund zweier ATP-abhängigen PFK-Paraloge in Pflanzen lässt sich erstens durch eine Genduplikation des cytosolischen Enzyms [97], oder zweitens durch eine frühe Endosymbiose mit einem Cyanobakterium erklären [98, 99]. Die letztere Erkenntnis wird gestützt durch den Befund, dass 18 % der im Zellkern kodierenden *Arabidopsis thaliana* Gene cyanobakterieller Herkunft sind [100]. Da in den Chloroplasten nur ein Bruchteil der

plastidären Proteine kodiert werden, kann man (a) von einem Verlust von Genen und/oder (b) von einer Migration in den Zellkern ausgehen. Die in das Genom integrierten ORFs haben im Laufe der Evolution die Fähigkeit erhalten, die entsprechenden kodierenden Proteine in andere Kompartimente zu transferieren [100]. Eine Korrelation zwischen Gen und Protein-Lokalisierung ist dabei nicht gegeben. In Chloroplasten findet man keine kodierende Sequenz für eine ATP-abhängige PFK. Die entsprechende *PFK*-Sequenz ist im Zellkern konserviert, und kodiert für ein PFK-Enzym, welches in Chloroplasten mittels eines entsprechenden Transitpeptides translokalisiert wird.

Basierend auf Sequenzvergleichen, sowie Strukturanalysen der beiden PFK-Enzyme aus *Bacillus stearothermophilus* und Kaninchen lässt sich für die Entstehung der eukaryotischen PFK eine Genduplikation aus einer cyoanobakteriellen Vorläufersequenz vermuten [101]. Für die *PFK* in Pilzen konnte sich im Laufe der Evolution eine regulatorische ( $\alpha$ ) als auch eine katalytische Untereinheit ( $\beta$ ) bilden [102]. Bei Säugern vermutet man eine Fusion dieser Sequenzen [101]. Die zwei Untereinheiten der PFP ( $\alpha$ ,  $\beta$ ) zeigen kaum Ähnlichkeit zur prokaryotischen oder eukaryotischen PFK. Die geringe Konservierung der Intronverteilung beider *PFP*-Sequenzen in *Ricinus communis* deutet auf eine unabhängige Entstehung hin, da beide Intronmuster nicht durch Intronverlust bzw. Verdopplung entstanden sein können, und somit *PFP $\alpha$*  nicht aus *PFP $\beta$* , bzw. *PFP $\beta$*  nicht aus *PFP $\alpha$*  hervorging [103]. Es ist auch unwahrscheinlich, dass beide PFP-Untereinheiten aus nur einer *PFK*-Vorläufersequenz hervorgegangen sind, da die  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheit von *Ricinus*-PFP lediglich 40 % Aminosäureidentität aufweisen. *PFK* und *PFP* scheinen vielmehr aus einer Vorläufersequenz zu resultieren, da konservierte Regionen auf Aminosäureebene in regulatorischen oder katalytischen Bereichen auftreten [103]. Aktuelle Analysen konnten aber auch belegen, dass ein einziger Aminosäureaustausch eine Phosphordonor-Spezifitätsänderung von  $PP_i$  nach ATP bewirken kann und *vice versa* (siehe Abschnitt 1.4.1) [84,105].

Eine phylogenetische Klassifizierung der Phosphofruktokinase-Enzyme wurde erstmals von Siebers *et al.* (1998) erstellt [106]. Die Enzyme wurden abhängig von ihrem Phosphat-Donor in drei Klassen unterteilt. In die Gruppe I fallen die ATP-abhängigen PFKs zusammen. Gruppe II besteht aus  $PP_i$ -abhängigen PFKs. Eine dritte Gruppe enthält eine Mischung aus ATP und  $PP_i$ -PFKs, die nicht den ersten beiden Gruppen zugeordnet werden konnten. Eine detailliertere, auf Sequenzanalysen basierende Unterteilung der PFKs wurde später von Müller *et al.* (2001) publiziert [107]. Durch den Befund von einigen atypischen PFKs ergab sich durch eine genauere Untersuchung der in Gruppe II klassifizierten PFKs eine

striktere Gliederung in Gruppe „X“, für ATP-abhängige PFKs, „long“, für lange PFKs, „short“, für kurze PFKs und „P“ für PP<sub>i</sub>-abhängige PFKs.

Es wurde von Chi und Kemp bereits im Jahr 2000 vermutet, dass die Vorläufer-PFK ATP als Kosubstrat verwendete. Dabei stützt man sich auf Mutationsanalysen, in denen eine PP<sub>i</sub>-PFK in eine ATP-PFK konvertiert werden konnte. Es ließ sich daraus ableiten, dass es in der PP<sub>i</sub>-PFK eine latente Bindestelle für ATP gibt, die im Verlauf der Evolution zu einer PP<sub>i</sub> Bindestelle adaptieren konnte [84].

Die später von Baptiste *et al.* (2003) postulierte Phylogenie umfasst einen größeren Datensatz von 152 PFK-Sequenzen, taxonomisch bestehend aus Bakterien und Eukaryoten [105]. In diesem Stammbaum wird die Evolution der PFK anhand der in Abschnitt 1.4.1 angegebenen Aminosäuren analysiert. Diese sehr komplexe Phylogenie stützt die Hypothese vom Verlust kompletter PFK oder PFP Gene, der Duplikation, sowie dem horizontalen Gen-Transfer (HGT) zwischen unterschiedlichen Spezies. Aus den Daten ließ sich folgern, dass lediglich eine Punktmutation (AS Pos. 104) die Spezifität für den Phosphordonor ändern kann (siehe auch Abschnitt 1.4.1).

Auffällig ist dabei, dass bisher nur Austausch von einer ATP-abhängigen, irreversiblen PFK zu einer PP<sub>i</sub>-abhängigen, reversiblen PFK detektiert wurden [105]; mit Ausnahme der ATP-PFK aus *Trypanosoma*, welche aus einer PP<sub>i</sub>-PFK hervorgegangen ist [109]. Eine Aussage über den evolutionären, ursprünglichen Phosphor-donortyp ist aus den Analysen von Baptiste *et al.* (2003) nicht möglich, da anhand von phylogenetischen Analysen eines einzigen Enzyms kein eindeutiger Ursprungsorganismus gefunden werden kann.

Von Nielsen *et al.* wurde eine differenzierte phylogenetische Charakterisierung der Phosphofruktokinase-Proteine aus *Arabidopsis thaliana* erstellt (Abb. 01), [96]. Um eine charakteristische Unterteilung der elf PFK-Enzyme zu erzielen, wurden homologe Sequenzen aus Kartoffel, Hase und *E. coli* in einen Neighbour-joining-Baum mit einbezogen [96]. Die Phosphofruktokinasen aus *Arabidopsis* können in drei spezifische Gruppen unterteilt werden. Neben den zwei Gruppen der PP<sub>i</sub> abhängigen PFK ( $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten) zeigt sich eine große Gruppe von möglichen PFKs, deren genaue Kosubstratspezifität bisher noch nicht geklärt ist. Eventuelle Signalsequenzen, welche für eine Translokalisierung in Chloroplasten verantwortlich sind, konnten für zwei Proteine durch *in silico* Vorhersagen identifiziert werden [110]. Diese publizierten Daten sind bisher allerdings noch nicht durch biochemische Analysen verifiziert worden.



## 1.5 Zielsetzung

Wie aus den Abschnitten 1.1 und 1.2 ersichtlich ist, variiert die Untereinheitensammensetzung der Phosphofruktokinase von Spezies zu Spezies. Während die Struktur, Sequenz und Biochemie der  $PP_i$ -PFK aus Pflanzen weitestgehend charakterisiert wurden [35-52], sind bis auf biochemische Analysen keinerlei Sequenzen für das ATP-abhängige PFK-Enzym in Pflanzen, basierend auf experimentellen Befunden, publiziert. Ziel dieser Arbeit ist es die fehlende Verbindung zwischen isolierter ATP-PFK und der korrespondierenden DNA Sequenz zu erstellen.

Eine klassische biochemische Trennung der PFK-Isoenzyme mittels chromatographischer Techniken erschien als Methode der Wahl. Dabei sollte die ATP-PFK bis zur elektrophoretische Homogenität gereinigt und anschließend mikrosequenziert werden. Basierend auf den Sequenzdaten der zu erhaltenden Peptidfragmente sollt(en) die korrespondierende(n) DNA-Sequenz(en) durch PCR-Techniken generiert werden und weiterführend phylogenetisch untersucht werden. Biochemische Charakteristika sollten indirekt Auskunft über die Lokalisation ermöglichen. Abschließend sollte das gereinigte Enzym heterolog in geeigneten Modellorganismen exprimiert werden und dessen Enzymeigenschaften studiert werden.

## Material und Methoden

### 2.1 Verwendete Materialien

#### 2.1.1 Chemikalien

|                                      |                 |                           |                 |
|--------------------------------------|-----------------|---------------------------|-----------------|
| β-Mercapthoethanol                   | Roth            | Isopropanol               | Merck           |
| Aceton                               | Riedel de Haën  | Kaliumacetat              | J.T.Baker       |
| Acetonitril                          | Merck           | Kaliumchlorid             | Acros Organics  |
| Adenosine 5'-(β,γ-imido)triphosphate | Sigma           | Kaliumhydroxid            | Merck           |
| Agarose                              | Cambrex         | Kaliumphosphat            | Merck           |
| Ammoniumsulfat                       | J.T.Baker       | Kreatinphosphat           | Sigma           |
| Ammoniumbicarbonat                   | Sigma           | Lithiumacetat             | Sigma           |
| Ammoniumperoxidisulfat               | Merck           | Magnesiumacetat           | Riedel de Haën  |
| ATP                                  | Amersham        | Magnesiumchlorid          | Sigma           |
| Bacto™ Agar                          | DIFCO           | Magnesiumsulfat           | Aldrich         |
| Bacto™ Hefe-Extrakt                  | DIFCO           | Maltose                   | Acros Organics  |
| Bacto™ Trypton                       | DIFCO           | Methanol                  | Roth            |
| Bicin                                | Sigma-Aldrich   | Methansäure               | Merck           |
| Bradford-Reagenz                     | BioRad          | MOPS                      | Biomol          |
| Bromphenolblau                       | Roth            | NADH                      | Sigma           |
| BSA                                  | Serva           | Natriumacetat             | Acros Organics  |
| Calciumchlorid                       | Acros Organics  | Natriumascorbat           | Sigma           |
| Chloroform                           | Merck           | Natriumcarbonat           | Riedel de Haën  |
| Coomassie R350                       | Amersham        | Natriumchlorid            | J.T.Baker       |
| Dimethylformamid                     | Riedel de Haën  | Natriumdihydrogenphosphat | Merck           |
| Dinatriumhydrogenphosphat            | Merck           | Natriumhydroxid           | Merck           |
| DEPC                                 | Roth            | Natriumpyrophosphat       | Sigma           |
| dNTPs                                | Amersham        | Natriumthiosulfat         | Fluka           |
| DTT                                  | ICN Biomedicals | Ni-NTA-Agarose            | Qiagen          |
| EDTA                                 | Merck           | PhastGel Blue R-350       | Amersham        |
| Essigsäure                           | Roth            | Ponceau S                 | Merck           |
| Ethanol absolut                      | Riedel de Haën  | Polyethylenglycol 1000    | Roth            |
| Ethidiumbromid                       | Roth            | Polyclar AT               | Serva           |
| Ethylenglycol                        | Fluka           | Polyvinylpyrrolidon       | Roth            |
| Ficoll                               | Serva           | Protease-Inhibitor-Mix    | Serva           |
| Formaldehyd                          | Sigma           | Rotiphorese Gel 30        | Roth            |
| Formamid                             | J.T.Baker       | Saccharose                | J.T.Baker       |
| Fruktose-6-Phosphat                  | Roche           | Salzsäure                 | Riedel de Haën  |
| Fruktose-2,6-bisphosphat             | Sigma           | SDS                       | Roth            |
| Galaktose                            | Acros Organics  | Sephadex™G50              | Amersham        |
| Gelatine                             | Merck           | Silbernitrat              | Roth            |
| Glasperlen (0,40-0,60 mm)            | Sartorius       | Sorbitol                  | Roth            |
| Glukose                              | Roth            | Saccharose                | Roth            |
| Glycin                               | Acros Organics  | TEMED                     | Roth            |
| Glycerin                             | Roth            | Tris                      | Sigma           |
| HEPES                                | Sigma           | Triton X 100              | Roth            |
| Iodoacetat                           | Sigma           | Uracil                    | Sigma           |
| IPTG                                 | Roth            | X-Gal                     | ICN Biomedicals |
|                                      |                 | Xylencyanolblau           | Merck           |

#### 2.1.2 Chromatographiematerialien (inkl. Konzentratoren und Dialyseeinheiten)

|                                 |               |                       |               |
|---------------------------------|---------------|-----------------------|---------------|
| Amicon Ultra centrifugal device | Millipore     | Ni-NTA Spin Columns   | Qiagen        |
| Bio-Gel HAT Hydroxylapatite     | Bio-Rad       | PD-10 Säulen          | GE Healthcare |
| C18 ZipTips                     | Millipore     | Reactive Red 120      | Sigma         |
| DEAE-Sepharose Fast flow        | Pharmacia     | Superdex 200 HR 10/30 | GE Healthcare |
| Dialyseschlauch                 | Roth          | Sephacryl S-400       | Pharmacia     |
| Gel Filtration Massen Standard  | Bio Rad       |                       |               |
| Mono Q HR 5/5                   | GE Healthcare |                       |               |

### 2.1.3 Antibiotika

Ampicillin (Sigma), Tetracyclin (Boehringer Mannheim GmbH), Kanamycin (Sigma)

### 2.1.4 Antikörper

His-Tag<sup>®</sup> monoklonaler Antikörper; Maus monoklonaler Antikörper IgG<sub>1</sub> 5x His (Novagen)

ImmunoPure<sup>®</sup>, Ziege, Anti-Maus IgG, Peroxidase konjugiert (Pierce)

### 2.1.5 Enzyme

#### 2.1.5.1 Restriktionsendonukleasen

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden von den Firmen Roche, Gibco BRL, New England Biolabs und MIB Fermentas bezogen und nach den Herstellerangaben eingesetzt.

#### 2.1.5.2 weitere Enzyme

|                        |           |                   |           |
|------------------------|-----------|-------------------|-----------|
| Aldolase               | Sigma     | T4 DNA-Ligase     | Fermentas |
| Alkalische Phosphatase | Fermentas | Taq-Polymerase    | Eppendorf |
| Kreatin-Kinase         | Roche     | TIM/GDH           | Roche     |
| Klenow-Fragment        | Fermentas | Triple Master Mix | Eppendorf |
| Polynukleotidkinase    | Fermentas | Trypsin           | Promega   |
| Proteinase K           | Roche     | Zymolyase         | Roche     |
| RNase A                | Promega   |                   |           |

### 2.1.6 Geräte

|  |                       |   |                       |
|--|-----------------------|---|-----------------------|
| Autoklav                                       | Fedegari              | Mikrowelle Quick Cookmate                                   | Daewoo                |
| Biofuge Fresco: (R: 3325)                      | Heraeus               | PCR Gerät Primus 25   | PeqLab                |
| Concentrator 5301                              | Eppendorf             | PCR Gerät Primus 96 Plus                                    | MWG                   |
| Destille                                       | Fissons               | pH-Meter  | Schott                |
| Eismaschine                                    | Ziegra                | Pumpe P-1   | Pharmacia             |
| Elektroblot Novablot Multiphor II              | Pharmacia Biotech     | Schüttelinkubator   | GFL                   |
| Eppendorfschüttler                             | Eppendorf             | Sterilbank  | HerLamin Air HLB 2472 |
| Feinwaage BP 61                                | Sartorius             | SW-40 Röhrchen  | Beckmann              |
| Folienschweißgerät                             | Krups Vacupack 2 Plus | GENios microplate reader                                    | Tecan Instruments     |
| FPLC   | Pharmacia             | Transilluminator  | LTF Labortechnik      |
| Gelelektrophoresekammern der Serie Sub-Cell GT | Bio-Rad               | Unichromat 700  | Uniequip              |
| Global IR <sup>2</sup> DNA Sequenzer           | Lic-Cor Biosciences   | UV/VIS Spektrophotometer                                    | Healt-care Biotech    |
| Heizblock                                      | HLC                   | Ultraspec 2000  |                       |
| Elektrophorese-Kammer                          | Hofer                 | Vibrax (VXR)  | Janke & Kunkel        |
| Inkubatoren                                    | Heraeus               | Vortex REAX top   | Heidolph              |
| Magnetrührer IKA                               | Labortechnik          | Waage   | Sartorius             |
| Megafuge 1OR: (Rotor 7075)                     | Heraeus               | Waring Blender  | Waring                |
| Mikroliter Pipette P2, P20, P100, P200, P1000  | Gilson                | Wasserbad   | GFL                   |
|  |                       | Zentrifuge Superspeed RC 5B Plus (Rotor GS3, HB-4, SLA1500) | Sorvall               |
|  |                       | β-γ-Detektor  | EG&G Berthold         |

## 2.1.7 Kits

Tabelle 01: Angaben zu verwendeten Kits

| Anwendung                           | Bezeichnung  | Hersteller          |
|-------------------------------------|--|---------------------|
| poly(A) <sup>+</sup> -RNA-Reinigung | mRNA Purification Kit  | GE-Healthcare       |
| Erststrang-cDNA-Synthese            | RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit                       | Fermentas           |
| Herstellung einer cDNA-Bank         | TimeSaver® cDNA Synthesis Kit                                    | GE-Healthcare       |
|                                     | Lamda ZAP II® Predigested <i>Eco</i> R I/CIAP-Treated Vector Kit | Stratagene          |
| DNA-Reinigung aus Agarosegelen      | QIAquick® Gel Extraction Kit                                     | Qiagen              |
| Klonierung von PCR Produkten        | pGEM®-T Easy Vector Systems                                      | Promega             |
| Sequenzierung                       | DYEnamic Direct Cycle Sequencing Kit                             | GE Healthcare       |
| Plasmid-Maxi-Präparation            | NucleoBond PC 500  | Macherey Nagel      |
|                                     | Plasmid-Midi-Kit   | Qiagen              |
| RACE-PCR                            | 5`RACE System for Rapid Amplification of cDNA Ends, Version 2.0  | Invitrogen          |
| Expression in <i>S. cerevisiae</i>  | Yeast Expression Vectors   | Invitrogen          |
| Ligation                            | Quick ligation Kit   | New England Biolabs |
| Western Blot Detektions System      | BM Chemiluminescence Blotting Substrate                          | Roche               |

## 2.1.8 Marker

| DNA- Marker<br>(bp)  | RNA-Marker<br>(bp)  | Protein Marker<br>(kDa)                              |
|--|---|--|
| Gene Ruler™ DNA Ladder Mix (MBI Fermentas), 0,5 µg pro Agarosegel. | Ribo-RNA™ (MBI Fermentas). 2 µg wurden auf Formaldehydgele aufgetragen. | Protein Ladder™ (MBI Fermentas) pro SDS-Gel 5-10 µl. |

## 2.1.9 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion (Martinsried; Deutschland) synthetisiert.

### 2.1.9.1 Oligonukleotide für PCR

|                       |   |                          |
|-----------------------|---|--------------------------|
| PFK 2 hin             | 5'-ACH ATY GAY AAY GAT ATT-3'                 | T <sub>m</sub> : 44,2 °C |
| PFK 2 her             | 5'-RTA BGT DGG TRC TAT GTA-3'                 | T <sub>m</sub> : 49,1 °C |
| PFK hin <i>Bam</i> HI | 5'-GAG TGG ATC CAT GGA GCC CAA GAT TGT T-3'   | T <sub>m</sub> : 66,6 °C |
| PFK her <i>Sph</i> I  | 5'-ACT CGC ATG CCT ATT AGA CGA GCA CTA ACG-3' | T <sub>m</sub> : 68,1 °C |
| PFK 1 hin             | 5'-GAR ATY TAY TTY GAR CCT-3'                 | T <sub>m</sub> : 48,0 °C |
| PFK 1 her             | 5'-WCC VAR AAC AGC RTT TCC-3'                 | T <sub>m</sub> : 52,9 °C |

|                         |   |                          |
|-------------------------|---|--------------------------|
| PFK 2 hin <i>Bam</i> HI | 5'-GAG TGG ATC CAT GGG AAG GCA TAG TAG-3'     | T <sub>m</sub> : 66,5 °C |
| PFK 2 her <i>Bam</i> HI | 5'-CTC AGG ATC CAA TCA CCT ATA ATA GAA AGT-3' | T <sub>m</sub> : 62,7 °C |
| PFK1 <i>Pac</i> I her   | 5'-GCG TTA ATT TAA CTT TAG CAG CAG TTC-3'     | T <sub>m</sub> : 63,7 °C |
| PFK2 <i>Pac</i> I her   | 5'-GCG TTA ATT TAA ACA ATT CCT GGG TGA-3'     | T <sub>m</sub> : 63,7 °C |
| PFK1 <i>Xho</i> I her   | 5'-GCG CTC GAG CTT TAG CAG CAG TTC-3'         | T <sub>m</sub> : 66.1 °C |
| PFK2 <i>Xho</i> I her   | 5'-GCG CTC GAG ACA ATT CCT GGG TGA-3'         | T <sub>m</sub> : 66.1 °C |
| PFK1-yeast hin          | 5'-GTT CAC TTT AGC ACT ATT TGG G-3'           | T <sub>m</sub> : 56,5 °C |
| PFK1-yeast her          | 5'-GCG CCA TTA TTC CTC AGT TG-3'              | T <sub>m</sub> : 57,3 °C |
| PFK2-yeast hin          | 5'-CGG CTG CAG CAT TGT AAG TAC TAC C-3'       | T <sub>m</sub> : 64,6 °C |
| PFK2-yeast her          | 5'-GGT TTT CTT CGA GGA CGT GCC-3'             | T <sub>m</sub> : 61,8 °C |

### 2.1.9.2 Oligonukleotide für 5'-RACE

|                |                                      |                          |
|----------------|--------------------------------------|--------------------------|
| RACE/PFK       | 5'-GAT CAA GCA ACA GTC AAC ATC TC-3' | T <sub>m</sub> : 58,9 °C |
| RACE2/PFK      | 5'-GTC AAC ATC TCG GCT AGC CA-3'     | T <sub>m</sub> : 59,4 °C |
| RACE PFK1      | 5'-TTC ATA GGT AAT TCA GGG TCA-3'    | T <sub>m</sub> : 54,0 °C |
| RACE PFK1 2ter | 5'-CCA CGG AAG CCA TAT CTA ACA-3'    | T <sub>m</sub> : 57,9 °C |

### 2.1.9.3 Oligonukleotid für 3'-RACE

|              |                                     |                          |
|--------------|-------------------------------------|--------------------------|
| PFK1 3' RACE | 5'-GTT GCT GAA GGT GCA GGA CAA-G-3' | T <sub>m</sub> : 62,1 °C |
|--------------|-------------------------------------|--------------------------|

### 2.1.9.4 Oligonukleotide für die Sequenzierung

|                  |  |                          |
|------------------|--|--------------------------|
| M13 (24) For.    | 5'-IRD700 CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC-3' | T <sub>m</sub> : 67,8 °C |
| M13 (24) Rev.    | 5'-IRD800 AGC GGA TAA CAA TTT CAC ACA GGA-3' | T <sub>m</sub> : 59,3 °C |
| Seq PFK Test hin | 5'-CTA GAT TTA GAG ACT AGT TTA-3'            | T <sub>m</sub> : 52,8 °C |
| Seq PFK Test her | 5'-CTC TCT GAT CAC AGT GAA AAG-3'            | T <sub>m</sub> : 58,4 °C |

### 2.1.10 Vektoren

**Tabelle 02:** Expressions- und Klonierungsvektoren

| Bezeichnung               | Hersteller  | Größe (bp) | Resistenzen      | Tag     | Besonderheiten   |
|---------------------------|---|------------|------------------|---------|--|
| pBluescript II SK (+)     | Stratagene  | 3000       | Amp <sup>R</sup> | ohne    | -Blau/Weiß Selektion<br>-26 singuläre Restriktions-schnittstellen  |
| pGEM <sup>®</sup> -T Easy | Promega   | 3015       | Amp <sup>R</sup> | ohne    | - zur direkten Klonierung von PCR Produkten<br>- Blau/ Weiß Selektion<br>-15 singuläre Restriktions-schnittstellen |
| pJH70                     | von Prof. Dr. Heinisch (Universität Osnabrück) zur Verfügung gestellt | 8703       | Amp <sup>R</sup> | ohne    | - URA3 Marker<br>- Niedrigkopienzahl<br>- Hefe-PFK2-Promotor   |
| pJH71                     | von Prof. Dr. Heinisch (Universität Osnabrück) zur Verfügung gestellt | 6464       | Amp <sup>R</sup> | ohne    | - URA3 Marker<br>- Hochkopienzahl<br>- Hefe-PFK2-Promotor  |
| pYES2/CT                  | Invitrogen  | 5963       | Amp <sup>R</sup> | 6 x His | - Gal1-Promotor<br>- URA3 Marker<br>- C-terminaler His-Tag<br>- shuttle Vektor                                     |

### 2.1.11 Medien

Alle Lösungen wurden mit destilliertem Wasser angesetzt und über Dampfdruck-Sterilisation autoklaviert. Nicht temperaturbeständige Lösungen wurden sterilfiltriert. Bakterien wurden auf Vollmedium (1 % NaCl (w/v), 1 % Trypton (w/v), 0,5 % Hefeextrakt (w/v) *ad* pH 7.0) bei 37 °C kultiviert. Bei gewünschter Selektion wurde Ampicillin in einer Endkonzentration von 500 µg/ml nach der Sterilisation hinzugegeben. Für Agarplatten wurde dem Medium 2 % Agar (w/v) hinzugefügt. AIX-Platten enthielten zusätzlich 100 mg/l Ampicillin, 0,1 mM X-Gal (Stammlösung: 0,1 M in DMF) und 0,2 mM IPTG (Stammlösung: 0,2 M in H<sub>2</sub>O). TOP-Agar zu Phagenvermehrung bestand aus 0,7 % Agarose und 10 mM MgSO<sub>4</sub>.

**Tabelle 03:** Medien zur Kultivierung von *Saccharomyces cerevisiae* wurden wie folgt hergestellt:

| YEPGE-Medium:    | YEPD-Medium:     | YNB Uracil:   |
|------------------|------------------|---|
| 1 % Hefeextrakt  | 1 % Hefeextrakt  | 0,67 % YNB w/o AS + NH <sub>3</sub> SO <sub>4</sub> |
| 2 % Bacto-Pepton | 2 % Bacto-Pepton | 0,192 % AS-Mix Ura <sup>-</sup>                     |
| 1 % Glycerin     | 2 % Glukose      | 1 % Glycerin und 3 % Ethanol oder 2 % Glukose       |
| 3 % Ethanol      |                  |   |

## 2.2 Verwendete Kulturen

**Tabelle 04:** verwendete Kulturen und Stämme aus verschiedenen Organismen

| Bezeichnung                            | Hersteller  | Organismus               | Besonderheiten   |
|--|---|--------------------------|--|
| XL1-Blue MRF <sup>+</sup>              | Stratagene  | <i>E. coli</i>           | $\Delta(mcrA) 183 \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr) 173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F^+ proAB lacI^q \Delta M15 Tn10 (Tet^r)]$   |
| SOLR <sup>TM</sup> strain <sup>a</sup> | Stratagene  | <i>E. coli</i>           | $e14^-(McrA^-) \Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 sbcC recB recJ uvrC umuC::Tn5 (Kan^r) lac gyrA96 relA1 thi-1 endA1 \lambda^R [F^+ proAB lacI^q \Delta M15] Su^- (nonsuppressing)$ |
| AST9-1B                                | von Prof. Dr. Heinisch (Universität Osnabrück) zur Verfügung gestellt | <i>S. cerevisiae</i>     | <i>MATa pfk1::LEU2 pfk2::TRP1 ura3-52 his3-11, 15 leu2-3, 112 trp1::loxP MAL2-8c SUC 2 GAL</i>   |
| INVSc1                                 | Invitrogen  | <i>S. cerevisiae</i>     | <i>Mata his3-<math>\Delta</math>1 leu2 trp1-289 ura 3-52</i>   |
| -                                      | -   | <i>Spinacia oleracea</i> | Ökotyp „Polka“   |

### 2.3.0 Kultivierung und Fraktionierung

#### 2.3.1 Haltung von *Escherichia coli*

*E. coli* XL1-Blue MRF<sup>+</sup> bzw. SOLR Zellen einer Glycerin-Dauerkultur wurden mit Hilfe einer Impföse auf eine LB-Agarplatte mit dem entsprechenden Antibiotikum (SOLR: Kanamycin 50 mg/l; XL1-Blue MRF<sup>+</sup> Tetracyclin 12,5 mg/l) ausgestrichen. Die Platte wurde über Nacht bei 37 °C inkubiert, dann mit Parafilm verschlossen und bei 4 °C aufbewahrt. Das entsprechende Volumen LB-Medium wurde mit einer einzelnen *E. coli*-Kolonie angeimpft. Die Kultur wurde über Nacht bei 37 °C und 200 Upm auf dem Schüttelinkubator angezogen.

#### 2.3.2 Haltung von *Saccharomyces cerevisiae*

Die Anzucht des Hefestammes AST9-1B erfolgte bei 30 °C und 200 Upm in YEPGE-Medium für 2–3 Tage. Transformanden wurden in YNB U-Medium angezogen. Der Hefestamm AST9-1B wurde auf YEPGE-Agarplatten bei 4 °C gelagert und monatlich auf frische Agarplatten ausgestrichen.

#### 2.3.3 Kultivierung von Spinat

Als Modellorganismus zur Untersuchung der Phosphofruktokinase aus höheren Pflanzen wurde Spinat (*Spinacia oleracea*, cv. Polka) gewählt. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf bei 20 °C und einem 12 h/12 h Licht/ Dunkel-Rhythmus bei einer Photonenflussdichte von ca. 300  $\mu\text{mol Photonen m}^{-2} \text{s}^{-1}$  kultiviert.

### 2.3.4 Bestimmung der optischen Dichte einer Bakterien- oder Hefesuspension

Die Zellzahl von Bakterien- oder Hefekultur ergab sich aus der Adsorption  $\text{OD}_{600}$  der Suspension im Vergleich zur Leerprobe, welche nur aus reinem Medium bestand. Dabei entspricht 1  $\text{OD}_{600}$  einer Zellzahl von ca.  $8 \times 10^8$  *E.coli*-Zellen bzw.  $3 \times 10^7$  Hefe-Zellen pro ml Suspension.

### 2.3.5 Isolierung intakter Chloroplasten aus Spinat

Die Isolierung intakter Chloroplasten erfolgte nach dem Protokoll von Bartlett *et al.* [104]. Alle Arbeitsschritte wurden bei 4° C durchgeführt. Soweit möglich, wurden vorgekühlte Geräte und Materialien verwendet.

200 g frisch geerntete Spinatblätter wurden von der Mittelrippe befreit, gewaschen und in 200 ml Homogenisierungspuffer (330 mM Sorbit; 2 mM EDTA; 5 mM Ascorbinsäure; 20 mM NaCl; 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1 mM  $\text{MnCl}_2$ ; 0,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 5 mM MES; KOH *ad* pH 6.1) aufgenommen. Die Suspension wurde zweimal 3 Sekunden im Waring-Blender (siehe Abschnitt 2.1.6) homogenisiert und anschließend durch 1 x Microcloth und 1 x 20  $\mu\text{m}$  Nylonnetz filtriert. Es folgte eine Sedimentation im GS3-Rotor für 1 min bei 1500 g. Der Überstand wurde verworfen, und das viskose Pellet auf einen kontinuierlichen 30 ml Percollgradienten, bestehend aus 15 ml Percoll-Medium (3 g Sorbit; 45 ml Percoll *ad* pH 7.9) und 15 ml Medium A (330 mM Sorbit; 2 mM EDTA, 5 mM Ascorbinsäure; 20 mM NaCl; 1 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 1 mM  $\text{MnCl}_2$ ; 2 mM  $\text{NaNO}_3$ ; 50 mM HEPES; KOH *ad* pH 7.6), aufgeschichtet. Der Gradient wurde für 20 min bei 3300 g im SLA-1500 Rotor zentrifugiert. Die untere der zwei erhaltenen Banden enthielt intakte Chloroplasten, die vorsichtig abgenommen und weiterführend in 2 Vol. Medium A resuspendiert wurden. Eine abschließende Zentrifugation erfolgte für 5 Minuten bei 3500 Upm im HB-4 Rotor. Das Pellet wurde erneut in 10 ml Medium A gewaschen und für 10 Minuten bei 3500 Upm im HB-4 Rotor zentrifugiert. Zur vollständigen Lyse wurden die Chloroplasten in 1 ml Lysispuffer (5 mM  $\text{MgCl}_2$ ; 2 mM DTT; 1 mM EDTA; 50 mM Tris-HCl *ad* pH 7.6) resuspendiert und für 10 min auf Eis unter zwischenzeitlichem Vortexen inkubiert. Die lysierten Chloroplasten wurden für 15 min bei 13.000 Upm in der Biofuge Fresco zentrifugiert. Der von Membranbestandteilen befreite Überstand wurde abgenommen und weiter verwendet oder bei -80° C eingefroren.

## **2.4 Methoden im Umgang mit Proteinen**

### **2.4.1 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford**

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration wurde nach der Methode von Bradford *et al.* verfahren [108]. Die Proteinproben wurden in geeigneten Volumina (0,1–10 µl) mit 200 µl Bradford-Reagenz (Protein Assay Dye Reagent, Biorad; München) versetzt und bis zu einem Gesamtvolumen von 1 ml mit H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> aufgefüllt. Nach 10 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 595 nm in einem Pharmacia Biotech Ultraspec 2000 UV/Visible Spektrophotometer gemessen. Der Proteingehalt ließ sich anhand einer Standard-BSA-Verdünnungsreihe mit bekannten Konzentrationen von 2–12 mg/ml ermitteln. Zur Automatisierung wurde das Programmpaket „Swift“ der Firma Biochrom Ltd., UK verwendet.

### **2.4.2 Konzentrieren und Umpuffern von Proteinproben**

Zum Umpuffern von Proteinproben wurden PD-10-Säulen (siehe Abschnitt 2.1.2) verwendet. Es wurde nach Herstellerangaben verfahren. Als Konzentratoren dienten Amicon Filter-Säulen (siehe Abschnitt 2.1.2) in Größen von maximal 15 oder 4 ml. Die Konzentratoren hatten ein Ausschlussvolumen von 10.000 Da. Zur Konzentration wurde die Proteinprobe bei 4 °C und max. 5000 g bis zum gewünschten Volumen zentrifugiert. Größere Volumina wurden mit Dialyseschläuchen (siehe Abschnitt 2.1.2) über Nacht gegen 5 l entsprechenden Puffer dialysiert. Am nächsten Morgen wurde erneut gegen 2 l Puffer für 2 Stunden dialysiert.

#### **2.4.2.1 Aceton-Fällung von Proteinen**

Für SDS-Gele vorgesehene Proteinproben (siehe Abschnitt 2.4.7) wurden zuvor durch Fällung mit Aceton auf geeignete Volumina gebracht. Die Probe(n) wurde(n) mit drei Volumen eiskaltem Aceton versetzt, gemischt und für mindestens zwei Stunden bei -20 °C inkubiert. Eine 15 minütige Zentrifugation bei RT sedimentierte das Protein, welches abschließend in geeignetem Volumen Wasser und 5 x Probenpuffer (siehe Abschnitt 2.4.7) [111] aufgenommen wurde.

## **2.4.3 Chromatographische Methoden**

Zur Proteinreinigung wurde das Verfahren der Flüssigkeits-Säulenchromatographie angewandt. Die Arbeiten an der FPLC (siehe Abschnitt 2.1.6) sowie an Säulenmaterialien wurden entweder im Kühlraum oder in einem dafür vorgesehenen Kühltank (siehe Abschnitt 2.1.6) bei 4 °C durchgeführt. Jede der aufgeführten Säulen wurde entweder nach Herstellerangaben gepackt, oder als Fertigsäule verwendet. Vor dem Beladen von Chromatographiesäulen wurde die jeweilige Probe kurz abzentrifugiert, um Verstopfungen der Materialien durch eventuell ausgefallene Proteine zu vermeiden. Sämtliche an der FPLC benutzten Puffer wurden in druckbeständige Flaschen filtriert und entgast. Affinitätschromatographie wurde ebenfalls bei 4 °C durchgeführt. Die unterschiedlichen Säulenmatrices und Vorgehensweisen sind im folgenden Abschnitt aufgeführt.

### **2.4.3.1 Chromatographie über DEAE-Sepharose Fast Flow**

Eine 3 x 16 cm DEAE-Sepharose Fast Flow Säule wurde mit zweifachem Säulenvolumen des Puffers A (50 mM Tris, 2 mM DTT, 5 mM MgOAc, 1 mM ATP, 10 % Glycerin (v/v), 1 mM Iodoacetat pH 7,8) equilibriert. Der Proteinrohextrakt aus Abschnitt 2.4.10.1 wurde 5 min bei 31.000 g zentrifugiert und mit einer Peristaltikpumpe manuell auf die Säule geladen. Die präparierte Säule wurde in die FPLC eingebunden und mit 86 ml Puffer A gewaschen. Von 86–286 ml wurde ein kontinuierlicher Gradient von 0–900 mM KCl durch Puffer B (50 mM Tris, 2 mM DTT, 5 mM MgOAc, 1 mM ATP, 10 % Glycerin (v/v), 1 mM Iodoacetat, 1 M KCl pH 7,8) erstellt. Die Proteinprobe wurde in Fraktionen von 2 ml bei einer Flussrate von 2,5 ml/min ab 106 bis 286 ml eluiert. Abschließend wurde die Säule mit doppeltem Volumen Puffer B regeneriert. Die Proben wurden im „GENois-Photometer“ auf ATP-PFK-Aktivität überprüft (siehe Abschnitt 2.4.5). Aktive Fraktionen wurden auf ihren Proteingehalt überprüft (siehe Abschnitt 2.4.1), vereinigt und konzentriert (siehe Abschnitt 2.4.2).

### **2.4.3.2 Chromatographie über Gelfiltration**

#### **2.4.3.2.1 Sephacryl S-400**

Eine 3 x 60 cm große Sephacryl S-400 Säule (siehe Abschnitt 2.1.2) wurde mit einer Peristaltikpumpe (siehe Abschnitt 2.1.6) mit zwei Säulenvolumen Puffer C1 (50 mM Tris, 2 mM DTT, 5 mM MgOAc, 1 mM Iodoacetat, 1 mM Adenosin 5'-( $\beta,\gamma$ -imido) Triphosphat Tetralithium Salz Hydrat, 10 % Glycerin (v/v), 150 mM NaCl, pH 7,8) equilibriert. Die Säule

wurde mit dem aus 2.4.3.1 gewonnenen Proteinhomogenat beladen und bei einer Fließgeschwindigkeit von 1 ml/min in 1184 ml Puffer C zu Fraktionen von 2 % Säulenbettvolumen eluiert. Die Fraktionen wurden auf PFK Aktivität in einem „Tecan-Photometer“ (siehe Abschnitt 2.1.6) gemessen und vereinigt. Über Amicon Ultra Centrifugal Filter Devices wurde die Probe auf ein Volumen von 5 ml durch Zentrifugation konzentriert (siehe Abschnitt 2.4.2) und dann über 2 PD-10 Säulen (siehe Abschnitt 2.4.2) gegen Puffer D (20 mM Tris, 2 mM DTT, 5 mM MgOAc, 1 mM ATP, 10 % Glycerin (v/v), 5 % Saccharose (w/v) pH 7,8) dialysiert und abschließend mit 1 x Protease Inhibitor Mix (siehe Abschnitt 2.1.1) versetzt.

### **2.4.3.2.2 Superdex 200 HR 10/30**

Eine mit 2 Säulenbettvolumen Puffer C2 (150 mM NaCl, 20 mM Tris pH 7.8, 1 mM ATP, 2 mM DTT, 5 mM MgOAc and 20 % Glycerin (v/v)) equilibrierte Superdex 200 Gelfiltrations-Fertigsäule wurde mit der Probe aus 2.4.3.3 beladen und in einem Lauf von 40 ml zu Fraktionen zu 0,5 ml eluiert. Die Fließgeschwindigkeit betrug 0,5 ml/min. Die Fraktionen wurden auf PFK-Aktivität in einem „GENois-Photometer“ gemessen und in einem Chromatogramm dokumentiert. Zur Größenbestimmung wurde ein Gelfiltrationsstandard nach Herstellerangaben benutzt (siehe Abschnitt 2.1.2) und unter denselben Bedingungen chromatographisch aufgetrennt. Anhand der sichtbaren spezifischen Proteinpeaks, denen definierte Größen zugeordnet werden konnten, ließen sich Aussagen über die Größe des nativen, eluierten Proteins erstellen.

### **2.4.3.3 Reactive Red-Affinitätschromatographie**

Das aus 2.4.4 gewonnene Dialysat wurde über eine 0,7 x 9 cm große „Reactive Red“ Textil-Farbstoffsäule gereinigt [112, 113]. Die Säule wurde mit Hilfe der FPLC-Apparatur mit zwei Säulenvolumina Puffer A (siehe Abschnitt 2.4.3.1) equilibriert. Die Säule wurde zunächst mit 10 ml Puffer A gewaschen und anschließend in einem Gradienten von 0–1M KCl (Puffer B, siehe Abschnitt 2.4.3.1) über 30 ml fraktioniert. Regeneriert wurde mit 10 ml Puffer B. Die Flussrate lag konstant bei 0,5 ml/min. Es wurden Fraktionen zu je 0,5 ml gesammelt und im Tecan-Photometer auf ATP-PFK Aktivität hin gemessen (siehe Abschnitt 2.4.5). Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und über Amicon Ultra Filter in Puffer E (20 mM Tris, 5 mM MgOAc, 2 mM DTT, 10% Glycerin (v/v), pH 7,8) umgepuffert und zugleich auf ein Volumen von 2 ml konzentriert (siehe Abschnitt 2.4.2).

#### **2.4.3.4 MonoQ-Anionenaustauschromatographie**

Eine in 2.1.2 aufgeführte MonoQ Säule (Gesamtvolumen 1 ml) wurde an der FPLC mit 4 Säulenbettvolumen Puffer E (siehe Abschnitt 2.4.3.3) und einer Fließgeschwindigkeit von 0,3 ml/min equilibriert. Die Proteinprobe aus 2.4.3.3 wurde in gleicher Fließgeschwindigkeit vollständig auf die Matrix geladen und mit 5 ml Puffer E gewaschen. Aufgeteilt auf insgesamt 30 ml wurde unter Zunahme von Puffer F (20 mM Tris, 5 mM MgOAc, 2 mM DTT, 10 % Glycerin (v/v), 1 M KCL, pH 7,8) in einem kontinuierlichen Gradienten von 0–400 mM KCl eluiert. Abschließend wurde mit 2–4 ml 100 % Puffer F die Säule regeneriert. Es wurden Fraktionen zu je 0,37 ml gesammelt und in einem „Tecan-Photometer“ auf ATP-PFK überprüft (siehe Abschnitt 2.4.5). Aktive Fraktionen wurden vereinigt und über Amicon Ultra Filter gegen Puffer G (20 mM Tris, 5 mM MgOAc, 2 mM DTT, 10 mM KPO<sub>4</sub>, pH 7,2) gepuffert und gleichzeitig konzentriert.

#### **2.4.3.5 Chromatographie über Hydroxylapatit**

Eine 1 ml Bio-Gel HAT Hydroxylapatit-Fertigsäule (siehe Abschnitt 2.1.2) wurde mit 2–5 ml Puffer G equilibriert. Die in 2.4.3.4 gereinigte Probe wurde mit 0,5 ml/min auf die Matrix geladen. Die Säule wurde mit 12 ml Puffer G gewaschen, und in einem durch Puffer H (20 mM Tris, 5 mM MgOAc, 2 mM DTT, 500 mM KPO<sub>4</sub>, pH 7,2) erstellten Gradienten von 10–500 mM KPO<sub>4</sub> in insgesamt 10 ml eluiert. Regeneriert wurde mit 4 ml 100 % Puffer H. Es wurden Fraktionen im Volumen von je 0,3 ml gesammelt. Die Fließgeschwindigkeit wurde während des gesamten Laufes konstant beibehalten. Die ATP-PFK-Aktivität aller Fraktionen wurde gemessen und aktive Fraktionen vereinigt. Zur genaueren Identifizierung wurde ein Teil der Probe zur Dokumentation der Reinigung auf einem 12% SDS-Gel überprüft (siehe Abschnitt 2.4.6). Der andere Teil der Probe wurde für enzymatische Analysen eingesetzt (siehe Abschnitt 2.4.5).

#### **2.4.3.6 Affinitätschromatographie**

##### **2.4.3.6.1 IMAC (engl. Immobilized metal affinity chromatography)**

Zur spezifischen Reinigung von chimären Proteinen mit C-terminalen His-Tag wurde die Affinitätschromatographie mittels Ni-NTA-Agarose gewählt [114]. Der Proteinrohextrakt aus (2.4.10.2) wurde im Verhältnis 10:1 mit in (20 mM HEPES/NaOH pH 8,0; 350 mM NaCl; 10 % Glycerin (v/v); 0,2 % Tween 20 (v/v)) equilibrierter Ni-NTA-Agarose gemischt und für

eine Stunde im „Batch-Verfahren“ auf einem Taumelschüttler inkubiert. Das Homogenat wurde für 1 min bei 15000 Upm zentrifugiert. Die Ni-NTA-Matrix wurde einmal mit 600 µl Zellpuffer (20 mM HEPES/ NaOH pH 8; 350 mM NaCl; 10 % Glycerin (v/v); 0,2 % Tween 20 (v/v); 2 mM 2-Mercaptoethanol; 5 mM Imidazol), einmal mit 600 µl Waschpuffer (20 mM HEPES/ NaOH pH 8; 200 mM NaCl; 10% Glycerin (v/v); 5 mM Imidazol) und zweimal mit 150 µl Waschpuffer nacheinander gewaschen. Die Elution erfolgte mit 100 ml Elutionspuffer (20 mM HEPES/ NaOH pH 8; 100 mM NaCl; 20% Glycerin (v/v); 300 mM Imidazol; 5 mM MgCl<sub>2</sub>).

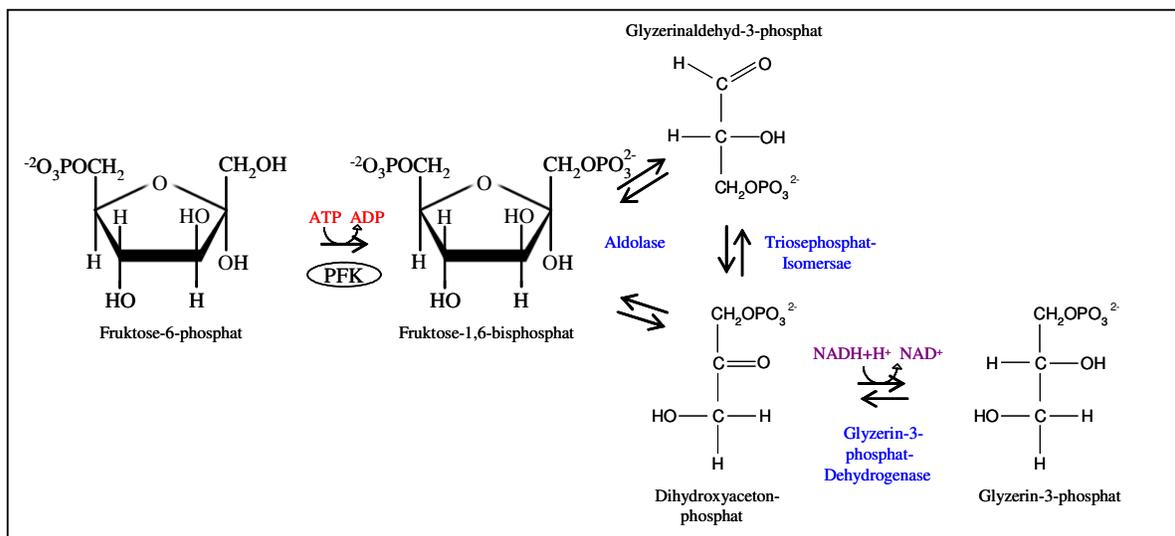
### **2.4.4 Proteinreinigung über einen Saccharosegradienten**

Das aus 2.4.3.2 gewonnene Proteinhomogenat wurde über einen kontinuierlichen, 5-20 %tigen Saccharose-Dichtegradienten aufgetrennt. Der Saccharosegradient wurde zuvor im Gradientenmischer aus je 5,5 ml Puffer D1 (20% Saccharose, 20 mM Tris HCl pH 7,8, 2 mM DTT 5 mM MgOAc, 1 mM ATP, 10% Glycerin (v/v)) und Puffer D2 (5% Saccharose (20 mM Tris HCl pH 7,8, 2 mM DTT 5 mM MgOAc, 1 mM ATP, 10% Glycerin (v/v)) zu einem Gesamtvolumen von 11 ml in SW-40 Röhrchen (siehe Abschnitt 2.1.6) erstellt. Insgesamt sechs Gradienten wurden mit je 1 ml Proteinhomogenat überschichtet und bei 4 °C für 19,5 Std bei 38.000 Upm im Ausschwingrotor SW 40 Ti (Beckman) ultrazentrifugiert. Die Gradienten wurden danach in 500 µl Fraktionen selektioniert und auf ATP abhängige PFK im Tecan-Photometer gemessen (siehe Abschnitt 2.4.5). Die aktiven Fraktionen wurden vereinigt und über Amicon Ultra Filter auf ein Volumen von 2,5 ml konzentriert (siehe Abschnitt 2.4.2). Mit PD-10 Säulen wurde die Probe gegen Puffer A (siehe Abschnitt 2.4.3.1 und 2.4.2) dialysiert.

### **2.4.5 Enzymmessungen und Kinetiken zur Phosphofruktokinase**

Die ATP-PFK-Aktivität wurde in einem kontinuierlichen, gekoppelten Enzymtest im Gesamtvolumen von 200 µl (50 mM HEPES-NaOH pH 7,8; 0,5 mM MgCl<sub>2</sub>; 0,15 mM NADH; 0,6 mM ATP; 2 mM DTT; 10 U *Triose-Phosphat Isomerase* (EC 5.3.11); 1 U *Glycerin-3-Phosphat Dehydrogenase* (EC 1.1.1.8); 0,1 U *Aldolase* (EC 4.1.2.13)) gemessen. Es wurden 1–50 µl Protein-Fraktion eingesetzt [19]. Die Reaktion wurde gestartet durch Zugabe des Substrates Fruktose-6-Phosphat (0,4 mM). Die Oxidation von NADH wurde bei 340 nm über einen Zeitraum von 10 min bei 30 °C im Tecan-Photometer detektiert (siehe Abschnitt 2.1.6). Die Auswertung erfolgte mit der Software Magellan (Magellan-2, Tecan, UK). Zur

Unterscheidung zwischen cytosolisch oder plastidär lokalisierter PFK-Isoform wurden entsprechend 25 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  zur Messung hinzugegeben [31, 53, 61-62]. Für die Messung der  $\text{PP}_i$ -PFK wurde anstatt ATP  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  im gleichen molaren Verhältnis wie ATP zugegeben. Dieser Messansatz wurde zusätzlich mit 10  $\mu\text{M}$  D-Fruktose-2,6-bisphosphat ergänzt, um die  $\text{PP}_i$ -PFK zu aktivieren [77]. Die Messbedingungen und der Verlauf entsprachen der ATP Messung. Zur  $K_m$ -Wert Bestimmung von ATP wurden angereicherte Ansätze mit 3 U Kreatin Kinase (E.C. 2.7.2.3) sowie 1 mM Kreatinphosphat versetzt [115]. Diese Ergänzung garantierte eine Regeneration des ATP-Spiegels während der Messung.  $K_m$ -Werte wurden mit Hilfe von Hanes-Woolf-Plots [142] berechnet.



**Abb 03:** Reaktionsablauf im Enzymassay (2.4.5) Energie- bzw. Reduktionsäquivalente, sowie Hilfsenzyme sind farblich markiert.

## 2.4.6 Massenspektroskopische Analysen von Proteinen

### 2.4.6.1 Tryptische Spaltung von Proteinen in SDS-Gelen

Es wurde nach einem durch Dr. M. Piotrowski (Ruhr-Universität-Bochum) modifizierten Protokoll von Jensen *et al.* (1998) verfahren [116].

Aus Coomassie-angefärbten SDS-Gelen (siehe Abschnitt 2.4.8.1) wurden Proteinbanden herausgeschnitten, und für die massenspektroskopische Untersuchung wie folgt präpariert: Die Gelstücke wurden zunächst gewaschen und dazu zweimal für 15 min in einem Schüttelinkubator mit zwei Volumen 50 % Acetonitril inkubiert. Die Waschlösung wurde dekantiert und einmal mit 1 Volumen 100 % Acetonitril für fünf Minuten inkubiert. Acetonitril wurde danach ebenfalls dekantiert und die Gelstücke für weitere fünf Minuten mit

einem Volumen 100 mM Bicarbonat (BiCa) versetzt. Als nächstes wurde ein Volumen Acetonitril (Verhältnis BiCa/ACN 1:1) hinzugegeben und die Gelstücke für 15 min in einem Schüttler inkubiert. Nach Abnahme der Flüssigkeit wurden die Proben in einer Vakuumzentrifuge (siehe Abschnitt 2.1.6) eingetrocknet. Zur quantitativen Reduzierung von Disulfidbrücken innerhalb der Proteine wurden zwei Volumen DTT (10 mM in 100mM BiCa) für 45 Minuten bei 56 °C hinzugegeben. Das Gelstück wurde für 5 min bei Raumtemperatur abgekühlt und die Flüssigkeit vollständig dekantiert. Eine darauf folgende irreversible Alkylierung der Cysteinreste (SH-Gruppe) mit Iodoacetamid wurde zur Verhinderung von Protein-Aggregaten durchgeführt. Die Probe wurde mit zwei Volumen Iodoacetamid (55 mM in 100 mM BiCa) versetzt und für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach der vollständigen Reduktion und Alkylierung wurde das Gelstück erneut gewaschen, um es von eventuellen Resten an Commassie-Farbstoff zu befreien. Dazu wurde zunächst sämtliche Flüssigkeit dekantiert, mit einem Volumen 100 mM BiCa versetzt, und für 15 min bei RT im Schüttler inkubiert. Nach Zugabe von einem gleichen Volumen Acetonitril wurde die Inkubation unter den vorher beschriebenen Bedingungen wiederholt. Nach erfolgreichem Waschen wurde die Flüssigkeit erneut dekantiert und das Gelstück in der Vakuumzentrifuge getrocknet. Zu den Gelstücken wurden sukzessive kleine Mengen an Trypsin (10 µl Portionen mit 10 ng gelöst in 50 mM BiCa) zur „Im-Gel-Spaltung“ der Carboxylgruppe von Lysin und Arginin hinzugegeben und für je 10 min auf Eis inkubiert. Dieser Schritt wurde so oft wiederholt bis das entsprechende Gelstück vollständig aufgequollen war. Danach wurde der Überstand abgenommen, die Probe mit einem Volumen 25 mM BiCa bedeckt, und ÜN bei 37 °C proteolytisch zersetzt.

Zur Extraktion der Peptidfragmente aus dem Gel wurden die Ansätze kurz abzentrifugiert, und für zwei Minuten im Ultraschallbad extrahiert. Der Überstand wurde abgenommen und in ein neues Gefäß überführt. Das restliche Gelstück wurde daraufhin für 20 min mit einem Volumen 25 mM BiCa und folgend für 15 min mit einem Volumen Acetonitril (BiCa/ACN 1:1) im Schüttler inkubiert. Es folgte eine wiederholte zweiminütige Behandlung im Ultraschallbad. Der Überstand wurde zum zuvor gesammelten hinzugegeben. Die katalytische Spaltung durch Trypsin wird durch zweimalige Behandlung mit je einem Volumen 5 % Methansäure/Acetonitril (1:1) gestoppt und die Überstände zu den zuvor gesammelten hinzugefügt. Die vereinigten Überstände wurden bei 60 °C in der Vakuumzentrifuge auf ein Volumen von 10-15 µl eingengt. Die Proben ließen sich bei -20 °C lagern.

### **2.4.6.2 Proteinsequenzierung**

Vor der Proteinsequenzierung wurden die Proben über C18-ZipTIPS entsalzt. Die Sequenzierung der Proben aus den SDS-Gelen (siehe Abschnitt 2.4.7) wurde am BMFZ Düsseldorf unter Verwendung eines ESI-Q-TOF-MS/MS (Applied Biosystems QSTAR XL) von Dr. Sabine Metzger (BMFZ, Universitätsklinikum Düsseldorf) durchgeführt. Die Peptide aus der chromatographischen Reinigung der Phosphofruktokinase wurden von Dr. Katrin Henze (Bot. III, Universität Düsseldorf) mittels ESI-Q-TOF-MS/MS (Micromass Q-TOF2) sequenziert.

### **2.4.7 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)**

Die diskontinuierliche Gelelektrophorese von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen beruht auf der Vorschrift von Laemmli (1970) und erfolgte in Elektrophoresekammern für 12–16 Stunden bei 40–50V ÜN, oder bei 150–200 V für 2–6 Stunden über Tag [111]. Zum Gießen des Geles, der Herstellung von Laufpuffer, sowie des apparativen Aufbaus wurde die Vorschrift von Sambrook *et al.* verwendet [117]. Das Sammelgel wurde dreiprozentig gegossen. Das Trenngel war zwölfprozentig. Das Trenngel wurde unmittelbar nach dem Gießen mit einer dünnen Schicht n-Butanol oder Isopropanol überschichtet, um Reaktionen mit Luftsauerstoff zu vermeiden bzw. das Einschließen von Luftblasen zu verhindern. Diese „Schutzschicht“ wurde nach vollständigem Auspolymerisieren des Geles dekantiert. Auf das Trenngel wurde das Sammelgel gegossen und auspolymerisiert [111]. Vor dem Auftragen der Proben wurden diese mit 5 x Probenpuffer (50 mM Tris-HCl pH 6.8; 5 mM EDTA; 5 % SDS (w/v); 25 % 2-Mercaptoethanol (v/v); 50 % Glycerin (v/v); 0,25 % Bromphenolblau (w/v)) solubilisiert und vor dem Auftragen für fünf Minuten bei 95 °C denaturiert.

Die Größe der aufgetragenen Proteinproben lässt sich anhand ihrer elektrischen Mobilität mit der Computer-Software INCHWORM<sup>1</sup> bestimmen.

<sup>1</sup>([http://molecularworkshop.com/programs/inchworm.html#TOP\\_OF\\_INCH](http://molecularworkshop.com/programs/inchworm.html#TOP_OF_INCH)).

### **2.4.8 Färbung von Proteingelen**

#### **2.4.8.1 Färben von Proteinen im Gel mit Coomassie Brilliant Blau**

Zur direkten Anfärbung der Proteine im Gel wurde die Färbemethode nach Neuhoff *et al.* einschließlich der Modifikationen von Heukeshofen und Dernick angewandt [93, 94]. Eine Tablette PhastGel Blue R-350 wurde für 10 Minuten in 80 ml Wasser gelöst. Die Färbelösung

wurde mit 120 ml Methanol versetzt und durch einen Faltenfilter von groben, ungelösten Rückständen getrennt. Zur Färbung wurde eine 1:10 Verdünnung mit 10 % Essigsäure (v/v) erstellt. Die Lösung wurde auf 90 °C erhitzt. Unter Schwenken auf einem 2D-Schüttler wurde das Gel in der Lösung für 10–60 min bis zur gewünschten Färbung inkubiert. Hintergrundanfärbungen wurden durch Schwenken in 10% Essigsäure (v/v) entfernt. Mit dieser Methode ließen sich Proteinmengen ab 100 ng detektieren.

### 2.4.8.2 Silberfärbung von Proteingelen

Eine sensitive Färbemethode von Proteinen beruht auf der Komplexbildung zwischen Silber-Ionen und spezifischen Aminosäureresten (Glu, Asp, Cys). Mit Hilfe des von Blum *et al.* publizierten Verfahrens ließen sich Proteine ab Konzentrationen von 5 ng detektieren [120]. Zu Beginn wurden die Proteine durch eine Stunde schütteln in 30 % Methanol (v/v) und 12 % Essigsäure (v/v) im Gel fixiert. Das Gel wurde anschließend dreimal für je 20 Minuten in 30 % Ethanol (v/v) gewaschen. Es folgte eine Vorinkubation mit 0,02 %  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ . Das Gel wurde erneut dreimal für je 20 Sekunden mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  gewaschen. Das Gel wurde nun in 0,2 %  $\text{AgNO}_3$  und 0,075 % Formaldehyd für 30 Minuten imprägniert und zweimal für zwei Minuten in deionisiertem Wasser gewaschen. Zur Entwicklung wurde das Gel in 6 %  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (w/v), 0,0004 %  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  (w/v) und 0,05 % Formaldehyd (v/v) für 20 bis 30 Minuten geschwenkt. Bei ausreichender Färbung wurde diese durch 50 % Methanol (v/v) und 12 % Essigsäure (v/v) gestoppt. Zu stark gefärbte Gele ließen sich durch „Farmers-Reagenz“ wieder entfärben [121]. Hierzu wurde das Gel in 0,5 g  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  und 0,8 g  $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$  ad 250 ml geschwenkt. Abschließend wurde dreimal je 10 Minuten in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  gewaschen.

### 2.4.9 Western-Blot-Transfer

Die im SDS-Gel aufgetrennten Proteine (siehe Abschnitt 2.4.7) wurden elektrophoretisch auf eine Membran übertragen [122]. Der Transfer erfolgte im Semi-Dry-Blot-System auf eine Nitrozellulose-Membran (Hybond-C Extra, GE-Healthcare). Es wurden 3MM-Whatman-Membran und die Nitrozellulosepapier auf die Größe des Gels angepasst, und mit Transferpuffer (39 mM Glycin, 48 mM Tris, 0,037 % SDS (w/v), 20 % Methanol (v/v)) befeuchtet. Die Graphit-Elektroden wurden mit  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  befeuchtet. Auf die Anode wurden drei Lagen 3MM-Whatman-Papier luftblasenfrei aufgebracht. Auf die Papierschicht folgte die Nitrozellulose-Membran sowie das zuvor in  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschene Gel. Abschließend wurde der Aufbau mit drei Lagen 3MM-Whatman Papier überschichtet. Zum Entfernen eventueller

Luftblasen wurde vorsichtig mit einem Reagenzglas der Aufbau glatt gestrichen. Nach Anschluß der Kathode wurde die Apparatur mit einer mit Wasser gefüllten 1l Flasche beschwert. Der Transfer erfolgte für 120 min bei  $0,35 \text{ mA/cm}^2$ .

### **2.4.9.1 Färbung von Nitrozellulosemembranen mit Ponceau-S**

Die Proteinfärbung mit Ponceau-Rot wurde zur Kontrolle der Transfereffizienz durchgeführt. Anhand dieser reversiblen Färbung konnte der Blot generell überprüft und eine Markierung der Markerproteine vorgenommen werden. Die Membran wurde 10 min in der Ponceau-Lösung (0,2 % Ponceau S (w/v); 3 % Essigsäure (v/v)) geschüttelt und anschließend in  $\text{H}_2\text{O}_{\text{dest}}$  bis zum Sichtbarwerden der Banden entfärbt.

### **2.4.9.2 Immunodetektion von Proteinen**

Die Membran wurde zur Absättigung unspezifischer Bindestellen für eine Stunde in Blocking-Reagenz (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl, 3 % BSA (w/v)) inkubiert. Mit TBST (0,5 M NaCl; 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,05% Tween 20 (v/v); 0,2 % Triton X 100 (v/v)) wurde zweimal für 10 Minuten gewaschen. Mit TBS (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl) wurde einmal für 10 Minuten gewaschen. Der erste Antikörper wurde mit entsprechender Verdünnung nach Herstellerangaben in einem Folienschlauch zur primären Immunodetektion für eine Stunde bei RT unter Schütteln inkubiert. Zur Entfernung nicht gebunden Antikörpers wurde die Membran wie zuvor beschrieben gewaschen. Es folgte eine weitere Immunodetektion mit einem sekundären Antikörper. Diese Inkubation erfolgte für eine Stunde auf dem Schüttler bei RT. Vor der abschließenden Substratinkubation wurde die Membran dreimal mit TBST für je 10 Minuten gewaschen. Der Nachweis erfolgte mit dem „BM Chemiluminescence Blotting Substrate“ nach Herstellerangaben. Die Exposition erfolgte je nach Stärke des Signals auf XAR-Filmen (Kodak).

### **2.4.10 Herstellung von Proteinrohextrakt**

Sämtliche Proteinextrakte wurden bei  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  erstellt. Es wurden vorgekühlte Geräte und Materialien verwendet.

#### **2.4.10.1 Herstellung eines Proteinrohextraktes aus *Spinacia oleracea***

1300 g Spinat-Blätter (Polka) wurden geerntet, von der Mittelrippe befreit, und in Leitungswasser gewaschen. Das Blattmaterial wurde im Waring-Blender sukzessive mit insgesamt 250 ml Aufschlusspuffer (50 mM Tris, 2 mM DTT, 5 mM MgOAc, 1 mM ATP, 0,1 % 2-Mercaptoethanol (v/v), 10 % Glycerin (v/v), 1mM Iodoacetat, 2,5 ml 100 x Protease Inhibitor Mix [Sigma], pH 7,8) und 10 g Polyclar AT homogenisiert. Anschließend wurde das Homogenat durch zwei Lagen Nylongewebe gepresst. Es folgten zwei aufeinanderfolgende Zentrifugationsschritte im SLA 1500 Rotor bei 31.000 g. Der Überstand wurde umgehend verwendet.

#### **2.4.10.2 Herstellung eines Proteinrohextraktes aus *S. cerevisiae***

5 OD<sub>600</sub> einer Hefe-Kultur wurden durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 4 °C und 3000 Upm sedimentiert und mit 20 ml Aufschluss-Puffer (50 mM Natriumphosphat-Puffer pH 7,0; 10 mM KCl; 1 mM MgSO<sub>4</sub>; 50 mM 2-Mercaptoethanol) gewaschen. Nach einer erneuten Zentrifugation wurde das Zellpellet in 100 µl Aufschluß-Puffer (+Protease-Inhibitor-Mix) resuspendiert. Die Suspension wurde in ein Eppendorfgefäß überführt und bis unterhalb des Meniskus der Flüssigkeit mit Glasperlen (Ø 0,40-0,60 mm) gefüllt. Der Zellaufschluss erfolgte für 6 Minuten auf dem Vibrax (siehe Abschnitt 2.1.6) bei 14.000 Upm. Der Rohextrakt wurde abgenommen und für 10 Minuten bei 10.000 Upm und 4 °C zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde mit einem Volumen Aufschluß-Puffer (+ 2 % Triton X100) versetzt.

### **2.5 Methoden im Umgang mit Nukleinsäuren**

#### **2.5.1 Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Nukleinsäure-Konzentration ließ sich photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmen. Bei einer Extinktion von  $A_{260\text{ nm}} = 1$  befinden sich in 1 ml etwa 50 µg dsDNA bzw. 40 µg RNA. Das Spektrum bei 230 nm und 280 nm gibt Aufschluss über Proteinkontaminationen in der Lösung [117]. Für eine reine DNA-Lösung liegt das Verhältnis von OD<sub>230</sub>/OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> bei 1:2:1.

Neben der photometrischen Bestimmung wurde dsDNA optisch anhand ihrer Färbeintensität in Agarosegelen (siehe Abschnitt 2.5.2) bestimmt. Die Konzentrationen wurden anhand des mitaufgetragenen Größenstandards (siehe Abschnitt 2.1.8) ermittelt.

### 2.5.2 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren (DNA und RNA)

Aufgrund ihrer physiologischen Beschaffenheit (negative Ladung) wurden Nukleinsäuren in 0,8-1,5 %igen Agarosegelen bei 80-150 V/cm pherographiert. Zur Visualisierung von DNA wurde dem Gel 50 ng/ml Ethidiumbromid beigefügt, welches zwischen dsDNA interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert [117]. Als Puffer bei Agarosegelen zur Trennung von DNA diente TAE (2 M Tris-HCl; 1 M Essigsäure; 50 mM EDTA pH 8,0). Die DNA-Proben wurden zuvor entsprechend mit Ladepuffer (10 mM Tris-HCl pH 7,6; 60 % Glycerin (v/v); 60 mM EDTA; 0,03 % Bromphenolblau; 0,03 % Xylencyanoblau) versetzt.

Um Sekundärstrukturen in RNA-Proben zu vermeiden, wurden diese zuvor mit Formaldehyd denaturiert. Dazu wurden die Proben in 5 x RNA-Ladepuffer (80 µl 500 mM EDTA pH 8,0; 720 µl 37 % Formaldehyd; 2 ml 100 % Glycerin; 3084 µl Formamid; 4 ml 10 x FA-Gelpuffer; 0,03 % Bromphenolblau; ad 10 ml DEPC-H<sub>2</sub>O\*) aufgenommen und für 5 min bei 65 °C denaturiert. Das Gel wurde aus FA-Gelpuffer (200 mM MOPS; 50 mM Natriumacetat; 10 mM EDTA; pH 7,0 mit 5 M NaOH) erstellt. Pherographiert wurde bei 5V/cm in FA-Laufpuffer (100 ml 10 x FA-Gelpuffer; 20 ml 37 % Formaldehyd; 880 ml DEPC-H<sub>2</sub>O\*).

\*(Destilliertes H<sub>2</sub>O mit 0,1 % (v/v) DEPC versetzt; über Nacht gelöst und abschließend autoklaviert)

### 2.5.3 Präzipitation und Reinigung von Nukleinsäuren

Die folgenden Arbeitsschritte wurden, wenn nicht anders erwähnt, nach Vorschriften von Sambrook *et al.* durchgeführt [117].

Die Phenolisierung von Nukleinsäuren diente zur Entfernung von Proteinen in der Probe. Die Nukleinsäuren wurden mit einem Volumen Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol ausgeschüttelt. Vortexen wurde vermieden, um Strangbrüche der Nukleinsäuren auszuschließen. Zur Beschleunigung der Phasentrennung wurde eine Zentrifugation bei 16.300 g für 5 Minuten durchgeführt. Der wässrige Überstand enthielt die gereinigten Nukleinsäuren.

Zur Fällung von DNA wurde mit 0,1 Vol 3 M Natriumacetat pH 6,5 und 2 Vol EtOH 96 % für mindestens eine Stunde bei -20 °C präzipitiert. Die gefällte DNA wurde abschließend mit 70 % EtOH gewaschen.

Zur RNA Isolierung aus Spinat wurden 40 g frische Spinatblätter in einem Mörser unter Zugabe von flüssigem Stickstoff 30 min zerkleinert. Es wurden 5 g Polyclar AT und 200 ml Aufschlusspuffer (500 mM Tris-HCl pH 9; 100 mM NaCl; 0,2 % SDS (v/v); 10 mM EDTA

pH 8; 0,2 mg/ml Proteinase K; 30 mM 2-Mercaptoethanol) hinzugegeben. Nach einer einminütigen Zentrifugation bei 200 Upm wurde der Überstand in neue Zentrifugenbecher überführt. Es wurde mit einem Volumen Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) ausgeschüttelt und für fünf min bei 10.300 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 2 M LiCl gefällt und in (400 mM NaCl; 0,2 % SDS (v/v); 10 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,2 mg/ml Proteinase K) aufgenommen.

### **2.5.4 Reinigung von polyadenylierter RNA aus isolierter Gesamt-RNA**

Zum Anfertigen von polyadenylierter RNA (poly(A)<sup>+</sup>-RNA) wurde nach dem Protokoll von GE-Healthcare (mRNA Purification Kit; siehe Abschnitt 2.1.7) und dem entsprechenden Kit verfahren. Die poly(A)<sup>+</sup>-RNA wurde in 50 µl DEPC-H<sub>2</sub>O\* aufgenommen. Die poly(A)<sup>+</sup>-RNA wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C aufbewahrt.

\*(Destilliertes H<sub>2</sub>O mit 0,1 % (v/v) DEPC versetzt; über Nacht gelöst und anschließend autoklaviert)

### **2.5.5 Extraktion von DNA aus Agarosegelen**

DNA-Fragmente wurden unter langwelligem UV-Licht aus dem Agarosegel geschnitten und mit dem „QIAquick Gel Extraction Kit“ (siehe Abschnitt 2.1.7) nach Herstellerangaben aus der Gelmatrix gereinigt. Das Eluat wurde bei -20 °C gelagert.

### **2.5.6 Isolierung von Plasmid-DNA**

#### **2.5.6.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli***

##### **2.5.6.1.1 Mini-Präparation**

Die Reinigung von Plasmid-DNA in kleinen Mengen verlief nach Angaben von Sambrook *et al.* (1989), [117]. Beruhend auf dem Prinzip der alkalischen Lyse werden denaturierte Proteine, hochmolekulare RNA, denaturierte chromosomale DNA und bakterieller Zelldebris von Kaliumdodecylsulfat mit Salz präzipitiert. 2 ml ÜN Kulturen wurden vollständig in Eppendorfgefäße überführt, und für zwei min bei 13000 Upm sedimentiert. Das Zellpellet wurde in 150 µl Puffer 1 (50 mM Tris/HCl; 10 mM EDTA; 100 µg/ml RNase) resuspendiert und anschließend in 150 µl Puffer 2 (200 mM NaOH; 1 % SDS (w/v)) fünf mal invertiert. Die Neutralisation erfolgte nach etwa 5 min in eiskaltem Puffer 3 (49,7 g Kaliumacetat; 29,5 ml konz. Essigsäure). Die Proben wurden 5 Minuten auf Eis inkubiert und dann 30 Minuten

zentrifugiert. Der Überstand wurde wie in Abschnitt 2.5.3 beschrieben gefällt und in 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub> aufgenommen.

### **2.5.6.1.2 Maxi-Präparation**

Um Plasmid-DNA quantitativ zu reinigen, wurde entweder das Kit „NucleoBond PC 500“ oder das „Plasmid-Midi-Kit“ verwendet (siehe Abschnitt 2.1.7). Die Durchführung erfolgte jeweils nach den Angaben des Herstellers.

### **2.5.6.3 Plasmid-Präparation aus *S. cerevisiae***

Eine 5 ml Übernachtskultur wurden für 10 Minuten bei 3000 Upm und 4 °C sedimentiert. Das Sediment wurde mit 5 ml sterilem H<sub>2</sub>O gewaschen und dann in 400 µl Puffer 1 (siehe Abschnitt 2.5.6.1.1) resuspendiert. Es wurden 400 µl Puffer 2 (siehe Abschnitt 2.5.6.1.1) zugegeben, vorsichtig gemischt und das Gefäß bis unterhalb des Meniskus der Flüssigkeit mit Glasperlen gefüllt. Der Zellaufschluss erfolgte für 5 Minuten bei 4 °C und 14000 Upm im Vibrax (siehe Abschnitt 2.1.6). Nach einer kurzen Zentrifugation wurde der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt und mit 250 µl Puffer 3 (49,7 g Kaliumacetat; 29,5 ml konz. Essigsäure *ad* 200 ml H<sub>2</sub>O<sub>dest</sub>) versetzt. Nach vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Es wurde 15 Minuten bei 10000 Upm zentrifugiert und der Überstand in neue Reaktionsgefäße überführt. Die Plasmid-DNA wurde mit Isopropanol gefällt und mit 70 % Ethanol gewaschen. Das getrocknete Pellet wurde in 20 µl Tris-HCl pH 8,0 aufgenommen.

### **2.5.6.4 Präparation chromosomaler DNA aus *S.cerevisiae***

Die Präparation genomischer DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte nach der Vorschrift von Fink *et al.* (1983) [123].

## **2.5.7 Enzymatische Modifikationen von DNA**

### **2.5.7.1 Restriktion von DNA**

Restriktionsendonukleasen (siehe Abschnitt 2.1.5.1) wurden bei Temperaturen und Pufferbedingungen nach Herstellerangaben eingesetzt. Analytische Ansätze wurden in Volumina von 10-20 µl angesetzt. Präparative Ansätze erfolgten in Volumina von 20-50 µl.

Die Menge und Einsatzdauer des oder der entsprechenden Restriktionsenzyme ergab sich aus einer Berechnungsformel bezogen auf die entsprechenden Schnittstellen im Phagen  $\lambda$ .

### **2.5.7.2 Dephosphorylieren von DNA**

Die Dephospholierung von Vektor-DNA erfolgte mit alkalischer Phosphatase nach Herstellerangaben für 30 min bei 37 °C.

### **2.5.7.3 Phosphorylieren von DNA**

T4 Polynukleotid-Kinase und 1,5  $\mu$ l 200 mM ATP-Lösung wurden zur Phosphorylierung der Probe eingesetzt. Die Phosphorylierungsreaktion wurde für 30 Minuten bei 37 °C durchgeführt. Die Kinase wurde nach Herstellerangaben denaturiert.

### **2.5.7.4 Glätten von 5'-Überhängen**

Zum Auffüllen von 5'-Überhängen wurden pro  $\mu$ g DNA 2 U Klenow-Fragment und je 25 mM dNTP für zwei Stunden bei 37 °C inkubiert. Zur Inaktivierung wurde für 10 Minuten bei 70 °C inkubiert.

### **2.5.7.5 Ligation**

Zur katalytischen Verknüpfung von 5'-Phosphat und der 3'-Hydroxylgruppe zweier DNA-Moleküle wurden pro Ansatz 1  $\mu$ l T4-Ligase und nach Herstellerangaben Ligationspuffer eingesetzt. Das molare Verhältnis von Vektor und Insert-DNA entsprach etwa 1:10. Die Ligation erfolgte ÜN bei 16 °C im Wasserbad oder für 10 min mit dem „Quick Ligation Kit“ (siehe Abschnitt 2.1.7).

### **2.5.7.6 cDNA-Synthese**

Die cDNA-Synthese wurde mit Hilfe des „RevertAid<sup>TM</sup> First Strand cDNA Synthesis Kit“ (siehe Abschnitt 2.1.7) erstellt. 0,5  $\mu$ g poly(A)<sup>+</sup>-RNA aus 2.5.4 und 0,5  $\mu$ g Oligo(dT)<sub>18</sub>-Primer wurden in insgesamt 12  $\mu$ l Endvolumen für fünf Minuten bei 70 °C denaturiert. Es wurden 4  $\mu$ l 5x Reaktionspuffer, 1  $\mu$ l Ribonuklease-Inhibitor und 2  $\mu$ l 10 mM dNTP-Mix hinzugegeben und für fünf Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Transkription der RNA erfolgte bei 42 °C für eine Stunde. Eine Denaturierung bei 70 °C für zehn Minuten inaktivierte das Enzym.

### 2.5.7.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierreaktion erfolgte mit dem „Dynamic Direct Cycle Sequencing Kit“ (siehe Abschnitt 2.1.7) nach Sanger *et al.* (1977) [124]. Etwa 2 µg der zu sequenzierenden Plasmid-DNA wurden pro Ansatz eingesetzt. Die Oligonukleotide „M13\_for“ und „M13\_rev“ lagern sich vor und hinter dem klonierten Insert an (siehe Abschnitt 2.5.11). Die *de novo* Synthese von distinkten Abbruch-Fragmenten wurde ermöglicht durch den anteiligen Einbau von Didesoxyribonukleotidtriphosphaten (ddNTPs). Beide Oligonukleotide sind fluoreszenzmarkiert. M13\_rev emittiert Licht der Wellenlänge 800 nm und M13\_for der Wellenlänge 700 nm. Nach Auftrennung auf einem denaturierendem Polyacrylamidgel ließen sich die fluoreszenzmarkierten Oligonukleotide durch einen Infrarot-Laser anregen, und wurden mit Hilfe der Sequenziersoftware „e-Seq“ (LI-COR Biosciences GmbH, Bad-Homburg) analysiert.

### 2.5.8 Erstellen einer cDNA-Bibliothek aus *Spinacia oleracea*

Zur Detektion einer zum isolierten Protein korrespondierenden DNA-Sequenz wurde eine cDNA-Bibliothek angelegt. Im ersten Schritt wurde die cDNA-Synthese mit Hilfe des „TimeSaver cDNA Synthesis“ Kits nach dem Gubler-Hoffman Verfahren durchgeführt [125]. Die erhaltene cDNA wurde für die Ligation in den λ-Vektor mit *EcoRI/NotI*-Adaptoren an beide Enden versehen (siehe Abschnitt 2.5.7.5; siehe Herstellerprotokoll). Diese Adaptoren besitzen dephosphorylierte *EcoRI*-Überhänge und eine interne *NotI*-Restriktionsschnittstelle. Es folgte eine Phosphorylierung wie in Abschnitt 2.5.7.3 angegeben. Überschüssige Adaptoren wurden durch Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol-Extraktion entfernt.

Die Ligation in den λ-ZAP II-Vektor wurde mit dem „Lambda ZAP II Predigested *EcoRI*/CIAP-Treated Vector“ Kit nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration der cDNA betrug 35 ng/µl, der Vektor lag in einer Konzentration von 1 µg/µl vor. Die durchschnittliche Größe der cDNA lag bei 1,8 kb, während der λ-ZAP II Vektor 42 kb groß ist. Somit wurden in der Ligation 1 µg Vektor und 43,9 ng Fragment eingesetzt. 43,9 ng entsprachen 1,25 µl cDNA.

Der „Gigapack III Gold Packaging Extract“ (siehe Abschnitt 2.1.7) wurde zur Verpackung des ligierten Vektors in λ-Phagenproteine verwendet. Die Transfektion, Präparation phagenkompetenter Zellen, die Vermehrung von Phagen und Titerbestimmung der Phagenbank wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 2.5.8.1 Amplifikation der primären Phagenbibliothek

Zur Amplifizierung der Phagenbank wurden 60 x 3000 pfu mit je 200 µl *E.coli* XL1-Blue MRF<sup>c</sup> (OD<sub>600</sub> = 0,5) auf 60 LB-Platten ausplattiert und für ca. 9 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Platten wurden mit je 5 ml SM-Puffer (0,1 M NaCl; 10 mM MgSO<sub>4</sub>; 20 mM Tris-HCl pH 7,5; 0,01 % Gelatine /w/v)) bedeckt und über Nacht bei 4 °C unter vorsichtigem Schütteln inkubiert. Die „ausgeschwämmten“ Phagen wurden dann in eine sterile Schottflasche überführt. Die Platten wurden erneut mit je 2 ml SM-Puffer bedeckt und kurz geschwenkt. Der Puffer wurde ebenfalls in die Flasche überführt. Durch Zugabe von 5 % Chloroform (v/v) wurden verbleibende *E.coli* Zellen ausgeschüttelt. Nach einer fünfminütigen Inkubation der Phagenbank bei Raumtemperatur wurden Zellreste durch eine Zentrifugation für 10 Minuten bei 500 × g entfernt. Der Überstand wurde mit 0,3 % (v/v) Chloroform versetzt. Von der amplifizierten Phagenbank wurde sowohl der Titer, als auch der Anteil an rekombinanten Phagen bestimmt. Die Bank wurde bei 4 °C aufbewahrt.

### 2.5.8.2 Rastern einer cDNA-Bibliothek nach einer spezifischen cDNA

Zur Herstellung von Replikafiltern und zur Plaquehybridisierung wurde nach der Anleitung von Sambrook *et al.* (1989) verfahren [117]. Es wurden je 2000 pfu der cDNA-Bank pro Platte auf 40 LB-Platten ausplattiert. Nach Inkubation der Platten über Nacht bei 37 °C wurden die Platten für mindestens 2 Stunden bei 4 °C gekühlt. Auf die kalten Platten wurden Nitrozellulose-Rundfilter (PALL Corporation Life Sciences, Bio Trace<sup>TM</sup> NT Pure Nitrocellulose Transfer Membrane) luftblasenfrei aufgebracht und für 15 Minuten hybridisiert. Die Filter wurden entfernt und auf mit Southern I getränktes Whatman 3 MM Papier gelegt. Nach 10 Minuten wurden die Filter für ebenfalls 10 Minuten auf Whatman 3 MM Papier gelegt, welches mit Southern II getränkt war. Dann wurden die Filter für 10 Minuten auf mit 2 × SSPE getränktes Whatman Papier gelegt und abschließend 45 Minuten bei 80 °C gebacken. Die gebackenen Filter wurden zu 20–30 Stück in einer Petrischale bei Raumtemperatur gelagert.

**Tabelle 05:** Lösungen zum Rastern einer cDNA-Bank

| Southern I: | Southern II:        | 20 x SSPE:                              |
|-------------|---------------------|---|
| 0,5 M NaOH  | 0,5 M Tris          | 20 mM EDTA                              |
| 1,0 M NaCl  | 3,0 M NaCl          | 3 M NaCl                                |
|             | ca. 37 ml konz. HCl | 200 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> |
|             | ad pH 7.5           | ad pH 7.4                               |

### 2.5.8.2.1 Radioaktive Sondenmarkierung

Die Sonden wurden nach der Methode von Feinberg und Vogelstein (1984) mit  $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP markiert [125].

### 2.5.8.2.2 Homologe Hybridisierung

Die Filter wurden bei 68 °C vorhybridisiert. Nach 2 Stunden wurde die Vorhybridisierungslösung dekantiert und 1,5 ml vorgewärmte Hybridisierungslösung pro Filter, 1/200 Volumen Blocking-DNA und die Sonde hinzu gegeben. Die Hybridisierung erfolgte über Nacht im Wasserbad bei 68 °C. Am nächsten Morgen wurden die Filter in Waschlösung gewaschen, getrocknet und bei -70 °C auf XAR-Filmen (Kodak) exponiert. Bereiche mit Signalen wurden ausgestochen in SM-Puffer überführt (siehe Abschnitt 2.5.8.1) und für drei Stunden bei RT inkubiert. Je 0,5 und 1  $\mu\text{l}$  einer 1:1000-Verdünnung dieser Phagensuspension wurden ausplattiert. Von diesen Platten wurden Replikafilter erstellt, welche erneut mit der homologen Sonde hybridisiert wurden. Mittels Autoradiographie wurden Plaques mit der gesuchten cDNA identifiziert.

**Tabelle 06:** Lösungen zur homologen Hybridisierung

| Vorhybridisierungslösung:       | Hybridisierungslösung:          | Waschlösung:                    |
|---------------------------------|---------------------------------|---------------------------------|
| 6 $\times$ SSPE (siehe 2.5.8.2) | 3 $\times$ SSPE (siehe 2.5.8.2) | 2 $\times$ SSPE (siehe 2.5.8.2) |
| 0,1 % SDS                       | 0,1 % SDS                       | 0,1 % SDS                       |
| 0,02 % Ficoll                   | 0,02 % Ficoll                   |                                 |
| 0,02 % PVP                      | 0,02 % PVP                      |                                 |

### 2.5.8.2.3 Einzelklon-Ausschleusung

Positive Klone wurden aus dem Agar gestochen und in SM-Puffer mit Chloroform überführt. Der Ansatz wurde über Nacht bei 4 °C inkubiert. 200  $\mu\text{l}$  phagenkompetente XL1-Blue MRF<sup>-</sup>-Zellen ( $\text{OD}_{600} = 1,0$ ) wurden mit 250  $\mu\text{l}$  der Phagensuspension und 1  $\mu\text{l}$  des ExAssist Helferphagen ( $>1 \times 10^6$  pfu/ $\mu\text{l}$ ) koinfiziert und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 3 ml LB-Medium mit 10 mM  $\text{MgSO}_4$  und 0,2 % Maltose zugegeben. Die Ausschleusung wurde für mindestens 3 Stunden bei 37 °C auf dem Schüttler durchgeführt. Die Zellen und die Phagenpartikel wurden für 20 Minuten bei 70 °C lysiert und die Zelltrümmer durch eine 15minütige Zentrifugation bei 1000 x g abgetrennt. Der Überstand enthält den filamentösen M13 Phagen. Um das ausgeschleuste Phagemid zu plattieren, wurden 200  $\mu\text{l}$  SOLR-Zellen ( $\text{OD}_{600} = 1,0$ ) mit 100 bzw. 10  $\mu\text{l}$  des M13 Phagen infiziert. Die Infektion erfolgte bei 37 °C für 15 Minuten. 200  $\mu\text{l}$  des Zellen-Phagen-Gemischs

wurden auf eine LB-Ampicillin-Platte ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Kolonien auf der Platte enthalten das pBluescript-Plasmid, da dieses Ampicillin-Resistenz verleiht.

### **2.5.9 Transformation**

#### **2.5.9.1 Transformation von *E. coli***

Die Transformation von *E. coli* mittels RbCl<sub>2</sub>-kompetenter Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Hanahan (1983), [126].

#### **2.5.9.2 Transformation von Hefezellen**

Die Transformation von *S. cerevisiae*-Stämmen erfolgte nach der Gefrier-Methode von Klebe *et al.* (1983) und nach Dohmen *et al.* (1991) modifiziert [127, 128].

### **2.5.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)**

Die Polymerasekettenreaktion erfolgte nach dem Protokoll von Inis *et al.* (1990) [129]. Die PCR wurde mit 50 ng DNA (cDNA oder genomische DNA) als Matrize und einer Oligonukleotidkonzentration von 50-160 pmol in einem Gesamtvolumen von 30 bzw. 50 µl durchgeführt. 2 mM MgOAc, 0,25 mM dNTP-Mix und 1 x PCR-Puffer wurden zugesetzt. Taq-Polymerase (1 Unit) wurde erst nach Erwärmung des Ansatzes hinzu pipettiert. Zur Amplifizierung von Fragmenten für die heterologe Expression wurde der Triple Master Polymerase-Mix von Eppendorf verwendet. Die PCR-Reaktionen wurden entweder im Thermocycler Primus 96 Plus (MWG) oder im Thermocycler Primus 25 (PqLab) durchgeführt. Die PCR-Amplifikate wurden mit 6 x Ladebuffer versetzt und auf ein 1–2 prozentiges Agarosegel aufgetragen (siehe Abschnitt 2.5.2). Das PCR-Programm wurde mit einer Vorerhitzung des Deckels auf 110 °C begonnen. Es folgte eine 10 minütige Aufheizphase bei 98 °C. Der Ansatz wurde im dritten Schritt für 1 min bei 94 °C denaturiert. Anschließend wurde je nach PCR eine Annealing-Phase von 45-120 Sekunden im Thermocycler zwischen 45 und 60 °C programmiert. Es folgte in Schritt 5 eine 1 bis 3 minütige Erhitzung auf 72 °C. Die Schritte 3 bis 5 wurden 30 x zyklisch wiederholt bis abschließend eine finale Primerverlängerung für 10 min bei 72 °C durchgeführt wurde.

### 2.5.10.1 RACE-PCR

Fehlende 5'- und 3'-kodierende cDNA-Sequenzen wurden mit Hilfe von RACE-PCR-Kits (**R**apid-**A**mplification-of-**c**DNA-**E**nds-PCR; siehe Abschnitt 2.1.7) und spezifischen Oligonukleotiden (siehe Abschnitt 2.1.9.2 und 2.1.9.3) amplifiziert.

**Tabelle 07:** PCR Ansatz und PCR Programm der RACE-PCR

| PCR-Ansatz:                       | PCR-Programm: |       |
|-----------------------------------|---------------|-------|
| 31 µl H <sub>2</sub> O            | 2 Minuten     | 94 °C |
| 5 µl 10 × PCR-Puffer              | 1 Minute      | 94 °C |
| 3 µl 25 mM MgCl <sub>2</sub>      | 1 Minute      | 55 °C |
| 1 µl 10 mM dNTPs                  | 1 Minute      | 72 °C |
| 2 µl GSP2 (10 pmol/µl)            | 5 Minuten     | 72 °C |
| 2 µl Anker-Oligonukleotid (10 µM) |               |       |
| 5 µl cDNA                         | kühlen auf    | 8 °C  |
| 0,5 µl = 2,5 U Taq-Polymerase     |               |       |

## 2.6 Bioinformatische Methoden

Bioinformatische Analysen von Nukleotid- und/oder Protein-Sequenzen wurden mit Teilen des EMBOSS (**E**uropean **M**olecular **B**iology **O**pen **S**oftware **S**uite) Programmpakets erstellt [130]. Homologe Proteine wurden mit dem BLAST-Algorithmus in der nicht-redundanten Proteindatenbank von GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) gesucht [131, 132]. Mögliche Transit-Peptide zum Chloroplasten-Import wurden mit Chloro-P [133], IP-Sort [134] und PCLR [135] prognostiziert. Mögliche Restriktionsstellen einer Signal Peptidase [EC 3.4.21.899] wurden mit SignalP kalkuliert [136]. Zur virtuellen Klonierung, dem Auffinden von Restriktionsschnittstellen und der virtuellen Ligation wurde die Software Clone-Manager v.5.02 (Sci Ed Central, USA) verwendet.

### 2.6.1 Phylogenetische Analysen

Homologe Sequenzen wurden wie unter 2.6 beschrieben abgerufen und mit Clustal W aligniert [137]. Protein LogDet-Distanzen wurden mit dem Programm LDDist berechnet [138] und in planare Split-Graphen überschrieben [139]. Die graphische Darstellung erfolgte mit der Software Splittree V.4 [139].

## Ergebnisse

### 3 **Reinigung der ATP abhängigen Phosphofruktokinase aus *Spinacia oleracea***

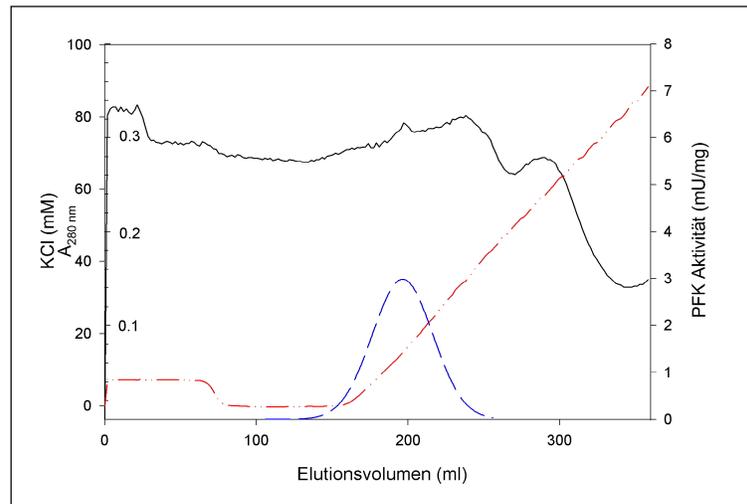
Zur Bestimmung der Proteinsequenz der ATP-abhängigen Phosphofruktokinase wurde aus *Spinacia oleracea* (cv. Polka) das Protein isoliert. Zur selektiven Charakterisierung wurde eines der PFK-Isoenzyme fokussiert [56]. Aus bisher veröffentlichten Protokollen [25,49,54-55] wurde ein reproduzierbares Reinigungsverfahren bis zur abschließenden Homogenität etabliert. Die nacheinander ablaufenden Reinigungsschritte sind in ihren Ergebnissen ab Abschnitt 3.1.1 dokumentiert. Anhand einer Trennung der Isoenzyme sollte eine Differenzierung in cytosolisch lokalisierte, und plastidär lokalisierte PFK erreicht werden. Zusätzliche bioinformatische Analysen, sowie biochemische Untersuchungen sollten das Protein genauer charakterisieren als auch klassifizieren.

#### 3.1 **Rohextrakt aus *Spinacia oleracea***

Zur Rohextraktgewinnung von ATP-PFK wurde 1300g Blattmaterial aus 5-8 Wochen altem Spinat verwendet (siehe Abschnitt 2.4.10.1). Im Extrakt ließ sich eine Gesamtaktivität von 60 U detektieren. Die spezifische Aktivität lag bei 2 mU/mg.

##### 3.1.1 **Reinigung der ATP-PFK mittels DEAE-Fractogel**

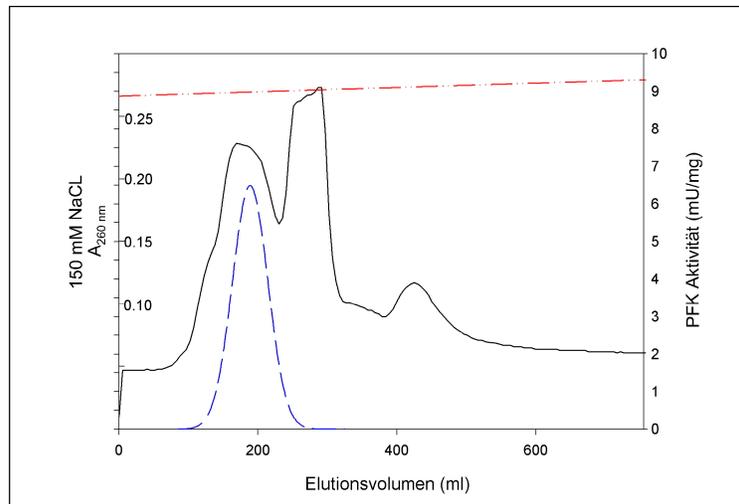
Eine DEAE-Fractogel-Anionentauscher-Säule wurde mit adäquater Menge an Proteinrohextrakt beladen (siehe Abschnitt 2.4.3.1). In einem kontinuierlichen Salzgradienten von 0-900 mM KCl wurde ATP-PFK Aktivität im Bereich von 0-300 mM KCl detektiert. (Abbildung 04). Die Auftrennung der PFK-Isoenzyme konnte durch diese Reinigung nicht erreicht werden. Die Totalaktivität reduzierte sich auf 520 mU mit einer einhergehenden Reduktion des Gesamtproteins um den Faktor 150. Die spezifische Aktivität ließ sich nur geringfügig erhöhen, wobei ein Reinigungsfaktor von 1,3 erreicht wurde. Die Probe wurde zur Trennung durch Gelfiltration (siehe Abschnitt 3.1.2) konzentriert.



**Abb. 04:** Elutionsprofil der DEAE Fractogel-Säule. Die Elution erfolgte in einem Gradienten von 0-900 mM KCl in 50 mM Tris pH 7.8; 2 mM DTT; 5 mM MgOAc; 1 mM ATP; 1 mM Iodoacetat und 10% Glycerin (v/v). Fraktionen wurden zu je 2,5 ml gesammelt. --- =ATP-PFK Aktivität; -.-.- KCl Gradient; — Protein Konzentration

### 3.1.2 Gelfiltration als chromatographischer Reinigungsschritt der ATP-PFK

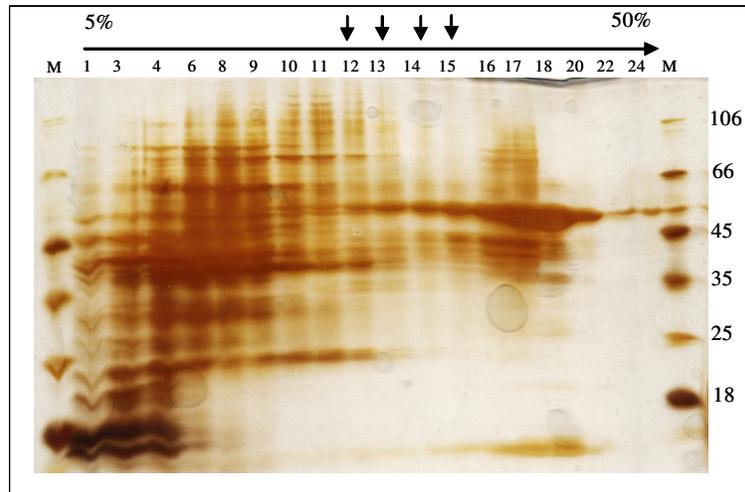
Die vereinigten und konzentrierten ATP-PFK Fraktionen aus Abschnitt 2.4.2 wurden weiterführend über eine 560 ml Sephacryl S-400 HR Säule (siehe Abschnitt 2.4.3.2.1) getrennt. In diesem Reinigungsschritt wurden die Proteine anhand ihrer Größe isoliert. ATP-PFK-Aktivität konnte nach wenigen Minuten der Reinigung detektiert werden. Dabei ließ sich ein großer Teil von verunreinigendem Protein aus der Probe entfernen (siehe Abbildung 05). Die abschließend gemessene spezifische Aktivität betrug 4,2 mU/mg, was einer Verdopplung gegenüber der im Rohextrakt (siehe Abschnitt 3.1.) gemessenen Aktivität entspricht. Eine Trennung der cytosolischen und plastidären Isoform konnte nicht erreicht werden. Die Probe wurde abschließend für die Trennung in einem Saccharose-Gradienten (siehe Abschnitt 3.1.3) umpuffert und konzentriert.



**Abb. 05:** Elutionsprofil der Sephacryl S-400 HR-Säule. Die Elution erfolgte in 50 mM Tris pH 7.8; 2 mM DTT; 5 mM MgOAc, 1 mM Adenosin 5'-( $\beta,\gamma$ -imido) Triphosphat teralithium Salzhydrat; 1 mM Iodoacetat; 10% Glycerin (v/v) und 150 mM NaCl. Fraktioniert wurde zu 2% des Bettvolumens der Säule. --- =ATP-PFK Aktivität; -.-.- KCl Gradient; — Protein Konzentration

### 3.1.3 Segregation der Proteine im Saccharose-Gradienten

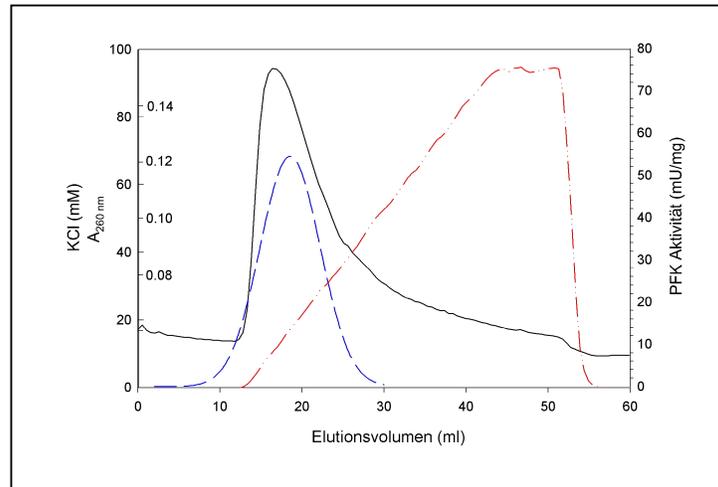
Nach der Trennung über Gelfiltration wurde die konzentrierte und umgepufferte Probe der vereinigten aktiven Fraktionen aus Abschnitt 3.1.2 auf einen kontinuierlichen Saccharose-Gradienten von 5-50 % Saccharose geladen. Nach einer 19,5 Stunden dauernden Ultrazentrifugation (siehe Abschnitt 2.4.4.) wurde der Gradient zu 500  $\mu$ l Portionen fraktioniert. Auf ein 12 %iges SDS-Gel wurden exemplarisch Fraktionen mit 2-3  $\mu$ g Proteingehalt aufgetragen (siehe Abbildung 06). In den Fraktionen 12-15 ließ sich ATP-PFK detektieren worauf diese Fraktionen zur Weiterverarbeitung vereinigt und konzentriert wurden. Die Fraktionen 1-11 ergaben ein weites Bandenspektrum ober- und unterhalb von 50 kDa. Diese Proteine konnten in den Fraktionen 12-15 weitestgehend von der zu isolierenden PFK getrennt werden. Die Fraktionen 16-20 zeigten eine deutliche Akkumulation im Bereich von 50 kDa. Diese Anhäufung wurde teilweise aus den aktiven Fraktionen isoliert. Die spezifische Aktivität konnte auf 9,34 mU/mg gesteigert werden, wobei die Gesamtproteinmenge um etwa den Faktor vier reduziert wurde. Die Probe wurde zur beschriebenen Auftrennung aus Abschnitt 3.1.4 konzentriert und umgepuffert.



**Abb. 06:** SDS-Polyacrylamidgel exemplarischer Fraktionen eines kontinuierlichen Saccharosegradienten (5-50%). Jede Spur enthält 2-3  $\mu\text{g}$  der entsprechenden Fraktion und wurde anschließend Silber angefärbt (siehe Abschnitt 2.4.8.2). Die durch Pfeile gekennzeichneten Spuren enthielten ATP-PFK aktive Fraktionen. M: Proteingrößenstandard.

### 3.1.4 Selektive Affinitäts-Chromatographie mit einer „Reactive Red“ Farbstoffsäule

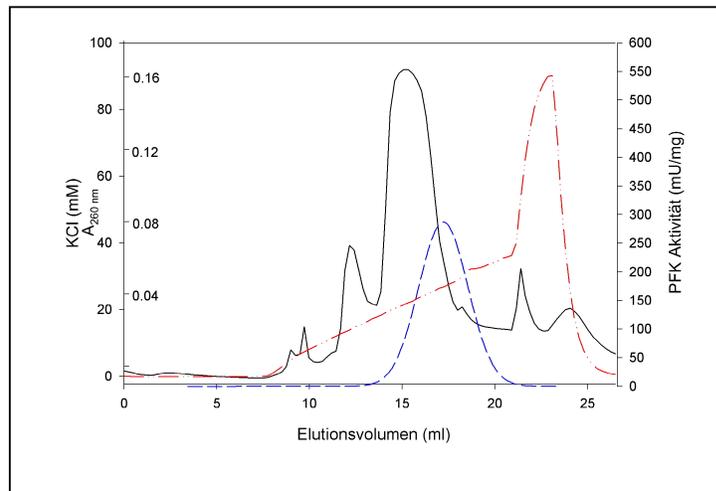
Die vereinigten und konzentrierten Fraktionen (siehe Abschnitt 2.4.2) wurden weiterführend über eine „Reactive Red“ Farbstoffsäule getrennt. Die Probe wurde in einem 30 ml Gradienten von 0-1 M KCl eluiert. Die Aktivität der ATP abhängigen PFK konnte bei 0-250 mM KCl detektiert werden. In diesem Bereich des Salzgradienten eluierte auch der Hauptanteil an Proteinen in einem Peak, wobei die Proteinkonzentration im weiteren Gradienten von 250-1000 mM KCl sigmoid abfällt (siehe Abbildung 07). Auf einem Silbergefärbten SDS-Gel (siehe Abbildung 10, Abschnitt 3.2) wird deutlich, dass ober- und unterhalb von 50 kDa über das Trennverfahren Proteinbanden attenuiert bis vollständig entfernt wurden. Die Totalaktivität der Probe blieb konstant; die spezifische Aktivität steigerte sich um das fünffache. Die Gesamtproteinkonzentration verringerte sich von 22,8 auf 4,6 mg. Über diesen Trennschritt ließ sich wiederholt keine Auftrennung der ATP-PFK Isoenzyme erreichen. Es folgte eine Konzentration sowie Umpufferung der Probe zur anschließenden Chromatographie über Anionentauscher.



**Abb. 07:** Elutionsprofil der Reactive Red Säule. Die Elution erfolgte in 50 mM Tris, 2 mM DTT, 5 mM MgOAc, 1 mM ATP, 10% Glycerin (v/v), 1 mM Iodoacetat pH 7,8 und 0-1M KCl. Fraktioniert wurde zu je 0,5 ml. --- =ATP-PFK Aktivität; -.-.- KCl Gradient; — Protein Konzentration.

### 3.1.5 Mono-Q-Ionenausterschromatographie

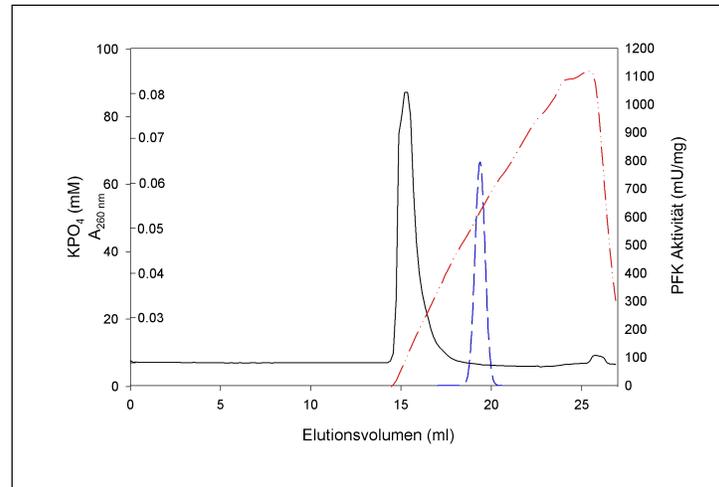
Die aktiven, vereinigten und konzentrierten Fraktionen wurden anschließend über eine vom Hersteller präparierte 1 ml Mono-Q-Anionenausterschäule (siehe Abschnitt 2.1.2.) getrennt. Ein kontinuierlicher Salzgradient von 0-400 mM KCl diente zur Elution der Proteine. Innerhalb des Gradienten ließ sich eine Auftrennung in drei Hauptpeaks erkennen, in welchem die gesamten Proteine eluierten (siehe Abbildung 08). Beim dritten und höchsten Peak ließ sich kurz vor dem kompletten Abfall die gesamte Enzymaktivität der ATP-PFK detektieren. ATP-PFK eluierte bei einer Salzkonzentration von 200-370 mM KCl. Bei einer abschließenden Erhöhung des Gradienten auf 1 M KCl ließen sich weitere unspezifische Proteine aus der Suspension entfernen. Die Totalaktivität verringerte sich von 214 auf 166 mU, wobei die spezifische Aktivität sich um den Faktor 6 erhöhen ließ. Über dieses chromatographische Verfahren ließ sich 40 % an unspezifischem Protein von der zu reinigenden ATP-PFK trennen. Es ist erneut keine Unterteilung der Isoenzyme möglich. Sämtliche ATP-PFK eluierte in einem Peak. Für die folgende Weiterverarbeitung wurden die aktiven Fraktionen vereinigt, konzentriert, und abschließend in 20 mM Tris, 5 mM MgAc, 2 mM DTT, 10 mM KPO<sub>4</sub>, pH 7,2 umgepuffert.



**Abb. 08:** Elutionsprofil der Mono-Q-Säule. Die Elution erfolgte in 20 mM Tris, 2 mM DTT, 5 mM MgOAc, 10% Glycerin (v/v), pH 7,8 und 0–400 mM KCl. Fraktioniert wurde in Fraktionen von je 0,37 ml. --- =ATP-PFK Aktivität; -.-.- KCl Gradient; — Protein Konzentration.

### 3.1.6 Präparative Fraktionierung über Hydroxylapatit

Die aus 3.1.5 hervorgegangenen aktiven PFK-Fractionen wurden abschließend über eine Bio-Gel HAT-Säule (siehe Abschnitt 2.4.3.5) gereinigt. Als Trennmittel wurde eine kristalline Form von Kaliumphosphat verwendet, welche im Zusammenhang mit einem kontinuierlichem Anstieg der Phosphat-Konzentration eine selektive Elution der zu trennenden Proteine ermöglichte. Der Hauptteil der Proteine eluierte nach 15 ml in einem Gesamtbereich von 2 ml, verbunden mit einem direkten Anstieg der Salzkonzentration (siehe Abbildung 09). Nach etwa 18 ml ließ sich die Aktivität der PFK, dokumentiert in einem scharfen Peak, messen. Ausgehend von 30 g Gesamtprotein (siehe Abschnitt 3.1) ließ sich nach dieser Trennung der Proteingehalt der aktiven Fraktionen mit 21  $\mu\text{g}$  bestimmen. Die Elution erfolgte in vier Fraktionen bei 250 mM  $\text{KPO}_4$ . Die spezifische Aktivität aller aktiven Fraktionen lag im Durchschnitt bei 619 mU/mg, wobei eine einzelne Fraktion fast 800 mU/mg erreichte. Die Gesamtaktivität der Probe verringerte sich gegenüber der Reinigung mittels Mono-Q um den Faktor 13 (siehe Abschnitt 3.1.5). Insgesamt wurde die pflanzliche Phosphofruktokinase um den Faktor 309 gereinigt (siehe Tabelle 08). Es ließ sich nach diesem finalen Reinigungsschritt keinerlei Aktivität mit  $\text{PP}_i$  als Kosubstrat messen (siehe Abschnitt 2.4.5).



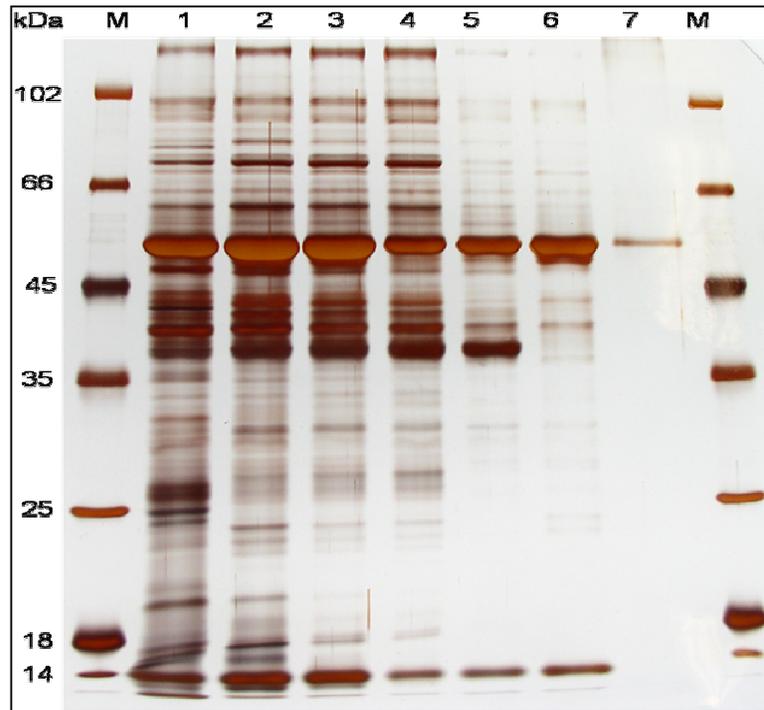
**Abb. 09:** Elutionsprofil der Hydroxylapatit-Säule. Die Elution erfolgte in 20 mM Tris; 2 mM DTT; 5 mM MgOAc; pH 7,2 und 0-500 mM  $\text{KPO}_4$ . Fraktioniert wurde in Volumen von je 0,3 ml. --- =ATP-PFK Aktivität; -.-.-  $\text{KPO}_4$  Gradient; — Protein Konzentration.

**Tabelle 08:** Zusammenfassung der ATP-PFK Reinigung aus Spinat

| Reinigungsschritt   | Totalaktivität<br>(mU) | Proteinspezifische<br>(mg) | Reinigungs-<br>Aktivität<br>(mU/mg) | Reinigungs-<br>fortschritt |
|---------------------|------------------------|----------------------------|-------------------------------------|----------------------------|
| Rohextrakt          | 60000                  | 30.000                     | 2                                   | -                          |
| DEAE-Sepharose      | 520                    | 200                        | 2.6                                 | 1.3                        |
| Sephacryl S-400     | 420                    | 100                        | 4.2                                 | 2.1                        |
| Saccharose-Gradient | 214                    | 22.8                       | 9.4                                 | 4.7                        |
| Reactive red        | 214                    | 4.64                       | 46                                  | 23                         |
| Mono-Q              | 166                    | 0.63                       | 264                                 | 132                        |
| Hydroxylapatit      | 13                     | 0.021                      | 619                                 | 309                        |

## 3.2

## Dokumentation des Reinigungserfolges mittels SDS-Gel



**Abb. 10:** Mit Silber angefärbtes zwölf %iges SDS-Gel der aufgetragenen Proben der ATP-PFK-Reinigung aus Spinat. Spur 1: Rohextrakt, Spur 2: DEAE Sepharose-Eluat, Spur 3: Sephacryl S-400 HR-Eluat, Spur 4: Proteinkonzentrat nach Saccharose-Gradienten, Spur 5: Reactive Red-Eluat, Spur 6: Mono-Q-Eluat, Spur 7: Hydroxylapatit-Eluat, M: Molekularer Proteinstandard mit Größenangaben [kDa].

Zur Dokumentation der Reinigung wurden nach jedem Trennschritt Proben der aktiven Fraktionen zurückgehalten, um sie auf einem 12 %igem SDS-Gel (siehe Abschnitt 2.4.7) zu analysieren. Von jeder Probe (inklusive des Rohextraktes aus Abschnitt 3.1) wurden 5  $\mu\text{g}$  Protein auf das Gel aufgetragen. Der Proteingehalt der Hydroxylapatitprobe (siehe Abschnitt 3.1.6) lag etwa bei 1  $\mu\text{g}$ . Es zeigt sich, dass sich nach den ersten drei Trennungsschritten der Reinigungserfolg auf dem SDS-Gel optisch kaum bemerkbar macht (siehe Abbildung 10). Die Prominenz von Banden unterhalb von 35 kDa reduziert sich, wobei dieses nicht für die Bande bei 14 kDa zutrifft. Nach Reinigung über Reactive Red (siehe Abschnitt 3.1.4) reduziert sich die Bandenanzahl auf zwei markante Banden (52 kDa, 38 kDa) und einige sehr schwache Banden zwischen 35 kDa und 102 kDa. Nach der Reinigung über Mono-Q (siehe Abschnitt 3.1.5) verliert sich die stark angefärbte Bande bei 38 kDa. Bis zu diesem Reinigungsschritt sind durchgehend zwei stark akkumulierte Banden bei 52 kDa und 14 kDa zu detektieren. Erst nach dem finalen Reinigungsschritt (siehe Abschnitt 3.1.6) verliert sich

die Bande bei 14 kDa. Die Intensität der 52 kDa Bande nimmt stark ab. Die gereinigte ATP-PFK zeigt eine molekulare Masse von ~ 52 kDa, wobei sich hier noch nicht feststellen ließ, ob es sich um das native Enzym oder die Untereinheiten-Größe handelt.

### 3.3 Mikrosequenzierung der ATP-abhängigen Phosphofruktokinase

Die Probe wurde wie in Abschnitt 2.4.6.1 tryptisch gespalten und massenspektroskopisch analysiert (siehe Abschnitt 2.4.6.2). Es ließen sich insgesamt neun Peptidfragmente ermitteln (siehe Tabelle 09).

**Tabelle 09:** Massenspektroskopisch detektierte Peptidfragmente der Phosphofruktokinase

| Peptid Nr.: | Aminosäuresequenz: | Größe (Da): |
|-------------|--------------------|-------------|
| 1           | NLEGGSLGTSR        | 1925        |
| 2           | DLSGNAVLGDIGVHFK   | 1642        |
| 3           | GGASTSDIVDSIEAK    | 1449        |
| 4           | TFGFDTAVEAAQR      | 1412        |
| 5           | TIDNDILLMDK        | 1333        |
| 6           | YIDPTYMVR          | 1200        |
| 7           | QIFFTLER           | 1053        |
| 8           | EIYFEPTK           | 1026        |
| 9           | NVTPAEGPEDR        | 1487        |

### 3.4 Identifikation eines Phosphofruktokinase Orthologes

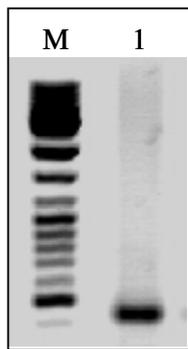
Die in 3.3 aufgeführten Peptidfragmente eins bis sechs ließen sich als eindeutige Orthologe zu  $PP_i$ -abhängigen Fruktose-6-phosphat-1-phosphotransferase oder Phosphofruktokinase ähnlichen Proteinen in einer nicht redundanten Protein-Datenbank anhand des BLAST-Algorithmus identifizieren [132]. Die Protein-Datenbank wurde auf die Gattung der *Viridiplantae* eingegrenzt [140]. Die Peptide sieben bis neun ergaben keinen primären Treffer für eine Phosphofruktokinase. Die nachfolgenden Treffer in den Trefferlisten waren aber hauptsächlich Phosphofruktokinase oder  $PP_i$ -PFK ähnliche Homologe (siehe Tabelle 10).

**Tabelle 10:** Übereinstimmungen der Peptidfragmente mit bekannten Orthologen aus der Genbank des NCBI (siehe Abschnitt 2.6) nach Protein-BLAST-Suche.

| Peptid Nr.: | Bezeichnung:   | Zugangsnummer | Punkte | Erwartungswert |
|-------------|--|---------------|--------|----------------|
| 1           | mögliche Pyrophosphat-Fruktose-6-phosphat-1-phosphotransferase aus <i>Oryza sativa</i> . | XP_482597     | 26,5   | 9,3            |
| 2           | mögliche Pyrophosphat-Fruktose-6-phosphat-1-phosphotransferase aus <i>Oryza sativa</i> . | NP_921398     | 29,5   | 1,3            |
| 3           | siehe Peptid 1   | XP_482597     | 35     | 0,025          |
| 4           | Phosphofruktokinase ähnliches Protein aus <i>Oryza sativa</i> .                          | ABB47570      | 43,9   | $5e^{-05}$     |
| 5           | siehe Peptid 1   | XP_482597     | 38,4   | 0,003          |
| 6           | siehe Peptid 4   | ABB47570      | 35,8   | 0,015          |
| 7           | mögliches Protein  | CAB79355      | 25,7   | 14             |
| 8           | t-snare aus <i>Medicago truncatula</i>   | ABE83461      | 22,7   | 117            |
| 9           | Mögliches Embryogen assoziiertes Protein aus <i>Oryza sativa</i> .                       | XP_475282     | 25,2   | 24             |

### 3.5 Erste Amplifikation und Subklonierung der PFK-spezifischen DNA-Sonde

Auf Basis der in 3.4 aufgeführten, orthologen Proteinsequenzen ließ sich eine eindeutige Reihenfolge der in Abschnitt 3.3 detektierten Peptidfragmente bestimmen. Zur Herstellung



**Abb.11:** Amplifikat der cDNA-Sonde. M= Größenstandard

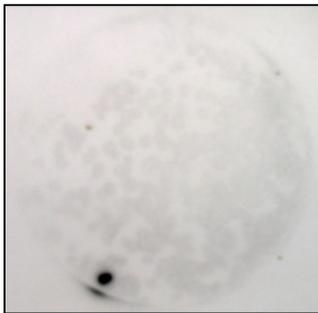
einer komplementären cDNA-Sonde wurden degenerierte Oligonukleotide aus den Peptidfragmenten fünf und sechs erstellt. Die Degeneration der Primer wurde durch das Benutzen einer „Kodon-Gebrauchs-Tabelle“ [141] und dem toleriertem „Mismatch“ im 3'-Bereich eingeschränkt. Anhand der Primer „PFK 2 hin“ und „PFK 2 her“ (siehe Abschnitt 2.1.9.1) wurde eine 462 bp große DNA Sequenz amplifiziert (siehe Abschnitt 2.5.11 und Abb. 11) und anschließend isoliert (siehe Abschnitt 2.1.7). Das Fragment wurde in den Vektor pBluescript SK(+) subkloniert und in den *E.coli* Stamm XL1-Blue MRF' transformiert (siehe Abschnitt 2.5.9.1). Aus acht gewählten Klonen erwies sich einer als positiv (siehe

Abbildung 12). Nach einer DNA-Sequenzierung (siehe Abschnitt 2.5.7.7) konnte die Sequenz als Ortholog zu einer PP<sub>i</sub>-Fruktose-6-phosphat-1-phosphotransferase aus *Arabidopsis thaliana*

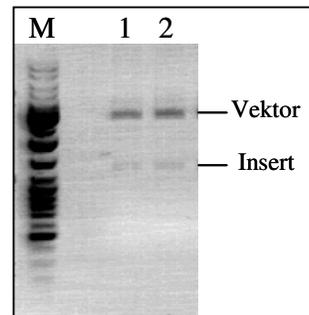
(AAO64936) *via* BLAST-Suche [131] identifiziert werden. Das Fragment wurde radiokativ markiert (siehe Abschnitt 2.5.8.2.1) und als Sonde zur Hybridisierung in einer cDNA-Bibliothek eingesetzt.

### 3.6 Selektion und Isolierung der PFK-Sequenz einer generierten cDNA-Bibliothek aus *Spinaca oleracea*

Mittels homologer Hybridisierung konnte in Zusammenarbeit mit Frau B. Delvos in 40 x 200 pfu einer zuvor erstellten cDNA-Bank (siehe Abschnitt 2.5.8) ein positiver Klon identifiziert werden (siehe Abb. 12), welcher folgend nach Herstellerangaben *in vivo* exzisiert wurde [183]. Zur entsprechenden Plasmid-Isolierung wurde das Fragment mit *Eco*RI gespalten und auf einem Agarosegel pherographiert. Die Restriktion liefert ein 3,5 kb großes, lineares Vektor-Fragment und ein Insert von etwa 1500 bp (siehe Abb. 13).



**Abb. 12:** positives Signal in der *Spinacia oleracea* cDNA-Bibliothek nach Hybridisierung mit der markierten Sonde

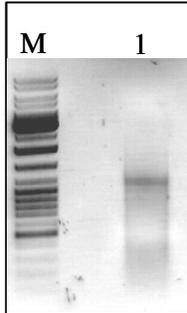


**Abb. 13:** Restriktion von zwei ausgeschleusten Plasmiden mit *Eco*RI. M= Größenstandard (2.1.8) 1; 2= pBluescript SK(-) + Insertion

Nach Sequenzierung des Insertionsfragments konnte durch eine BLASTP-Suche ein eindeutiger Treffer zu einer PP<sub>i</sub>-PFK aus *Arabidopsis thaliana* determiniert werden. Nach Entfernung der Poly(T)-Region ergab sich ein Insert von 1253 bp. Die Sequenz kodiert für ein Peptid von 290 Aminosäuren. Dieser cDNA-Klon war jedoch unvollständig, da kein Startkodon im 5'-Bereich gefunden wurde.

### 3.7 Vervollständigung des primären *PFK*-Klons und Abgleich mit den bekannten Peptidfragmenten

Zur Komplementierung des aus Abschnitt 3.6 detektierten Gens wurde zusätzlich eine 5'-RACE-PCR (siehe Abschnitt 2.5.10.1) durchgeführt. Basierend auf dem in Abschnitt 3.2



**Abb. 14:** Produkt der 5'-RACE-PCR  
M= Größenstandard (2.1.8) 1; 2= pBluescript SK(-) + Insertion

gereinigten Protein mit einer Größe von 52 kDa konnte ein vollständiger Leserahmen mit mindestens 1500 bp erwartet werden. Es wurde ein Primer, welcher an Position 195 des cDNA-Klons bindet, generiert (siehe Abschnitt 2.1.9). Inklusive des homologen Bereiches der bekannten Sequenz würde ein PCR-Produkt von minimal 800-900 bp prognostiziert, um den vollständigen Leserahmen des Gens zu ergänzen.

Die PCR lieferte ein Amplifikat von 1031 bp (Abb.14), welche die aus Abschnitt 3.6 bekannte Sequenz mit einem 5'-Start-Kodon komplementierte. Die vollständige Sequenz besteht aus 1906 bp mit einem offenen Leserahmen von 499 Aminosäuren. Diese Sequenzlänge entspricht annähernd den in der GenBank identifizierten homologen  $PP_1$ -*PFK*-Sequenzen. Ein Abgleich mit den aus Abschnitt 3.3 bekannten Peptidfragmenten erbrachte nur eine Übereinstimmung mit dem Fragment fünf. Die Peptidfragmente vier und sechs lassen sich nur unvollständig an die Proteinsequenz alignieren (Abb. 15). Die Sequenz wird im folgendem mit *SoPFK2* benannt und wurde bei der Genbank des NCBI unter der Zugangsnummer DQ437576 am 24. März 2006 vermerkt ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)).

```

1 tactaaaaaggttgctaaagttrataatggagcccaagattggtactggagaaggcggg 60
1 M E P K I V T G E G G 12

61 tatgctcttgatgatggttcctcacttctccgattatctcactaatctccctacgtatccg 120
13 Y A L D D V P H F S D Y L T N L P T Y P 32

121 aatcccttacagaccaatccttcataatcagtgaccaagcaatattttgtagattttgat 180
33 N P L Q T N P S Y S V T K Q Y F V D F D 52

181 gacacggttggtcaaaaggctgttcaacataaagatggtccaaggggtatacatttccga 240
53 D T V V Q K A V Q H K D G P R G I H F R 72

241 cgacaagggtccccggcaaaagggtgtattttaagccagatgaagttacagcatgtattggt 300
73 R Q G P R Q K V Y F K P D E V T A C I V 92

301 acatgtggagggtctatgtccccggccttaacactgtgatcagagagttagtttggccttg 360
93 T C G G L C P G L N T V I R E L V C G L 112

361 gattacatgtatgggtggttaaaaatatcctgggaattgaatgtggctataaagggttctat 420
113 D Y M Y G V K N I L G I E C G Y K G F Y 132

```

421 gctcggaaatacactccctttaacaccaaagactggtgacagcatccacaaacgaggtgga 480  
133 **A R N T L P L T P K T V D S I H K R G G** 152

481 actatcctcggtacatctagaggtggatgtcacttccaaaattgtggacagcattcag 540  
153 **T I L G T S R G G Y V T S K I V D S I Q** 172

541 gacaggggaattaatcaggtgtacataattggaggagatggaactcaaaagggtgcwtca 600  
173 **D R G I N Q V Y I I G G D G T Q K G A S** 192

601 gtaatatatcaggaagtaagaaagcgaggtcttaaggtgacagttgtgggaattccaaaa 660  
193 **V I Y Q E V R K R G L K V A V V G I P K** 212

661 acaattgacaatgacattccgatcatcgacaaatcttttgggtttgacactgctgtggag 720  
213 **T I D N D I P I I D K S F G F D T A V E** 232  
Peptid 5 Peptid 4

721 gaagcacaacgtgtaggaatgctgcacacactgaagctgaaagtggtgaaaatgggatt 780  
233 **E A Q R V G N A A H T E A E S V E N G I** 252

781 ggtcttgtcaagttgatgggtcgtgacagcggattcattgcaatggttgcaaccctggct 840  
253 **G L V K L M G R D S G F I A M F A T L A** 272

841 agccgagatggtgactggtgcttgatcccggaatcacccttctatctcgaaggggaaggt 900  
273 **S R D V D C C L I P E S P F Y L E G E G** 292

901 gggctctatgagttcattgggagacgactcagagagaacggccacatggttatagtcata 960  
293 **G L Y E F I G R R L R E N G H M V I V I** 312

961 gctgaaggagcaggtgagaagtgagaagaaagagacccttctggaaataaggcttttaa 1020  
313 **A E G A G E K V E E R D P S G N K A F K** 332

1021 gatgttggctctctggctgtctttcatgatcaaggaacactttgctaaaacaaaattgaac 1080  
333 **D V G L W L S F M I K E H F A K T K L N** 352

1081 attactcttaagtacatagatcctacatatatgatccgagctggtcctgctaacgcatca 1140  
353 **I T L K Y I D P T Y M I R A V P A N A S** 372  
Peptid 6

1141 gacaacgtttactgtacgattcttgctcaaagcgcgattcatggggctatggcgggttac 1200  
373 **D N V Y C T I L A Q S A I H G A M A G Y** 392

1201 acaggttgactgtcgggccagtcaacggcagacaatgctacattcctttctatcgagta 1260  
393 **T G C T V G P V N G R Q C Y I P F Y R V** 412

1261 atcgagaaaccaaaacaaagttgtgataacagatagaatgtgggctaggcttttgtcttca 1320  
413 **I E K P N K V V I T D R M W A R L L S S** 432

1321 accaaccagcctagttttatgcatcctcccaagggtgccattattgaaggaaagcaggac 1380  
433 **T N Q P S F M H P P K G A I I E G K Q D** 452

1381 gaggtagtgctatcggaatctgctgctgaagaatcaaatgagaacgaaaagtgtacaccg 1440  
453 **E V V L S E S A A E E S N E N E K C T P** 472

1441 acatcaacctcgttatcaatccatgataatcatggttgatgatcagttatcgatgagcaat 1500  
473 **T S T S L S I H D N H V D D Q Y S M S N** 492

1501 ggatcttctgaactgctgctaaagtaaaaacaggtttcaacttttccgacattatgtaaa 1560  
493 **G S S E L L L K \***

1561 cttccgctgttttggaggacagaggagatgaataataatcagccaccttggattcgtcct 1620

1621 acgttagtgctcgtctaatagttagggaagataccacaaaattggttattaaggaaattggt 1680

```

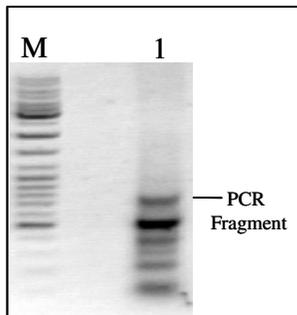
1681 gatttaacaactagtggttgtgcctttttgtaaatTTTgaagagtgaattgatcaatgta 1740
1741 ctaatgTTTggaatatTTTgtgtgccaaatgtatTTTgtgTTTtagttgtagaaagctcc 1800
1801 aagTTTgtgcatcatcTTTgtatgaggtcaagagtacgaacttcatgtatacccaaaaaca 1860
1861 aggtggaaattgacaaatacctagtggttagtattgTTTTTtaaaa 1906

```

**Abb. 15:** Nukleotidsequenz der *SoPFK2*, sowie der offene Leserahmen der kodierenden Proteinsequenz (dunkel unterlegt). Die übereinstimmenden Peptidfragmente wurden unterstrichen. Stop-Kodons sind mit „\*“ beschrieben.

### 3.8 Identifikation der zu den isolierten Peptiden übereinstimmenden *PFK*-Sequenz aus *Spinacia oleracea*

Da aus den Ergebnissen in Abschnitt 3.7 kein zu allen Peptidfragmenten korrespondierender Klon hervorging, wurden neue Oligonukleotide auf Basis der Fragmente zwei und acht generiert. Es folgte eine erneute PCR, wodurch eine Teilsequenz der möglichen *PFK* amplifiziert werden sollte. Unter Verwendung der Primer „PFK1 hin“ und „PFK 2 her“ wurde neben weiteren kleineren und unspezifischen Fragmenten ein Produkt von 750 bp



**Abb. 16:** PCR eines 750 bp homologen *PFK*-Fragments. M= Größenstandard (2.1.8) 1= PCR-Amplifikat.

amplifiziert, und analog zur Vorgehensweise in Abschnitt 3.5 präpariert (Abb. 16). Nach einer BLAST-Suche in der Genbank des NCBI (siehe Abschnitt 2.6) konnte die Sequenz als eindeutiges  $PP_i$ -*PFK*-Homolog identifiziert werden [132,140]. Das Fragment wurde ebenfalls radiokativ markiert (siehe Abschnitt 2.5.8.2.1) und als Sonde zur Hybridisierung in einer cDNA-Bibliothek verwendet. Bei einem dem in Abschnitt 3.6 analogem „Phagenscreen“ wurden 80 x 2000 pfu der cDNA-Bank ausgebracht, wobei nach mehrmaligem Wiederholen der Rasterung keine Hybridisierung

stattfand. Als Alternative zur Vervollständigung dieser *PFK*-Sequenz wurde das Verfahren der RACE-PCR gewählt (siehe Abschnitt 2.5.10.1). Dabei wurde die Sequenz in 5'-Richtung mit den Primern „RACE PFK1“ und „RACE PFK1 2ter“ und in 3'-Richtung mit dem Primer „PFK1 3' RACE“ in einer entsprechenden PCR vervollständigt. Beide Amplifikate hatten jeweils eine Größe von etwa 800 bp und wurden mit der Software „merger“ des Emboss-Programmpaketes (siehe Abschnitt 2.6) fusioniert. Die komplette DNA-Sequenz hat eine Länge von 1829 bp mit einem offenen Leserahmen von 1509 bp. Das Gen kodiert für ein 503 Aminosäuren langes Protein. Anhand der translatierten Proteinsequenz konnten acht der neun Aminosäuresequenzen zu 100 % aligniert werden. Das Peptidfragment neun stimmt bis auf eine Aminosäure mit dem virtuell translatierten Protein überein. Diese *PFK*-Sequenz wird im

Folgendem als *SoPFK1* bezeichnet (Abb. 17) und wurde ebenfalls bei der Genbank des NCBI<sup>2</sup> am 24. März 2006 unter der Zugangsnummer DQ437575 vermerkt.

<sup>2</sup>[www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)

```

1 ggaaatttgaggtttaagtggatgggaaggcatagtagtagaaagatcagattttccgct 60
1 M G R H S S R K I R F S A 20

61 tgtaggattgtcgcgagagaagttggatattgattttctctgatcctgattggaacagaa 120
21 C R I V A E K L D I D F S D P D W K T E 40

121 tatcagaaggatcttgagaatacatttaatttgccacatttgaaagatgtcttggatgtg 180
41 Y Q K D L E N T F N L P H L K D V L D V 60

181 aagccgaggcctagtagtactttttcccttatgcatagggatgggttcacggttggttgagaaat 240
61 K P R P S T F S L M H R D G S R W L R N 80

241 gaaaacgtcactgatagggccgagggaccagaggatcggaagaatgattatggtgacatt 300
81 E N V T D R A E G P E D R K N D Y V D I 100

301 gatgacaggacactgctgaaggtgatcaaatatgcttctccaacttctgcgggagccgag 360
101 D D R T L L K V I K Y A S P T S A G A E 120

361 tgcattgatcctaattgtacatgggtggagcaatgggtacatcgtgcagggtccacgtaag 420
121 C I D P N C T W V E Q W V H R A G P R K 140

421 gagatatactttgagcctacaaaggtgaaagcagcgatagtaacatgtggagggtctgt 480
141 E I Y F E P T K V K A A I V T C G G L C 160
      Peptid 8

481 cctggcttaatgatgtcataagacagatttttttacgctagaaagataggtgttcaa 540
161 P G L N D V I R Q I F F T L E R Y G V Q 180
      Peptid 7

541 aagatattcgggttagataggttccggtggattttttgaccctgaattacctatgaag 600
181 K I F G V R Y G F R G F F D P E L P M K 200

601 aagctttctcgcgagcacgtccaagacatcaatcttgaaggtggaagtcttttgggaaca 660
201 K L S R E H V Q D I N L E G G S L L G T 220
      Peptid 1

661 tctcgtggaggtgccagtagcagtgacattggtgatagtagatagaggcaaaggagatagat 720
221 S R G G A S T S D I V D S I E A K E I D 240
      Peptid 3

721 atggttttcattcttgggtgggaatggtacacatgctggagccaatgcgatacataatgag 780
241 M V F I L G G N G T H A G A N A I H N E 260

781 tgccgcaagaggaaaatgaaggtatcagttatatgtgtacccaaaactattgacaatgac 840
261 C R K R K M K V S V I C V P K T I D N D 280
      Peptid 5

841 atacttttgatggataaaacatttggatttgatacagccgtggaagcagcacaagagca 900
281 I L L M D K T F G F D T A V E A A Q R A 300
      Peptid 4

901 atcaattctgcatatattgaggcacacagtgcataccatgggattggccttgtgaaactg 960
301 I N S A Y I E A H S A Y H G I G L V K L 320

961 atgggaagaagtagtggtttcatagccatgcatgcatcactggcaagtggccaggttgat 1020
321 M G R S S G F I A M H A S L A S G Q V D 340

1021 atttgctaattcctgaggtcccttttacttttagatggaccaatgggtgtcctctcgcac 1080
341 I C L I P E V P F T L D G P N G V L S H 360

1081 ttggagcatcttatacggacaaaaggggcagcagtggtgtgtgttgctgaaggtgcagga 1140
361 L E H L I R T K G A A V V C V A E G A G 380

```

```

1141 caagaactggttgctgcaccagatttgaaagacttatctggaaatgctggttcttgagat 1200
381 Q E L L A A P D L K D L S G N A V L G D 400
                                     Peptid 2
1201 attggagtacattttaagaatcagataaaaagctatttcaacgagaagggtattcatgct 1260
401 I G V H F K N Q I K S Y F N E K G I H A 420

1261 gatgtcaatacattgacccccacctacatgggtccggtcagtacgtgcaaacgcttctgac 1320
421 D V K Y I D P T Y M V R S V R A N A S D 440
                                     Peptid 6
1321 gccatattgtgcactggttcttgccaaaatgctggttcacggtgcccttgcaggatatagc 1380
441 A I L C T V L G Q N A V H G A F A G Y S 460

1381 ggaatcacaatgggaatttgaataacgcattatgttttctccaatcacagaagtgatc 1440
461 G I T M G I C N T H Y V F L P I T E V I 480

1441 catactcctagagctgtgaatccgaacagtcgaatgtggcatagatgtcttacctccacg 1500
481 H T P R A V N P N S R M W H R C L T S T 500

1501 ggccaaccagacttctcaccaggaaattggtgatctttccgtcatacgcgataaaccta 1560
501 G Q P D F S P R N C *

1561 tactccatactttctattataggtgattttgatgaattctaattgtgccatggctgcaaga 1620

1621 atatcaatatcttttcgtaaaaacgagtataatgggtgcaaacgagtaggtaatacattga 1680

1681 ttttttgaggttattctactaggtttgaagaataatcttacttgatttaacctgcagtaa 1740

1741 ctgcagaaaattggttaatgtagtctccctttcaaggattattcttgtgtggatctggtc 1800

1801 tacaataataggccaacaatttattcca 1829

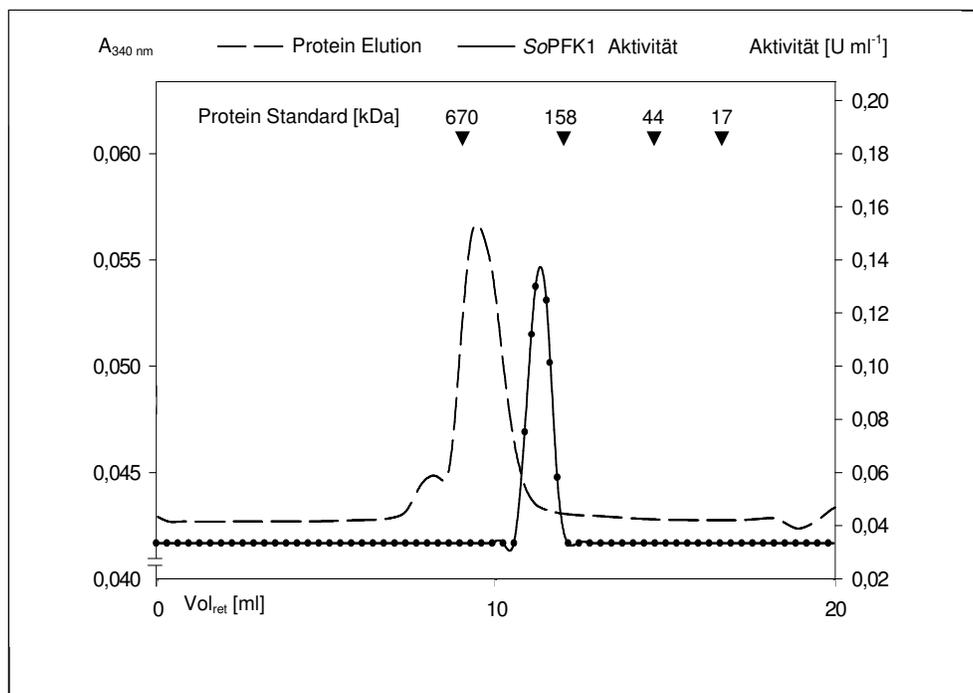
```

**Abb. 17:** Nukleotidsequenz der *SoPFK1*, sowie der offene Leserahmen der kodierenden Proteinsequenz (dunkel unterlegt). Die übereinstimmenden Peptidfragmente wurden unterstrichen. Stopp-Kodons sind mit \* beschrieben.

Eine *in silico* durchgeführte tryptische Restriktion der *SoPFK1* Protein-Sequenz mit der Software „digest“ des Emboss-Programmpaketes (siehe Abschnitt 2.6) ergab insgesamt 43 mögliche Peptidfragmente. Acht der in Abschnitt 3.3 beschriebenen Peptide lassen sich bei der *in silico* Restriktion ausmachen, wobei Peptid 1 N-terminal in der massenspektroskopischen Auswertung um sechs Aminosäuren verkürzt vorliegt. Der Verlust lässt sich durch eine unzureichende Auflösung bei der ESI-Q-TOF-MS/MS Analyse erklären, da die Peptide *in vitro* sowie *in silico* das gleiche Molekulargewicht von 1925 Da aufweisen. Das Peptid 9 findet sich bis auf eine Aminosäure in der translatierten Sequenz wieder. Dabei taucht dieses Peptid nicht in der virtuellen Restriktion direkt auf, sondern nur partiell in den Fragmenten NENVTDK und AEGPEDRK. Die detektierten Massen der anderen acht Fragmente stimmen mit den vorhergesagten Massen der Software „digest“ überein.

### 3.9 Natives Molekulargewicht der *So*PFK1

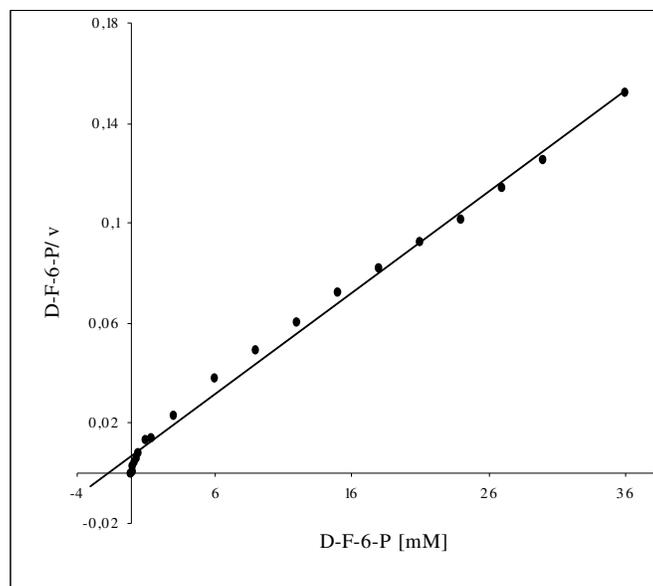
Zur Bestimmung der nativen molekularen Masse des *So*PFK1 Proteins wurde dieses wie in Abschnitt 2.4.3.1; 2.4.3.2.1 und 2.4.3.3 in dieser Reihenfolge partiell gereinigt. Anschließend wurde die Probe über eine Superdex 200 HR 10/20 Säule separiert (siehe Abschnitt 2.4.3.2.2).



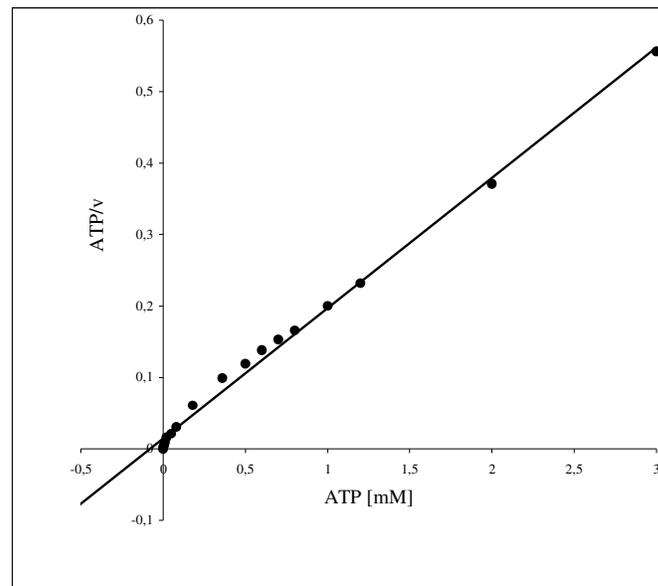
**Abb. 18:** Elutionsprofil nach Chromatographie mittels Gelfiltration. Standard-Proteine sind mit ihren Größen durch Pfeile markiert. Die unterbrochene Linie zeigt das Gesamtprotein; die durchgezogene Linie die spezifische Aktivität [ $U\text{ ml}^{-1}$ ].

### 3.10 Biochemische Parameter der Phosphofruktokinase

Zur biochemischen Affinitätsbestimmung der *So*PFK1 wurden  $K_m$ -Werte für D-Fru-6-P und für ATP erstellt. Für D-Fru-6-P wurden definierte Konzentrationen von 0-36 mM gewählt. Die Konzentration von ATP erstreckte sich im Bereich von 0-3 mM (siehe Abschnitt 2.4.5). Für D-Fru-6-P ließ sich ein  $K_m$ -Wert von 1,7 mM errechnen (Abb. 19). Der  $K_m$ -Wert für ATP lag bei 81  $\mu$ M (Abb. 20). Die Messungen wurden je dreimal wiederholt. Beide Werte wurden mit Hilfe von Hanes-Woolf-Plots kalkuliert [142].



**Abb. 19:** Graphische Auftragung des  $K_m$ -Werts für D-Fru-6-P der *So*PFK1. Die Kalkulation erfolgte mit Hanes-Wolf-Plots.



**Abb. 20:** Graphische Auftragung der  $K_m$ -Werte für ATP der *So*PFK1. Die Kalkulation erfolgte mit Hanes-Wolf-Plots.

### 3.11 *In silico* Kategorisierung der beiden Phosphofruktokinasen aus Spinat

Wie bereits in Abschnitt 1.4.1 beschrieben, wurde von Baptiste *et al.* (2003) eine Klassifizierung der Phosphofruktokinasen bezüglich ihrer Kosubstratspezifität anhand zweier konservierter Aminosäurepositionen publiziert [105]. Die Aminosäuren an Position 104 und 124 zeigen kaum Polymorphismus und können kohärent der ATP bzw.  $PP_i$  zugewiesen werden. Dabei bezieht sich die Nummerierung auf eine in *E. coli* durchgeführte Positionierung. Es ließ sich feststellen, dass sowohl *So*PFK1, als auch *So*PFK2 an den Positionen 104 ein konserviertes Glycin besitzen. An Position 124 haben beide Sequenzen ein konserviertes Lysin (siehe Abbildung 21). Diese Kombination klassifiziert beide PFK's in die Gruppe der atypischen Phosphofruktokinasen, welche ATP als Kosubstrat verwenden [105].

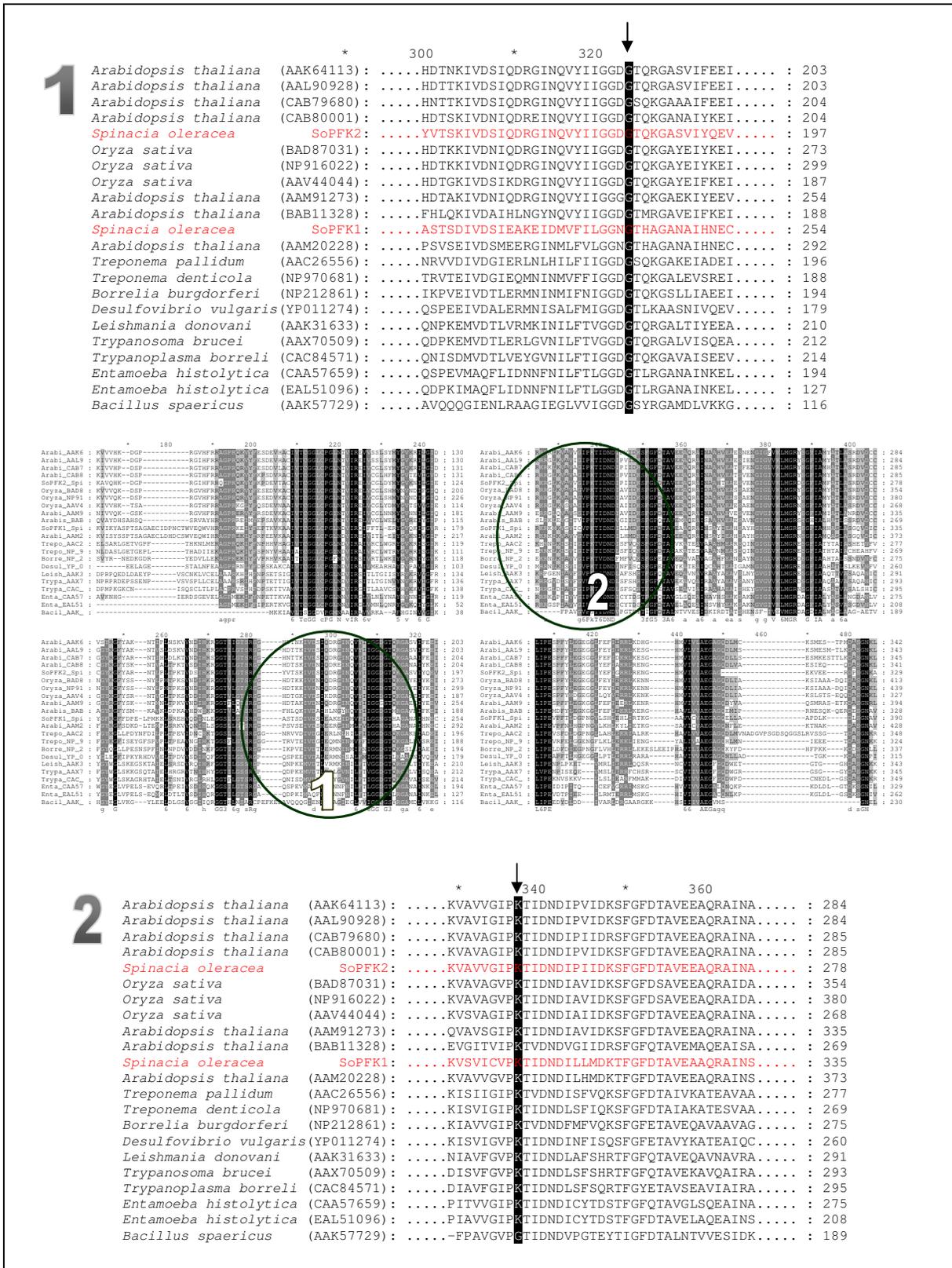


Abb. 21: Partielles Sequenzalignment ausgewählter Phosphofruktokinasesequenzen basierend auf dem von Bapteste *et al.* (2003) publizierten Neighbor joining Baum [105]. Ausschnitt eins und zwei heben Bereiche mit konservierten Aminosäuren (invertiert dargestellt) für die Kosubstratspezifität hervor. SoPFK1 und SoPFK2 sind rot unterlegt.

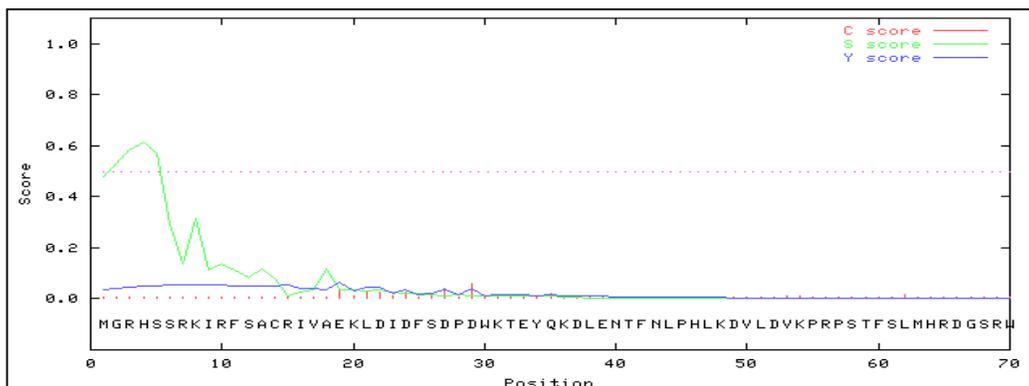
### 3.10.1 *In silico* Lokalisierung der Phosphofruktokinasen

Die von Chi *et al.* expliziter beschriebenen Domänen GGDG und PKTIDXD im Bereich der zuvor genannten Positionen ließen sich in beiden Sequenzen wiederfinden [25]. Beide Domänen sind in der Bindung des Kosubstrats involviert. Anhand eines Sequenzalignments der *So*PFK1- und *So*PFK2-Proteinsequenzen zeigte sich eine Identität von 45 % (Daten nicht gezeigt), wobei diese hauptsächlich in der zentralen Region beider Sequenzen auftritt. *So*PFK1 ist N-terminal 50 Aminosäuren länger, und C-terminal 57 Aminosäuren kürzer als *So*PFK2.

Zur Lokalisierung der isolierten PFK-Proteinsequenzen *So*PFK1 und *So*PFK2 wurde Analysesoftware zum Prognostizieren eines möglichen Transitpeptides verwendet (siehe Abschnitt 2.6). Die Vorhersagen von ChloroP [133], IPSort [134] und PCLR [135] prognostizieren unabhängig voneinander beide Proteine als nicht plastidär lokalisiert. Die entsprechend aus den jeweiligen Analyseprogrammen hervorgegangenen Werte, welche über die mögliche Existenz eines Transitpeptides entscheiden, sind in Tabelle 11 angegeben. Die Schwellenwerte, welche ein Transitpeptid interpretieren oder nicht, liegen bei ChloroP bei 0,5 [133], bei IPSort bei 0,64 [134] und für PCLR bei 0,42 [135].

**Tabelle 11:** Vorhersage von möglichen Transitpeptiden für *So*PFK1 und *So*PFK2

|                | ChloroP | IPSort | PCLR  |
|----------------|---------|--------|-------|
| <i>So</i> PFK1 | 0,434   | 0,166  | 0,021 |
| <i>So</i> PFK2 | 0,431   | 0,166  | 0,004 |

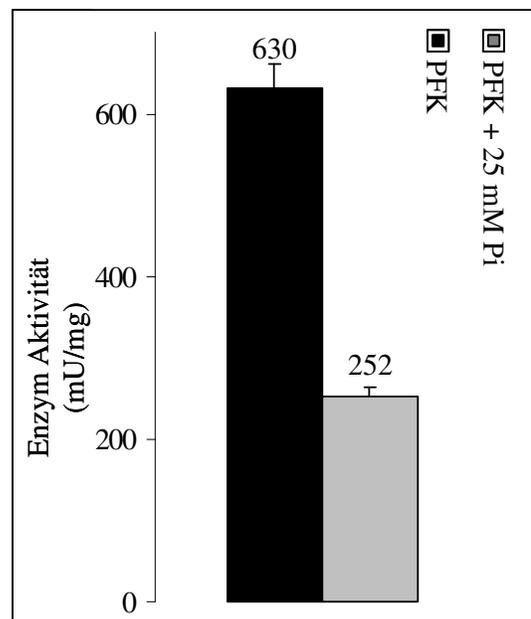


**Abb. 22:** Graphische Darstellung von möglichen Signalpeptiden und Schnittstellen der Proteinsequenz von *So*PFK1; kalkuliert durch die Anwendung SignalP [136]. „C-score, S-score und Y-score“ geben Auskunft über mögliche Signalpeptide, Schnittstellen. Der „Y-score“ wird aus C- und S-score kalkuliert und gibt die exaktere Prognose einer Prozessierungsstelle an

Trotz der nicht prognostizierten Signalpeptide, wurde mit der Software SignalP [136] eine mögliche Prozessierungsstelle für eine Signal-Peptidase prognostiziert. Bei der *So*PFK1 befindet sich eine mögliche Schnittstelle an Aminosäureposition 18, gegeben durch den Y-Wert in Abb. 22. Für die *So*PFK2 konnte keine Schnittstelle für eine Signalpeptidase ermittelt werden. Zur detaillierten Erläuterung der Datenausgabe von SignalP ist die Programmbeschreibung aufzurufen [136].

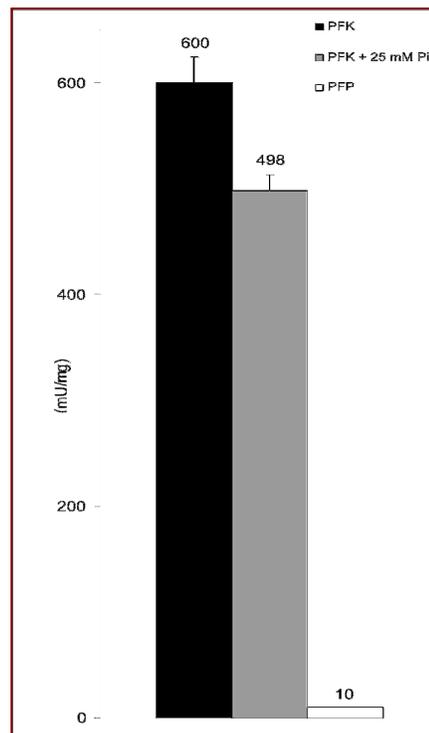
### 3.12 Indirekter, biochemischer Nachweis der *So*PFK1 Lokalisation

Zur Determinierung der PFK-Lokalisation wurde die von Kelly und Latzko 1977 beschriebene selektive Reaktion in Verbindung mit Phosphat angewandt, womit indirekt eine Kompartimentzuordnung getroffen werden konnte [31]. Dabei reagieren cytosolische als auch plastidäre PFK in der Enzymmessung unterschiedlich auf die Zugabe von 25 mM  $P_i$  (siehe Abschnitt 2.4.5). Die Aktivität des cytosolisch lokalisierten Enzyms wird durch Zugabe von 25 mM  $P_i$  verdoppelt [31]. Die plastidäre PFK wird durch Zugabe von 25 mM  $P_i$  um bis zu 50 % inhibiert [31]. Bei den hier direkt isolierten Chloroplasten aus Blattmaterial von *Spinacia oleracea* wurde eine Inhibierung von bis zu 64 % erzielt (siehe Abbildung 23).



**Abb. 23:** Enzymmessung von direkt isolierten Chloroplasten (siehe Abschnitt 2.4.5 und 2.3.5). Messung mit ATP als Kosubstrat und jeweils mit und ohne Zugabe von 25 mM  $P_i$ . (Schwarz) = ATP-PFK, (Grau) = ATP-PFK +  $P_i$

Ein analoger Versuch wurde mit dem Eluat aus 3.1.6 durchgeführt (siehe Abbildung 24). Das gereinigte Protein wurde nach Zugabe von 25 mM  $P_i$  in der Enzymmessung (siehe Abschnitt 2.4.5) inaktiviert. Ohne Zusatz von 25 mM  $P_i$  ließ sich eine spezifische Aktivität von 600 mU  $mg^{-1}$  detektieren. Die ATP-abhängige Phosphofruktokinase wird durch Zugabe von 25 mM  $P_i$  in der Enzymmessung um bis zu 20 % inhibiert, was jedoch nur einem Drittel der Inaktivierung direkt isolierter Chloroplasten entspricht. Durch die charakteristische Inaktivierung kann die *SoPFK1* dennoch als plastidär lokalisiert eingeordnet werden.

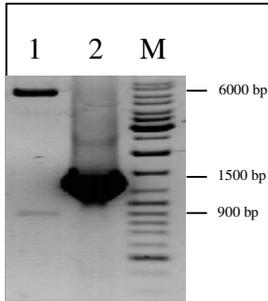


**Abb. 24:** Enzymmessung nach finalem Reinigungsschritt über Hydroxylapatit (siehe Abschnitt 3.1.6). Messung mit ATP als Kosubstrat. Jeweils mit und ohne Zugabe von 25 mM  $P_i$ . (Schwarz) = ATP-PFK, (Grau) = ATP-PFK +  $P_i$

### 3.13 Heterologe Expression der *SoPFK1* in Hefe

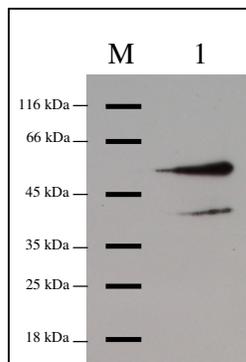
Aufgrund der kontroversen Ergebnisse in Abschnitt 3.10.1 und 3.11 konnte bisher keine Lokalisierung des Enzyms bestimmt werden. Eine eindeutige Klärung sollte eine heterologe Expression der *SoPFK1* in einem Modellorganismus liefern. Dabei sollte ein cytosolisches Enzym in *Saccharomyces cerevisiae* heterolog exprimierbar und messbar sein, während ein plastidär kodierendes Enzym aufgrund der N-terminalen Transitsequenz wahrscheinlich nur exprimierbar, und durch Immunoblotanalyse nachzuweisen wäre. Die *SoPFK1* Gen-Sequenz

wurde in den Expressionsvektor pYES2/CT ligiert (siehe Abschnitt 2.1.10 und 2.5.7.5), wobei ein Fusionsgen aus *SoPFK1* und C-terminalem, 6fachem HIS-Tag entstand (siehe Abbildung 25).



**Abb. 25:** Nachweis des Fusionsgens aus *SoPFK1* und C-terminalem 6x HIS Tag im Expressionsvektor pYES2/CT; kloniert in XL1 Blue *E. coli* Zellen. Spur 1 = spezifische analytische Restriktionsspaltung von pYES2/CT::*SoPFK1* mit *Bam*HI und *Sph*I. Spur 2 = spezifische Amplifikation der *SoPFK1* (2.1.9.1). M = Marker.

*SoPFK1* besitzt eine interne *Sph*I-Restriktionsschnittstelle, anhand derer eine Kontrollrestriktion zur Überprüfung der gerichteten Insertion überprüft werden konnte. Spur 2 der Abbildung 25 zeigt bei Restriktion mit *Bam*HI und *Sph*I eine erwartetes Fragment von 921 bp.



**Abb.26:** Immunoblot des *SoPFK1* Proteins. M = Marker; 1 = Eluat nach Ni-NTA Reinigung

Das erstellte Konstrukt wurde in den *S. cerevisiae* Stamm INVSc1 transformiert und unter einem induzierbaren *GALI*-Promotor exprimiert (siehe Abschnitt 2.2). Das konstruierte Fusionsprotein ließ sich selektiv mittels Ni-NTA-Affinitätschromatographie reinigen (siehe Abschnitt 2.4.3.6.1) und durch Immunodetektion mit einem Anti-HIS-Tag Antikörper nachweisen (siehe Abschnitt 2.1.4 und 2.4.9). *SoPFK1* inklusive HIS-Tag besitzt eine Größe von 55 kDa und ist in Abbildung 26 dargestellt. Neben der spezifischen Proteinbande wird ein zweites, schwächeres Signal bei etwa 42 kDa deutlich. Hierbei handelt es sich voraussichtlich um ein Abbauprodukt

des Proteins (Abb. 26). Ein nicht Epitop-fusioniertes PFK-Enzym ließ sich nicht immunologisch detektieren.

Im Vergleich zu einer INVSc1-Hefe mit transformiertem Leervektor konnte kein signifikanter Anstieg der Phosphofruktokinase Enzymaktivität erfasst werden. Für die Kontrolle (leerer Vektor) wurde eine spezifische Aktivität von  $\sim 34 \mu\text{U mg}^{-1}$  gemessen. Für den Stamm mit heterolog exprimierter PFK wurde eine spezifische Aktivität von  $\sim 40 \mu\text{U mg}^{-1}$  detektiert. Zusätzlich wurde *SoPFK1* in eine *S. cerevisiae* *Pfk*-Nullmutante (*pfk1::LEU2 pfk2::TRP1*) kloniert (siehe Abschnitt 2.2). Dabei ließ sich weder unter Hochkopienzahl-Situation (pJJH71) noch unter Niedrigkopienzahl-Situation (pJJH70) die Deletion komplementieren (siehe Abschnitt 2.1.10).

### 3.14 Klassifizierung der pflanzlichen Phosphofruktokinase

Zur evolutionären Einordnung wurde mit den abgeleiteten Aminosäuresequenzen der *So*PFK1 und *So*PFK2 ein phylogenetisches Netzwerk erstellt, basierend auf dem von Nielsen *et al.* 2004 publizierten NJ-Baum (siehe Abschnitt 2.6) [96]. Neben elf PFK-Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* wurden 15 homologe Sequenzen aus Reis, zwei aus der Kartoffel und zwei aus *Ricinus* mit einbezogen. Als außenstehende Gruppen wurden analog zu dem 2004 publizierten Baum Sequenzen aus *E. coli* und Hase gewählt. Innerhalb des Netzwerkes lassen sich vier Gruppen ausmachen. In III gruppieren bekannte Sequenzen, die den  $\alpha$ -Untereinheiten der  $PP_i$ -PFK entsprechen [35, 50]. Gruppe IV umfasst die Sequenzen der  $\beta$ -Untereinheiten der  $PP_i$ -PFK [35, 50]. Die Gruppen I und II enthalten allesamt ATP-abhängige Phosphofruktokinasen. Hier befinden sich Sequenzen, die *in silico* als mögliche plastidäre Proteine prognostiziert wurden und mit pCp markiert sind (siehe Abschnitt 2.6). Sequenzen, welche zu den "pCp"-Sequenzen äquivalente N-terminale Regionen aufzeigten, jedoch nicht durch Computer Analysen als plastidär lokalisiert gedeutet wurden [133-135], sind mit dem Suffix „Nex“ (*engl.* N-terminal extension) versehen worden.

Unter den Viridiplantae wurde bisher lediglich für die ATP-PFK aus Spinat ein experimenteller Nachweis für die Kosubstratspezifität erbracht. *So*PFK2 gruppiert sich hier in die Gruppe II, während sich *So*PFK1 in der Gruppe I wieder findet (siehe Abbildung 27). In der Gruppe II finden sich zwei von vier Sequenzen, die mit den Programmen IPsort [134], ChloroP [133] und PCLR [135] als plastidär prognostiziert wurden. Es handelt sich um die PFK At2g22480 aus *Arabidopsis thaliana* und die Reis-PFK XP 482597.1. Eine dritte Reis PFK (BAD29254.1) gruppiert sich in die Gruppe II mit dem Suffix „Nex“.



## Diskussion

Die pflanzlichen ATP-abhängigen PFK-Isoenzyme wurden bisher in zahlreichen Studien unter verschiedenartigen Schwerpunkten analysiert [31, 51-52, 56, 61,-62, 69]. Als geeigneter Modellorganismus erwies sich die Spinatpflanze, da größere Mengen an Pflanzenmaterial leicht und ganzjährig zugänglich sind. Die bisherigen und in dieser Arbeit erbrachten Ergebnisse werden im Folgenden diskutiert.

### 4.1 Die Verknüpfung zwischen Protein und Gensequenz

In dieser Arbeit wurde eine ATP-abhängige Phosphofruktokinase aus Spinat bis zur Homogenität gereinigt. Das Enzym wurde in der angegebenen Reihenfolge über DEAE-Sephrose, Sephacryl S-400-Gelfiltration, einem Saccharose-Gradienten, einer Reactive-Red-Farbstoffsäule, Mono-Q-Anionentauscher Chromatographie und abschließend über Hydroxylapatit 309fach gereinigt (siehe Abschnitt 3.1.1-3.1.6). Auf einem zwölf %igem SDS-Gel ließ sich durch Silberfärbung eine Bande bei 52 kDa detektieren (siehe Abb. 10). Das fixierte Protein wurde eluiert und nach einer tryptischen Spaltung mikrosequenziert. Es wurden insgesamt neun interne Fragmente detektiert, wobei bis auf tolerierbare Ungenauigkeiten bei Fragment 9, alle weiteren Fragmente 100 % Identität zu einem mittels PCR generierten kompletten Leserahmen zeigten. Diese Phosphofruktokinase (*SoPFK1*) ist ein homotetrameres Enzym (siehe Abschnitt 3.9) mit einem Molekulargewicht von etwa 200 kDa (siehe Abb.18).

*SoPFK1* katalysiert die Phosphorylierung von D-Fru-6-P zu D-Fru-1,6-P<sub>2</sub> mit einer spezifischen Aktivität von 600 mU mg<sup>-1</sup>, welche um das dreifache höher ist als die spezifische Aktivität der gereinigten plastidären PFK von Cséke *et al.* (1982) [57]. Es konnte keine Enzymaktivität mit PP<sub>i</sub> als Phosphordonor anstelle von ATP gemessen werden. Der K<sub>m</sub>-Wert für ATP wurde nach linearer Regression durch halb-reziproke Auftragung in Hanes-Woolf Plots mit 81 μM bestimmt [142]. Nach demselben Verfahren ließ sich der K<sub>m</sub>-Wert von 1,7 mM für D-Fru-6-P ermitteln (siehe Abschnitt 3.10). Bereits publizierte K<sub>m</sub>-Werte für dieses Enzym ergaben geringfügig höhere Affinitäten zu den genannten Substraten [57, 69]. Der K<sub>m</sub>-Wert für ATP ist etwa 2,7fach geringer [57, 69], während der bisher publizierte K<sub>m</sub>-Wert für D-Fru-6-P bei 0,33 mM lag [57]. Diese Unterschiede sind auf die jeweils angewandten Messbedingungen zurückzuführen. Es wurde in der Messung von Cséke *et al.* (1982) mehr als die doppelte Konzentration von D-Fru-6-P im Gegensatz zu der in dieser Arbeit verwendeten

Messung eingesetzt [57], wobei bekannt ist, dass D-Fru-6-P einen inhibitorischen Effekt auf das Hilfsenzym Aldolase ausübt [178]. Des Weiteren befand sich im Messpuffer 1 mM EDTA zum Puffern der freien  $Mg^{2+}$ -Ionen [57], was in dieser Arbeit ausgeschlossen wurde, begründet durch aktuelle Studien, die einen stimulierenden Effekt von  $Mg^{2+}$  auf ATP-PFK beschreiben [180].

Nach Zugabe von 25 mM ortho-Phosphat wurde die Enzymaktivität um 20 % inhibiert (siehe Abschnitt 3.12). Eine heterologe Expression in dem *Saccharomyces cerevisiae* Stamm INVSc1 war nur auf Ebene der Immunodetektion möglich; eine spezifische Aktivität des Enzyms ließ sich aber nicht nachweisen (siehe Abschnitt 3.13).

Das Protein wird von Software-gestützten Prognosen als nicht plastidär eingestuft, wobei jedoch eine putative Restriktionsstelle einer Peptidase an Position 18 vorhergesagt werden kann (siehe Abschnitt 3.11.1). Sequenzanalysen ergaben weiterhin, dass an den Aminosäurepositionen 104 und 124 ein Glycin bzw. ein Lysin auftreten, was eine Klassifizierung in die Gruppe der atypischen PFKs zulässt (siehe Abschnitt 3.11). *SoPFK1* gruppiert in einem phylogenetischen Netzwerk in der Gruppe II der möglichen plastidär lokalisierten PFK-Enzyme (siehe Abb. 27).

Neben der Nukleotidsequenz von *SoPFK1* konnten durch Hybridisierung mit einer generierten Sonde eine gezielte cDNA-Sequenz aus Spinat isoliert werden, welche ebenfalls als *PFK*-Homolog prognostiziert wurde. Zu dem hypothetisch kodierenden Protein (*SoPFK2*) sind keine biochemischen Studien durchgeführt worden, da nur ein mikrosequenziertes Peptidfragment zu 100 % identisch mit der Protein-Sequenz war (siehe Abschnitt 3.7). *In silico* Analysen prognostizierten das Protein als cytosolisch und gruppierten es in einem phylogenetischen Netzwerk in die Gruppe I der ATP-abhängigen PFKs. Beide Sequenzen zeigten untereinander eine Identität von 45 %.

#### **4.2 Vorausgehende Arbeiten zur ATP-abhängigen PFK aus *Spinacia oleracea***

Eine Enzymreinigung für die cytosolische ATP-PFK aus Spinat wurde von Häusler *et al.* 1989 durchgeführt [53]. Dabei erzielte man eine 2600fache Reinigung des Enzyms mit einer abschließenden spezifischen Aktivität von 20 U/mg in Anwesenheit von 25 mM  $P_i$ . Nach Reinigung über Ammoniumsulfatpräzipitation, Anionentauscher-Chromatographie, Blue-Sepharose und ATP-Agarose ließen sich vier Banden auf einem SDS-Gel detektieren, die jeweils zwischen 50 und 70 kDa lagen. Eine abschließende native Gelelektrophorese reduzierte die Aktivität der PFK auf eine Proteinbande, welche sich nach Elution bei pH 5.8 durch  $P_i$  stimulieren ließ (siehe Abschnitt 1.3.1).

#### 4.2.1 Konvertierung der ATP-PFK zur PP<sub>i</sub>-PFK und *vice versa*

Für die cytosolische ATP-abhängige PFK aus Spinat wurde fünf Jahre vor der Proteinreinigung [53] postuliert, dass es sich hierbei um ein Enzym handelt, welches sich durch spezielle Substrat-Inkubationen in die PP<sub>i</sub>-abhängige-PFK konvertieren lässt [83]. Dafür muss eine Präinkubation mit Uridindiphosphatglukose (UDPG) und PP<sub>i</sub> vorausgehen. Mit der Kosubstratspezifitätsänderung geht auch eine Reduktion der M<sub>r</sub> von 242 zu 165 kDa einher.

Für die PFP aus Spinat wurde gezeigt, dass sich die Kosubstratspezifität nach Inkubation mit (a) ATP (b) D-Fru-6-P, (c) D-Fru-2,6-P<sub>2</sub>, (d) D-Fru-2,6-P<sub>2</sub> + ATP und (e) D-Fru-2,6-P<sub>2</sub> + D-Fru-6-P von PP<sub>i</sub> nach ATP konvertieren lässt [83]. Dabei zeigt sich einhergehend eine Veränderung der molekularen Masse von 165 zu 242 kDa. Beide Enzyme ließen sich quasi unter den genannten Bedingungen ineinander überführen. Balogh *et al.* [83] stellten daher die Hypothese auf, dass *in vivo* während der Stärkesynthese (tagsüber) die D-Fru-2,6-P<sub>2</sub> Konzentration abnimmt. Dieser Umstand hätte zur Folge, dass PFK zu PFP konvertieren könnte, einhergehend mit einer Verringerung der Glykolyse-Aktivität. Bei Beendigung der Stärkesynthese (nachts) käme es zu einer Erhöhung der D-Fru-2,6-P<sub>2</sub>-Konzentration sowie einer Verringerung der UDPG-Konzentration. Dieser Umstand spräche für eine Konvertierung von PFP zu PFK [83]. Spätere Publikationen widerlegten dieses Konvertierungsmodell [143, 54]. Es wird vermutet, dass die angebliche Konvertierung von PFK zur PFP mit UDPG durch eine Kontamination von UDP-Glukose-Pyrophosphorylase entsteht [174]. Geringfügige Kontaminationen an PP<sub>i</sub> in handelsüblichen ATP-Präparaten scheinen ausschlaggebend für eine messbare PFP-Aktivität zu sein [40]. Für die pflanzliche PFP sowie PFK aus Kartoffeln konnte dann später mittels Immunodetektion eine unabhängige und separate Zusammensetzung der Enzyme bewiesen werden [143], (siehe Abschnitt 1.2).

#### 4.3 Die plastidäre ATP-PFK aus Spiant

Von Kelly und Latzko wurde im Jahr 1977 erstmalig die plastidäre Phosphofruktokinase aus Spinat beschrieben [56]. Über fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung konnte die cytosolische ATP-PFK von der plastidären ATP-PFK getrennt werden [7]. Bei 30-35 % Sättigung an Ammoniumsulfat konnte eine ATP-PFK detektiert werden, deren Aktivität sich durch Zugabe von 25 mM P<sub>i</sub> verdoppeln ließ. Eine zweite PFK Aktivität zeigte sich bei 50-60 % Sättigung. Dieses Enzym verringerte die Aktivität bei Zugabe von 25 mM P<sub>i</sub> um bis zu 50 %. Diesen inhibitorischen Effekt konnte man auch für die plastidäre PFK nach direkter Isolierung von

Chloroplasten detektieren, womit eine spezifische Lokalisierung durch dieses charakteristische biochemische Verhalten gewährleistet wurde. Das Enzym zeigt einen  $K_m$ -Wert für  $MgATP^{2-}$  von 30  $\mu M$ . In Zusammenhang mit  $PP_i$  zeigt die plastidäre PFK keinerlei Aktivität [69]. Es wurde bei pH 7.7 und einer D-Fru-6-P Konzentration von 0,5 mM die optimale Aktivität der PFK *in vitro* ermittelt. Bei Verringerung der D-Fru-6-P Konzentration, sowie bei Zugabe des Inhibitors PEP lag der optimale pH-Wert bei 7.0 [69].

Cséke *et al.* reinigten die plastidäre ATP-PFK partiell von direkt isolierten Chloroplasten mittels DE53-Chromatographie und Sephacryl S-300 Gelfiltration mit einem Reinigungserfolg des Faktors 23 [57]. Der optimale pH-Wert für das Enzym lag hier bei pH 7.9. Es wurde außerdem postuliert, dass NADPH einen inhibitorischen Effekt auf das plastidäre Enzym ausübte. NADPH reduziert die Affinität der PFK zu ATP, und verringert den  $V_{max}$  zu D-Fru-6-P und ATP unabhängig vom gegebenen pH-Wert [57]. Bei hohem NADPH-Spiegel (durch nicht-zyklischen Elektronentransport) wäre die Glykolyse eingeschränkt und Stärkeaufbau kann stattfinden. Im Dunklen ist die NADPH Konzentrationen durch fehlenden photosynthetischen Elektronentransport reduziert [181], was *inter alia* zu einer Aktivitätszunahme der plastidären PFK führt, resultierend im Stärkeabbau [57].

#### 4.4 Alternative Reinigungsmethoden der PFK

Als einer der primären Reinigungsschritte wurde nach Anfertigung von Protein-Rohextrakt (siehe Abschnitt 2.4.10.1) aus Spinat eine gezielte Präzipitation mit Ammoniumsulfat durchgeführt. Analog zu den von Kelly und Latzko 1978 publizierten Daten wurde ein Ausschluss von unspezifischen Proteinen durch „Aussalzen“ zwischen 30 und 80 % Ammoniumsulfat erreicht [83]. Dadurch wurde das Protein auf das siebenfache konzentriert, wobei jedoch die spezifische Aktivität kaum bis gar nicht gesteigert werden konnte, was auf die anschließende Dialyse zurückzuführen war. Eine direkte Trennung von cytosolischem und plastidärem Isoenzym durch differentielle Präzipitation zwischen 30 und 35 % bzw. 50 und 60 % Ammoniumsulfatsättigung konnte erfolgreich reproduziert werden [7]. Nach einer anschließenden Dialyse war die Ausbeute an aktivem Protein in Anbetracht der Zielsetzung jedoch zu gering, um weiterführend eine Reinigung durchführen zu können. Eine Implementierung dieser Technik zu einem späteren Abschnitt der Reinigung war aufgrund der erschwerten Bestimmung korrekter Salzkonzentrationen sowie dem eventuellen Verlust eines der beiden Isoenzyme nicht möglich (siehe Abschnitt 4.3.2).

Eine ähnliche Problematik war durch das Reinigungsverfahren mittels Phenyl-Sepharose (GE-Health-care Bioscience) gegeben. In diesem Reinigungsschritt wurde das Protein durch einen kontinuierlichen, abnehmenden Gradienten von 1-0 M Ammoniumsulfat eluiert, wodurch sich die spezifische Aktivität der ATP-PFK etwa um den Faktor acht erhöhen ließ. Einhergehend war jedoch ein hoher Verlust an Protein (etwa 97 %), was wahrscheinlich durch die entsprechenden Verdünnungen mit Ammoniumsulfat und dem resultierendem Verlust an aktivem Protein, hervorgerufen wurde. Die Anwendung dieser Reinigungsstrategie wurde daher in dieser Arbeit ausgeschlossen.

Ein weiteres, gängiges chromatographisches Verfahren ist die Reinigung über immobilisierte Textil-Farbstoffe [144, 145]. Eine eindeutige Funktionsweise dieser Matrices ist bisher noch nicht aufgeklärt worden. Die spezifische Affinität der Farbstoffe vermutet man in Substrat- bzw. Kofaktor-Ähnlichkeiten, sowie in hydrophoben Eigenschaften. Da eine spezifische Affinität nicht vorausgesagt werden konnte, wurden verschiedene Farbstoffe getestet und Verfahren aus bewährten Reinigungen erprobt [54, 146]. Ein „Screening“ verschiedener Textil-Farbstoffe in Test-Chromatographien ergab keinerlei Affinität der PFK zur Gel-Matrix „Orange A“ und „Green A“ (Dyematrix Screening kit for protein purification, Amicon Division, W.R. Grace & Co.- Conn., 24 Cherry Hill Drive, Danvaers, MA 01923). Mit dem blauen Farbstoff „Blue B“ resultierte nur eine Ausbeute von 9 % Bindung der PFK an die Matrix. „Blue A“ lieferte eine Bindekapazität von 37 %. Anhand von publizierten PFK-Reinigungen unter Zuhilfenahme dieses Farbstoffes wurde versucht diese partielle Bindung zu optimieren [54, 27].

Bei der Reinigung der Phosphofruktokinase aus Kartoffel und *Amycolatopsis methanolica* wurde die Chromatographie über Blue Sepharose<sup>®</sup> verwendet. Nach diesem Schritt wurden die spezifische Aktivität und der Reinigungserfolg verdoppelt bzw. um den Faktor 296 erhöht [54, 27]. Diese beiden Verfahren wurden für die zu isolierende PFK aus Spinat versucht zu übertragen. Nach einer erfolgreichen Anreinigung durch Anionentauscher-Chromatographie (siehe Abschnitt 2.4.3.1) wurden die Methode nach Protokollen von Wong *et al.* (1986) und Alves *et al.* (2001) separat durchgeführt [54, 27]. Das Protein ließ sich nicht an die Matrix binden, und wurde im Durchlauf der Chromatographie aufgefangen. Weitere Optimierungen der Verfahren blieben erfolglos, so dass auf diesen Reinigungsschritt verzichtet wurde.

Die höchste Bindekapazität wurde mit einer „Reactive Red 120“-Farbstoffsäule (siehe Abb. 07) erzielt. In dem zuvor durchgeführten „Screening“ der verschiedenen Farbstoffe ließ

sich eine Bindekapazität von 55,1 % ermitteln, welche gegenüber sämtlichen anderen getesteten Farbstoffen den höchsten Wert lieferte. Der Reinigungsfortschritt mit dieser Farbstoffmatrix belief sich auf 80 % und erwies sich für die Etablierung eines erfolgreichen Reinigungsprotokolls als erforderlich. Diese Farbstoffsäulenchromatographie wurde auch bereits effektiv bei der Reinigung der ATP-PFK- bzw. PP<sub>i</sub>-PFK-Enzyme aus der Kartoffel eingesetzt. Hier ließ sich die spezifische Aktivität gegenüber dem vorherigen Reinigungsschritt sogar um das 60fache erhöhen [55].

Eine andere gängige Methode zur chromatographischen Trennung von Proteinen ist die Reinigung mittels immobilisiertem ATP auf Trägermaterial [147]. Die cytosolische ATP abhängige Phosphofruktokinase aus Spinat wurde von Häusler *et al.* 1989 in einem finalen Reinigungsschritt mit ATP-Agarose um den Faktor acht spezifisch gereinigt [53]. Ebenfalls gelang es der Arbeitsgruppe von Krüger *et al.* 1988, ATP-Agarose als Trennmittel in ihre Gesamtreinigung der PFK aus Kartoffeln zu etablieren, wobei der Reinheitsgrad um den Faktor 100 gesteigert wurde [55]. Dabei wurde jeweils unter geeigneten Bedingungen die Proteinfraction an der Matrix immobilisiert, und mit kontinuierlich steigenden ATP-Konzentrationen eluiert [53]. ATP-PFK aktive Fraktionen aus Spinat, welche nach DEAE-Sepharose (siehe Abschnitt 3.1.1) und Gelfiltration (siehe Abschnitt 3.1.2) angereinigt wurden, sind auf eine äquilibrierte 3ml ATP-Agarose-Säule (Sigma) geladen worden, und analog zu den von Häusler *et al.* oder Krüger *et al.* beschriebenen Methoden in einem kontinuierlichen Gradienten von 0-5 mM ATP eluiert worden [53, 55]. Da keine Interaktion von Protein und Matrix zu Stande kam, wurden einige Parameter der Reinigung variiert, sowie die Probe vor der Elution im „Batch-Verfahren“ inkubiert. Eine „Schlagelution“ anstatt des kontinuierlichen Gradienten blieb ebenfalls erfolglos, so dass von dieser Reinigungsmethode Abstand genommen wurde.

Eine Begründung für die fehlende Interaktion der hier gereinigten Spinat ATP-PFK an die ATP-Agarose-Matrix wurde bereits 1993 von Haystead *et al.* formuliert [148]. In den bekannten und zugänglichen ATP-Agarose-Matrices wurde die Kupplung von ATP an die stationäre Phase durch die N<sub>6</sub>-Aminogruppe des Purinrings oder alternativ durch Bindung von Hydroxylgruppen des Riboserests ermöglicht [149]. Diese Orientierung verursacht eine Lücke zwischen katalytischem Zentrum des ATP-abhängigen Enzyms und MgATP [148]. Daraus resultiert die Möglichkeit, dass erfolgreiche Reinigungsschritte von ATP-PFK mit ATP-Agarose [53,55] nicht auf der spezifischen Bindung von ATP und Protein basierten, sondern vielmehr durch schwache, ionische Interaktionen mit  $\alpha$ -,  $\beta$ - oder  $\gamma$ -Phosphat zustande kamen [148]. Eine Alternative wäre die Verwendung von ATP-Sepharose gewesen, welche sich

durch eine Bindung des ATP Analogs Andenosin-5-( $\gamma$ -4-Aminophenyl)Triphosphat über die  $\gamma$ -Phosphat-Gruppe an Sepharose auszeichnet [148]. Da in dieser Arbeit jedoch ein Protokoll etabliert wurde, welches die Reinigung der ATP-PFK bis zur Homogenität ermöglichte (siehe Abschnitt 3.1 und Abb. 10), konnte auf die Erprobung dieser Alternative verzichtet werden.

Der primäre Reinigungsschritt mittels DEAE-Sepharose wäre auch durch eine Anionentauscher-Chromatographie „Fraktogel<sup>®</sup> EMD DEAE (S)“ der Firma Merck zu substituieren. Allerdings ergab sich hierbei keinerlei signifikanter Unterschied zur Reinigung mittels DEAE-Sepharose (siehe Tabelle 04).

In dieser Arbeit war es nicht möglich ein bereits bekanntes Reinigungsverfahren von isolierten pflanzlichen Phosphofruktokinase authentisch auf die hier gestellte Problemstellung zu übertragen bzw. durchzuführen [54, 84, 55, 25]. Partiiell ließen sich einige Trennmethode anwenden, wobei eine Anpassung und Optimierung der jeweiligen Schritte notwendig war.

Neben den alternativen Verfahren der Proteinreinigung wären weitere Lösungswege in Anbetracht der Fragestellung denkbar gewesen (siehe Abschnitt 1.5) Zur Detektion der beiden PFK-Isoenzyme wäre ein transgener Ansatz zur Klonierung der sieben bekannten ATP-PFKs aus *Arabidopsis thaliana* [96] vorstellbar. Da allerdings ein *a priori* Wissen über putative Untereinheitszusammensetzungen unmöglich ist, schien dieser Weg als problematisch. Ebenso wären entsprechende RNAi bzw. knockout-Mutanten schwierig zu erstellen gewesen, da es sich bei der PFK um ein essentielles Protein handelt, welches voraussichtlich keinen gezielten Phänotyp zulässt. Ein weiterer gängiger Ansatz wäre die Immunhybridisierung mit Antiseren gegen ATP-PFK aus Pflanzen. Die einzigen bisher bekannten Antikörper gegen ATP-PFK wurden von Krüger *et al.* 1988 [55] erstellt, und sind heute nicht mehr zugänglich (Krüger; pers. Mitteilung). Eine Determinierung der ATP-PFK durch Antiseren aus Algen wäre ebenso ungeeignet gewesen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass mit solchen Antikörpern gegen cpATP-PFK eine Kreuzreaktion mit pflanzlicher cytATP-PFK als auch cpATP-PFK stattfindet [63,80].

#### 4.5 Verlust des cytosolischen Isoenzym während der Reinigung ?

Während der kompletten Reinigung der pflanzlichen Phosphofruktokinase aus Spinat konnte bei keinem der durchgeführten Reinigungsschritte ein zweites, ATP-abhängiges Isoenzym unter diversen Bedingungen eluiert werden (siehe Abschnitt 3.1.1-3.2). Obwohl es gelungen ist, die Trennung der Isoenzyme aus Spinat über fraktionierte Ammoniumsulfatpräzipitation nach Kelly und Latzko (1977) zu reproduzieren [31], wurde dieses Verfahren nicht in das Reinigungsschema implementiert, da zu hohe Verluste (siehe Abschnitt 4.1) prognostiziert wurden. Es sind bereits Publikationen bekannt, aus denen eine Trennung der Isoenzyme aus unterschiedlichen Ressourcen hervorgeht [54, 49, 60]. Es stellt sich somit die Frage, warum in dieser Arbeit nach keinem der sechs Reinigungsschritte eine Auftrennung in plastidäre und cytosolische PFK möglich war. Einen Erklärungsansatz findet man in den zwei Veröffentlichungen von Häusler *et al.* 1989, in welchen die Reinigung und die Biochemie der cytosolischen ATP-PFK beschrieben wurde [53, 62].

Es wurde zum einen postuliert, dass die cytosolische PFK durch Chlorid-Anionen stimuliert wird und den Effekt von  $P_i$  (siehe Abschnitt 01.04.04) maskieren kann. Kalium-Ionen, in Konzentrationen oberhalb von 200 mM, inhibieren den stimulierenden Effekt dieser beiden Effektoren, wobei Natrium- oder Ammonium-Ionen keinerlei Einfluss auf die Aktivität ausüben [53]. In den chromatographischen Trennmethode dieser Arbeit (DEAE-Sephrose, Reactive-Red Affinitätschromatographie, MonoQ-Anionentauscher und Hydroxylapatit) wurde je in entsprechenden Gradienten mit KCl eluiert (siehe Abschnitte 2.4.3.1, 2.4.3.3-2.4.3.5), während bei der Reinigung der cytosolischen PFK nach Häusler *et al.* weitestgehend auf Salzgradienten verzichtet wurde [53]. Eine Ausnahme bildet die Elution des Proteins von einer DEAE-Anionentauschersäule. Hier wurde in einem Gradienten von 0-400 mM mit NaCl anstatt KCl eluiert. Dieser primäre Reinigungsschritt ergab nur einen gegenüber den anderen Trennschritten geringen Reinigungsfaktor von 2,3 und wurde nach einer Ammoniumsulfatpräzipitation durchgeführt. In allen weiteren Reinigungsschritten wurde ein ATP-Gradient zur Elution des Proteins verwendet [53]. Durch den bewussten Ausschluss des Inhibitors  $K^+$  wurde der Nachweis in einer gezielten Enzymmessung vereinfacht.

Die plastidäre PFK aus Spinat ist über einen pH-Bereich von 6.5-8.5 aktiv. Das Aktivitätsoptimum wird im pH-Bereich von 7.7 bis 7.9 erreicht [69, 57], welches jedoch durch verschiedene Zusätze an D-Fru-6-P,  $P_i$  und  $Mg^{2+}$  variieren kann [69]. Aus den bisher bekannten Daten wurde in dieser Arbeit während der Reinigung bei einem pH-Wert von 7.8

gepuffert, eluiert und gemessen, mit Ausnahme der Reinigung über Hydroxylapatit. Hier lag der optimale pH-Wert bei 7.2.

Den in dieser Arbeit verwendeten Puffern wurde zur Stabilisierung des Enzyms 5 mM MgOAc, sowie bis zur Mono-Q-Anionenaustauscher-Chromatographie 1 mM ATP hinzugefügt. ATP wurde ab der Trennung mittels Mono-Q nicht mehr in den Puffern verwendet, um eventuelle Rückstände bei den Messungen zu vermeiden und Fehler in der Bestimmung der Kosubstratspezifität auszuschließen. Dem Messpuffer wurden 0,5 mM MgCl<sub>2</sub> sowie 0,6 mM ATP respektive PP<sub>i</sub> hinzugefügt. Es ist folglich davon auszugehen, dass während der Reinigung sämtliche Proben in Puffern mit Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen von mindestens 5 mM vorlagen.

Die cytosolische Phosphofruktokinase aus Spinat wird durch millimolare Konzentrationen an freiem Mg<sup>2+</sup> inhibiert. Zur 50 %igen Inhibierung des Enzyms sind Konzentrationen von 22 mM Mg<sup>2+</sup> nötig. In Abwesenheit von P<sub>i</sub> sind aber nur Mg<sup>2+</sup>-Konzentrationen zwischen 0,5 bis 1 mM erforderlich, um 80 % des Enzyms zu inhibieren. Solche Konzentrationen sind in dieser Arbeit während der kompletten Reinigung erreicht worden. Dabei scheint das Metallion die Aggregation/Disaggregation der PFK von einer aktiven zu einer weniger aktiven Form zu initiieren [62]. Dieser Effekt kann *in vitro* durch Zugabe von EDTA und *in vivo* voraussichtlich durch P<sub>i</sub> kompensiert werden.

Eine Studie von Häusler *et al.* aus dem Jahre 1989 belegt in einem Diagramm den Effekt des gewählten pH-Wertes in Verbindung mit einer Mg<sup>2+</sup> Konzentration von je 0,5; 2,5 und 5 mM. Es wurde demonstriert, dass ab einer Mg<sup>2+</sup>-Konzentration von 2,5 mM die cytosolische ATP-PFK keinerlei Aktivität mehr im pH-Bereich von 5.5 bis 8 aufweist. Bei einer geringeren Mg<sup>2+</sup> Konzentration von 0,5 mM hebt sich dieser Effekt wieder auf. Dieser gekoppelte Mechanismus tritt nur dann auf, wenn kein P<sub>i</sub> in der Messung vorhanden ist [53].

Da wie bereits beschrieben in dieser Arbeit die verwendete Mg<sup>2+</sup>-Konzentration weit oberhalb von 2,5 mM lag, und ein pH-Wert von 7.2 bzw. 7.8 gewählt wurde, ist von einer vollständigen Inhibierung der cytosolischen PFK während der gesamten Reinigung auszugehen. Bei einer Reduktion der Mg<sup>2+</sup>-Konzentration oder einer geeigneten Zugabe von P<sub>i</sub> wäre dieses Enzym wahrscheinlich detektierbar gewesen. Eine Zugabe von P<sub>i</sub> hätte aber auch den nachteiligen Effekt einer Inhibierung des plastidären Isoenzym gehabt [31], und stünde kontraproduktiv zur Zielsetzung dieser Arbeit (siehe Abschnitt 1.5).

Die Summe der Effekte und Einflüsse auf das cytosolische Isoenzym, gegeben durch die praktizierten Versuchsbedingungen, scheinen eine Detektion des Enzyms bei allen

Reinigungsschritten unmöglich gemacht zu haben, wobei das Enzym wahrscheinlich ungewollt während einem der Reinigungsschritte verworfen wurde.

#### **4.6 Ein etabliertes Reinigungsschema zur Isolierung der ATP-PFK aus Spinat**

Das hier etablierte und reproduzierbare Reinigungsschema (siehe Kapitel 3) ließ sich zur Reinigung einer ATP-abhängigen Phosphofruktokinase anwenden. Die ersten drei Reinigungsschritte (DEAE-Sephrose, Sephacryl S-400 und Saccharose-Gradient) lieferten nur sehr geringe Steigerungen der spezifischen Aktivität (siehe Tabelle 04), wobei die Gesamtproteinmenge bis zur Trennung im Saccharose-Gradienten um das über 1000fache reduziert wurde. Eine Erklärung für die geringfügige Steigerung der spezifischen Aktivität liegt in der Instabilität des Proteins [49, 57]. Trotz des Einsatzes von stabilisierenden Faktoren, wie Glycerin, Proteaseinhibitoren und dem zügigen Arbeiten bei 4°C konnte eine Degradierung des Proteins nur unzureichend verhindert werden. Diese drei nacheinander abfolgenden Reinigungsschritte wurden außerdem so gewählt, dass keinerlei dialytische Schritte aufgebracht werden mussten, womit ein weiterer Faktor zur Destabilisierung bzw. Aggregation/Konformation des Proteins ausgeschlossen wurde. Erst nach Trennung über Reactive-Red 120 (siehe Tabelle 04) ist ein deutlicher Anstieg der spezifischen Aktivität zu messen, welcher abschließend nach der Reinigung über Hydroxylapatit in einer 309fachen Reinigung resultiert (siehe Abb. 10). Auch anhand eines SDS-Gels, welches die Reinigung dokumentiert, wird eine erhebliche Verringerung der kontaminierenden Proteine deutlich. Der letzte Reinigungsschritt mittels Hydroxylapatit (siehe Abb. 09, 10) liefert eindeutig eine Proteinbande bei 52 kDa, wobei dieser Schritt in einem Totalaktivitätsverlust von 93 % resultiert (siehe Tabelle 04). Ein alternativer, abschließender Reinigungsschritt, welcher den annähernd gleichen Reinigungserfolg gekoppelt mit einem geringen Aktivitätsverlust liefern würde, konnte in dieser Arbeit nicht ermittelt werden. Eine Begründung des Aktivitätsverlustes liegt in der Art der Elutionsbedingungen bei der Hydroxylapatit-Chromatographie (siehe Abschnitt 2.4.3.5). Der kontinuierliche Anstieg von ortho-Phosphat zur Elution des Zielproteins geht einher mit einer ansteigenden Inaktivierung der plastidären PFK [31], wodurch der rapide Aktivitätsverlust erklärbar wäre. Eine Messung der ATP-PFK in direkt isolierten Chloroplasten nach Zugabe von 25 mM  $P_i$  resultierte in einer über 60 %igen Inhibierung des Enzyms (siehe Abschnitt 3.12). Diese Messung bestätigt zum einen, dass die plastidäre PFK durch  $P_i$  inhibiert wird, und zum anderen, dass eine Prä-Inhibierung des Enzyms, die durch Reinigung über Hydroxylapatit-Chromatographie

(siehe Tabelle 1) stattfand. Auf eine terminale Dialyse des Proteins zur Eliminierung von inhibierendem  $P_i$  wurde aus Stabilitätsgründen verzichtet. Der hier praktizierte Hydroxylapatit-Reinigungsschritt könnte auch ein Beleg dafür sein, warum Turner *et al.* 2003 ein insgesamt 10fach, und Kruger *et al.* 1988 ein fast 300fach höherer Reinigungserfolg gelungen ist [49, 143]. Die Anzahl der verwendeten Reinigungsschritte, sowie die stabilisierenden Faktoren zur Konservierung der Enzymaktivität variieren in diesen Protokollen im Gegensatz zu der hier gereinigten PFK, und sind somit auch für einen unterschiedlichen Erfolg verantwortlich. Zusätzlich können variierende Messbedingungen, beispielsweise gegeben durch Hilfsenzyme verschiedener Hersteller, eine Differenz in der Reinigungseffizienz ergeben. Abschließend spielt natürlich die Wahl der Ausgangsorganismen eine entscheidende Rolle. Die präparierte, cytosolische PFK aus Spinat zeigt gegenüber den PFKs aus Banane und Kartoffel [49, 143] eine erhöhte spezifische Aktivität von 20 U/mg, wurde aber auch unter aktivierenden Bedingungen durch Zugabe von  $P_i$  gemessen [53]. Da bisher keine definitive, cytosolische ATP-PFK aus anderen Pflanzen bis zur Homogenität gereinigt wurde, kann mit einem Vergleich der finalen spezifischen Aktivitäten nur eine vage Aussage getroffen werden. Es wäre auch denkbar, dass das hier gereinigte Enzym nur einen minderen Anteil der katalytischen Phosphorylierung von D-Fru-6-P übernimmt, und eine weitere, hier nicht detektierte PFK die Hauptaktivität, vergleichbar zur Situation in *E.coli*, katalysiert [14-16].

Anhand der Abbildung 10 wird deutlich, dass auf Höhe der PFK in Spur 7 eine prominente Bande bei circa 52 kDa über sämtliche Reinigungsschritte komigriert. Anhand von Gel-Dokumentationen bereits bekannter Publikationen wurde vermutet, dass es sich bei dieser weitaus überladenen Bande um die große Untereinheit der Ribulose-1,6-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO E.C. 4.1.1.39) handelt [150]. Ebenso findet man in allen Spuren bis zum Reinigungsschritt der MonoQ-Chromatographie eine zweite Bande, welche bei 14 kDa migriert (siehe Abbildung 10). Voraussichtlich handelte es sich hierbei um die kleine Untereinheit dieses Enzyms. Beide Proteinbanden wurden nach Reinigung mittels Mono-Q-Chromatographie aus einem SDS-Gel extrahiert, tryptisch verdaut und abschließend massenspektroskopisch analysiert. Für die 52 kDa Bande bzw. für die 14 kDa Bande wurden die folgenden Peptide ermittelt:

**Tabelle 12:** Massenspektroskopisch detektierte Peptidfragmente der 52 kDa Bande und 14 kDa Bande nach Mono-Q-Chromatographie.

| Peptid<br>Nr.: | Aminosäuresequenz:<br>(52 kDa Fragment) | Größe<br>(Da): | Peptid<br>Nr.: | Aminosäuresequenz:<br>(14 kDa Fragment) | Größe<br>(Da): |
|----------------|---|----------------|----------------|---|----------------|
| 1              | IPVAYK                                  | 784            | 1              | YWTMWK                                  | 921            |
| 2              | TFGGPPHGIQVER                           | 1466           | 2              | QVDYLLNKK                               | 1106           |
| 3              | GLLLHIHR                                | 1227           | 3              | IIGFDSNR                                | 930            |
| 4              | DITLGVDLLR                              | 1261           | 4              | IAYKPA                                  | 940            |
| 5              | VALEACVGA                               | 1116           | 5              |   |                |

Nach einer Sequenzsuche exakter identischer Treffer in der Genbank des NCBI ließ sich eindeutig nachweisen, dass es sich bei dem sequenzierten 52 kDa Peptid um die große Untereinheit der RuBisCo und bei dem 14 kDa Peptid um die kleine Untereinheit des Enzyms aus *Spinacia oleracea* handelt. Da sich auf Höhe der 52 kDa Bande allerdings auch zumindest eine Untereinheit der gesuchten ATP-PFK befinden sollte, wurde nach einem Verfahren zur Eliminierung der RuBisCO gesucht.

Überprüft wurden die Methode des Saccharosegradienten, bei welchem es bereits gelungen war, die große Untereinheit aus Präparationen zu entfernen [151]. In dem hier konstruierten Gradienten (siehe Abschnitt 2.4.4) ist dieses allerdings nicht effektiv gelungen. Erst nach Reinigung über Hydroxylapatit ließen sich sowohl die große als auch die kleine Untereinheit der RuBisCO aus der Präparation entfernen (siehe Abb. 10). Der Saccharose-Gradient wurde im finalen Reinigungsprotokoll dennoch beibehalten, da nach Fraktionierung und Dokumentation auf einem gefärbten SDS-Gel eine eindeutige Eliminierung von unspezifischen Proteinen nachgewiesen werden konnte (siehe Abb. 06).

Insgesamt wurden in der massenspektrometrischen Analyse nur Peptide gefunden die als identische Fragmente der *So*PFK1 Proteinsequenz zugeordnet werden konnten (siehe Abschnitt 3.8 und Abb.17). Daraus lässt sich erschließen, dass keine kontaminierenden Proteine mehr vorhanden waren.

Eine partielle Reinigung der putativ plastidären PFK wurde bereits von Cséke *et al.* 1982 durchgeführt (siehe Abschnitt 4.2) [57]. Die finale spezifische Aktivität lag bei 210,3 mU mg<sup>-1</sup> min<sup>-1</sup>. Die hier präsentierte Ausbeute der vermutlich plastidären ATP-PFK ist etwa dreimal höher. Das publizierte Chromatogramm der Gelfiltration [57] entspricht im Ablauf etwa dem Chromatogramm der Hydroxylapatitreinigung (siehe Abb. 09). Eine

Dokumentation der Reinigung durch ein angefärbtes SDS-Gel wurde nicht erstellt, so dass keinerlei Größenvergleich zu dem in dieser Arbeit gereinigten Enzym erstellt werden kann.

Im Vergleich zu bereits publizierten Reinigungen der PFK aus Pflanzen zeigt sich keine einheitliche Anordnung und Zusammensetzung des Enzyms. Die PFK aus Kartoffel besteht aus vier Untereinheiten zwischen 46.3 und 53.3 kDa, die individuell durch Immunodetektion nachweisbar waren [143]. Lokalisationsstudien sind hier bisher noch nicht bekannt. Dieses Enzym liegt in unterschiedlichen Aggrationszuständen vor [55] und konnte in jeder Form mit einer spezifischen Aktivität von etwa  $200 \text{ U mg}^{-1}$  gereinigt werden. Die isolierte Chloroplasten-PFK aus Karotten [54] wurde als natives 400 kDa Protein, bestehend aus einer 60 kDa Untereinheit beschrieben. Diese Anordnung spricht für ein homooktameres Protein. Die aus der Banane gereinigte ATP-PFK existiert in zwei Isoformen mit nativen 210 respektive 160 kDa Molekulargewicht [49]. Die Untereinheitenzusammensetzung sowie die konkrete Lokalisierung gehen hier bisher ebenfalls fehl.

Es ist für die in dieser Arbeit aus Spinat isolierte ATP-PFK nicht auszuschließen, dass das Enzym in unterschiedlichen, nativen Konformationen/Aggregationen auftreten kann, und diese unter den hier gewählten Reinigungsbedingungen nicht stattfanden oder detektierbar waren, gegeben durch den gewählten pH-Wert und/oder fehlenden stabilisierenden Faktoren [50, 54]. Dazu gehört auch die eventuelle Dimerisierung, bzw. Tetramerisierung mit einer/oder mehreren, weiteren Untereinheiten. Ein Kandidat für eine solche Aggregation wäre die hier beschriebene *So*PFK2 (siehe Abschnitt 3.6). Die finale Dokumentation der Reinigung über Proteinfärbung eines entsprechenden SDS-Gels widerspricht, aufgrund der singulären 52 kDa Bande dieser Vermutung (siehe Abb.10).

Auch für die cytosolische ATP-PFK aus Spinat wurde nach einer chromatographischen Trennung nur eine Untereinheit zwischen 50 und 70 kDa detektiert [53]. Dieses Ergebnis lässt sich zwar nicht direkt mit der plastidären PFK in Bezug setzen, zeigt aber im Gegensatz zu den bereits gereinigten PFKs [54, 49, 55] eine monomere Untereinheitenzusammensetzung, was sich eventuell auch auf das plastidäre Isoenzym übertragen lässt.

#### **4.7 *In silico* Lokalisierungsstudien**

Plastiden in Pflanzen haben ein semi-autonomes Genom kodierend für 100-200 Gene [152]. Jedoch werden mehr als 90 % der in den Plastiden benötigten Genprodukte im Zellkern kodiert, und mit Hilfe einer Transit-Sequenz in die Plastiden transferiert [153]. Spezifische Rezeptoren erkennen das Transitpeptid und führen es zum Translokase-Komplex der äußeren

sowie inneren Chloroplastenmembran (TIC/TOC). Das Peptid wird unter ATP-Verbrauch in die Chloroplasten transloziert. Nach vollständigem Import wird das Transit-Peptid durch eine stromale Peptidase entfernt [154-156]. Das hier isolierte Protein *So*PFK1, sowie die Sequenz von *So*PFK2 wurde von den Software-Skripten ChloroP, IPSort und PCLR [133, 134, 135] als nicht plastidär eingestuft, wobei sich die Ergebnisse der Programme deutlich unterscheiden. Bei den IPSort- und PCLR- Prognosen liegen die kalkulierten Werte weit entfernt vom ausschlaggebenden Schwellenwert, welcher über eine plastidäre Lokalisation entscheidet. ChloroP prognostiziert zwar kein Transitpeptid für beide Sequenzen, die berechneten Werte liegen hier jedoch deutlich näher am entsprechenden Schwellenwert (siehe Abschnitt 3.11.1).

Ein gemeinsames Merkmal von mitochondrialen Präsequenzen als auch plastidären Transitpeptiden ist die seltene Existenz von negativ geladenen Aminosäuren [157]. Schein *et al.* postulierten 2001, dass bei Transitpeptiden das Vorkommen einiger Aminosäuren charakteristisch sei [152]. An der Schnittstelle für die Peptidase findet man häufig saure Aminosäuren [153]. An der prognostizierten Schnittstelle durch SignalP (siehe Abschnitt 3.11.1) von *So*PFK1 findet man Aspartat, was die korrekte Prognose manifestiert [136]. *Inter alia* ist für Transitpeptide bekannt, das im N-terminalen Bereich die Aminosäuren Arginin und Leucin eher selten vertreten sind [153]. Auch saure Reste sind eher selten aufzufinden [152]. Auf Aminosäureebene der *So*PFK1 findet man an den Positionen drei fünf und sieben jedoch ein Arginin, während Leucin im kompletten N-terminalen Bereich nicht vertreten ist. Eine saure Aminosäure ist nur an Position 19, der virtuell prognostizierten Schnittstelle zu finden. Bisher ist jedoch unklar, ob die Absenz der zuvor genannten Aminosäuren spezifisch für bekannte Proteine aus *Arabidopsis thaliana* ist, oder universell Gültigkeit besitzt [158].

Software-basierende Analysen, wie beispielsweise PCLR bewerten bei der Prognose über ein mögliches Transitpeptid die Aminosäuren Serin und Arginin als positiv. Aspartat, Cystein, Glutamat, Histidin, Isoleucin und Tryptophan haben negativen Einfluss auf die *in silico* Prognose [135]. Die ersten 20 N-terminalen Aminosäuren von *So*PFK1 beinhalten sieben positive Signale und fünf negative, wobei dadurch keinerlei signifikante Klassifizierung getroffen werden konnte.

Für die Identifikation von Transitpeptiden wären dreidimensionale Strukturen von Vorteil gewesen. Diese sind bisher nur für Ferredoxin [159] und RuBisCO-Aktivase [160] aus der Alge *Chlamydomonas reinhardtii* bekannt. Während mitochondriale Präsequenzen amphipatische  $\alpha$ -Helices bilden [161, 162], findet man im Gegensatz dazu bei Transitpeptiden keine Struktur. Erst bei Kontakt mit der Chloroplastenmembran bilden diese Helices [163]. Man vermutet, dass höhere Pflanzen mindestens zwei helikale Domänen

ausprägen, während die Transitpeptide in Algen lediglich eine besitzt [152]. Zweidimensionale Prognosen für *SoPFK1* konnten im N-terminalen Bereich keinerlei helikale Struktur mutmaßen. Es wird außerdem angenommen, dass für Transitpeptide eine Unterteilung in drei distinkte Domänen besteht [152, 164]. Am N-Terminus gibt es einen ungeladenen Bereich, welcher sich über etwa 10 Aminosäuren erstreckt. Am Transkriptionsstart befinden sich ein Methionin (M) und ein Alanin (A). Am Ende dieser Region entweder ein Glyzin (G) oder ein Prolin (P). Der mittlere Teil ist sehr Serin-(S)/Threonin- (T) reich und arm an sauren Seitenketten. Der C-terminale Bereich ist angereichert mit Arginin, wobei eine amphiphatische  $\beta$ -Faltblattstruktur möglich ist. Insgesamt hat eine typische Chloroplasten-Transitsequenz eine Länge von mehr als 50 Aminosäuren [153]. Die prognostizierte Peptidaseschnittstelle [136] zur Abspaltung eines möglichen Transitpeptides tritt bei *SoPFK1* bereits an Position 19 auf. Die Sequenz beginnt nicht mit MA sondern mit MG. Aufgrund der verkürzten Sequenz lässt sich kein eindeutiger Mittelteil erkennen. Am C-Terminus ist ebenso keine direkte Anhäufung an Arginin zu detektieren, womit das Enzym die vorgeschlagenen Kriterien nicht erfüllt [152, 164].

In *Arabidopsis thaliana* werden zwei mögliche Phosphofruktokinasen als plastidär lokalisiert beschrieben [96]. Für die Proteinsequenz von *At5g61580* wurde in der Dissertation von A. Moustroph (2005) eine plastidäre Lokalisierung des Enzyms, gegeben durch eine Fusion des Proteins mit einem C-terminalen Fluoreszenzfarbstoff, ermittelt [165]. Diese Sequenz beginnt am Start ebenfalls nicht mit MA sondern mit ME. Ein definierter mittlerer Teil kann bei dieser Sequenz nicht genau bestimmt werden. C-terminal kann ab Position 50 ein verstärktes Auftreten von Arginin detektiert werden [152, 164].

Insgesamt lässt sich anhand der bekannten Lokalisation von *At5g61580* und dessen kodierender Nukleotidsequenz in einem Beispiel die Gültigkeit dieser vermuteten Domänen größtenteils wiederlegen [152, 164]. Es ist von keiner definierten, oder bisher nicht ersichtlichen Primär- bzw. Sekundär-Struktur auszugehen.

Da *SoPFK1* typische Charakteristika eines plastidären Enzyms aufweist (siehe Abschnitt 3.12), und in einem phylogentischen Netzwerk neben plastidär kodierenden Sequenzen gruppiert (siehe Abschnitt 3.13), ist möglicherweise von einem unvollständigen Transitpeptid auszugehen. *SoPFK1* konnte nicht durch Rastern einer cDNA-Bibliothek detektiert werden (siehe Abschnitt 2.5.8.2), sondern musste mit Hilfe der RACE-PCR isoliert werden (siehe Abschnitt 2.5.10.1). Eine unzureichende Amplifikation mit einer daraus resultierenden unvollständigen 5'-Region wäre durchaus möglich. Es konnte für *SoPFK1* nur ein maximaler Bereich von 21 Nukleotiden in 5'-Richtung stromaufwärts vom

prognostizierten Startkodon sequenziert werden. Der weitere stromaufwärts liegende 5'-Bereich war in mehrmals wiederholten Sequenzierungen unleserlich und konnte selbst von der Firma Genterprise (GENTERprise GENOMICS, J.-J.-Becherweg 32, D-55099 Mainz) nach mehrmaligen Versuchen nicht eindeutig bestimmt werden. Für die folgenden 10 Nukleotide ließ sich nur sicher bestimmen, dass sie nicht für ein Methionin kodieren, womit ein eventuell weiter stromaufwärts liegendes Startkodon ausgeschlossen wurde. Aufgrund des offenen Leserahmens von 1509 Nukleotiden ergibt sich für *SoPFK1* eine kalkulierte Größe von 55,3 kDa. Inklusive der 21 sequenzierten Nukleotide stromaufwärts vom Startkodon ergibt sich eine Differenz zum gereinigten Protein von 4,1 kDa. Es wurde davon ausgegangen, dass diese Länge für ein vollständiges Transitpeptid ausreichend ist.

#### 4.8 Heterologe Gen-Expression in *S. cerevisiae*

Zur Funktionsanalyse und biochemischen Charakterisierung wurde das *SoPFK1*-Gen in einer *S. cerevisiae* *pfk1/2*-Nullmutante sowie in dem Expressionsstamm INVSc1 (siehe Abschnitt 2.2) heterolog exprimiert. Eine heterologe Expression in einem mutierten *E.coli*-Stamm (DF1020) wurde vermieden, da bereits erfolglose Ergebnisse auf diesem Wege für die Phosphofruktokinase aus *Dictyostelium discoideum* [172] beschrieben wurden. Eine unterstützende Vergleichsanalyse des Kodongebrauchs in Spinat, *S. cerevisiae* und *E.coli* ergab eine geringere Differenz zwischen Spinat und *S. cerevisiae* (5,81 %). *E. coli* weicht um 12,19 % von den häufig verwendeten Kodons gegenüber Spinat ab [173]. Eine Expression in *S. cerevisiae* ließ sich nur auf Ebene der Immunodetektion im Stamm INVSc1 nach C-terminaler Fusion mit einem HIS-Tag nachweisen. Den *S. cerevisiae* AST9-1B-Stamm konnte das pflanzliche Enzym nicht komplementieren (siehe Abschnitt 3.13), obwohl Komplementationen durch PFKs aus *Klyveromyces lactis*, *E.coli* und menschlichem Muskelgewebe bekannt sind [176]. Eine Präinkubation des Enzyms mit hohen Konzentrationen an ATP, beschrieben von Chi *et al.* für die heterolog exprimierte PFK aus *Entamoeba histolytica*, blieben ebenfalls erfolglos [25]. Für das pflanzliche Enzym können differierende, posttranslationale Modifikationen im Hefestamm Auswirkungen auf ein intaktes, heterolog exprimiertes Protein haben [166]. Aminosäuren für potentielle Acetylierungen der *SoPFK1* können in der Hefe andersartig erkannt werden und die Stabilität des Enzyms negativ beeinflussen. Computer-gestützte Prognosen durch das Programm „NetPhos 2.0“ erwägen mögliche Phosphorylierungsstellen von 6 Threonin-, 7 Tyrosin- und 18 Serin-Resten, welche die Aktivierung bzw. Inaktivierung des Enzyms hervorrufen können. Andersartige Modifikationen in der Hefe können auch eine Ursache für die mangelnde

Aktivität des Enzyms sein [177]. Es scheint allerdings eher wahrscheinlich, dass ein eventuell unvollständiges Transitpeptid eine korrekte Faltung und Strukturbildung des Proteins verhindert. Es wäre möglich, dass Interaktionsstellen für Regulation oder Aktivität sterisch blockiert wurden, wodurch eine stabile Expression, aber keine Aktivität des Proteins zu erklären ist.

#### 4.9 Der *SoPFK2* -Klon ist kein Zufallstreffer

Abschnitt 3.5 dokumentiert die erste Amplifikation und Subklonierung einer cDNA-Sonde, welche zum Rastern einer cDNA-Bibliothek aus *Spinacia oleracea* eingesetzt wurde. Anhand der Peptide fünf und sechs wurden aus den Bereichen TIDNDI und YIDPT zwei degenerierte Primer erstellt, die einen Teilabschnitt der *PFK*-Sequenz amplifizierten (siehe Abschnitt 2.1.9.1). Als orthologe Matrize wurde die Reis-*PFK*-Sequenz XP\_482597 verwendet, welche gleichzeitig den besten Treffer einer BLAST-Protein-Suche in der Genbank des NCBI (siehe Abschnitt 3.4) [132] darstellt. Eine potentielle falsche Orientierung der Primer wurde somit zuvor ausgeschlossen, und zusätzlich eine grobe Einschätzung der Amplifikatgröße gegeben. Aligniert man jedoch sämtliche bekannte *PFK*-Sequenzen aus Reis und Arabidopsis, so lässt sich feststellen, dass YIDPTY und TIDNDI als hoch konservierte Domänen vorliegen, und zwar für alle Phosphofruktokinasen der Gruppe I und II aus Abbildung 27 (At2g22480, At5g47820, At5g61580, At4g29220, At5g56630, At4g26270, At4g32840, NP914558, AAU10835.1, XP\_550650, BAD87031, AAV44044, BAD46334, XP\_472819, BAD29254, XP\_482597). In den möglichen PP<sub>i</sub>-PFKs und deren kodierenden Untereinheiten aus den Gruppen III und IV findet man das Motiv YIDPTY nicht. Das Motiv TIDNDI hingegen taucht in ähnlicher Form (TIDGD) bei den PP<sub>i</sub>-PFK Untereinheiten auf. Diese Motiv wurde bereits als konservierte Region beschrieben, welche in der Kosubstratspezifität involviert ist (siehe Abschnitt 1.4.1) [84, 85]. Bei den drei ATP-PFKs der Gruppe I (BAD46334, XP\_472819, At5g47810; Abb. 27) findet man eine leichte Variation des zweiten Motivs von TIDNDI zu TVDNDV. Es ist aber davon auszugehen, dass bei einer eventuellen, ähnlichen Sequenz in einer *PFK*-Sequenz aus Spinat eine oder zwei Aminosäureungenauigkeiten in der entsprechenden PCR toleriert würden (siehe Abschnitt 3.5).

Geht man davon aus, dass auch in Spinat mehrere für *PFKs* kodierende Gene vorliegen (zumindest für drei), so ist es sehr wahrscheinlich, dass mit dieser Primerkombination jede putative ATP-*PFK*, wenn nicht sogar PP<sub>i</sub>-*PFK*-Sequenz, amplifiziert werden könnte, zumal es sich hierbei um degenerierte Primer handelte (siehe Abschnitt 2.1.9.1). Dadurch wäre die Detektion von *SoPFK2* zu erklären, welche nicht identisch mit

dem gereinigtem Protein aus Abschnitt 3.1.1-3.2 ist. Da mit der Sonde aus Abschnitt 3.5 nur ein Signal nach Rastern einer cDNA-Bibliothek auftrat (siehe Abb. 12), ist anzunehmen, dass es sich hierbei um die einzige Sequenz im Genom von *Spinacia oleracea* handelt, wenn (1.) das Protein nicht unter einer regulierten Transkriptionskontrolle steht, unter der das Protein zum Zeitpunkt der mRNA-Isolierung nicht exprimiert wurde, oder (2.) die Qualität der repräsentierenden mRNA bzw. der cDNA unzureichend war, so dass das Gen nicht mit amplifiziert wurde.

Es ist also als zufällig anzusehen, dass die erste erstellte cDNA-Sonde ein Komplement der *SoPFK2* Sequenz darstellt. Unter variierenden PCR-Bedingungen wäre es voraussichtlich ebenso möglich gewesen, mit den hier benutzten Primern ein Fragment der *SoPFK1* oder vielleicht sogar einer dritten, unbekanntenen *PFK* zu amplifizieren.

Ebenso vorstellbar wäre ein auftretendes Gemisch an verschiedenen *PFK*-Klonen nach Transformation in den Sequenziervektor. Wären weitaus mehr Klone sequenziert worden, hätte man wahrscheinlich auch die *SoPFK1* detektieren können.

#### 4.10 Phylogenetische Analysen der *PFK*-Proteine

Im phylogenetischen Netzwerk der Abbildung 27 gruppiert die in dieser Arbeit gereinigte *SoPFK1* neben zwei Reis-*PFK*-Sequenzen und einer Arabidopsis-*PFK*-Sequenz. Die höchste Ähnlichkeit besteht zu der möglichen *PFK*-Sequenz BAD29254 aus *Oryza sativa*, wobei die Identität zu allen Sequenzen dieser Gruppe bei 69-71 % liegt. Betrachtet man ein isoliertes Alignment dieser Gruppe, so wird deutlich, dass insgesamt ab der Aminosäureposition 60 ein konservierter Bereich beginnt. Der davor liegende N-terminale Bereich ist bei den Sequenzen unterschiedlich lang. XP\_482597.1 und At2g22480 besitzen etwa 60 Aminosäuren vor diesem Bereich; BAD29254.1 und *SoPFK1* maximal die Hälfte. C-terminal ist das Spinat-Enzym gegenüber den anderen der Gruppe vier Aminosäuren länger. Insgesamt findet man in dieser Gruppe ab etwa der Aminosäureposition 146 zu 100 % konservierte Blöcke, die sich bis zum Stoppkodon erstrecken und abfolgende Bereiche von bis zu 14 Aminosäuren umfassen. Eine zum Zeitpunkt der Arbeit noch nicht publizierte, mögliche *PFK* Sequenz [175] aus dem „The Rice Annotation Project Database (RAP-DB)“ weist ebenfalls die Merkmale der beiden putativen, plastidär lokalisierten Proteine (At2g22480, XP\_482597) auf, und wird auch als solches durch Analyse-Software prognostiziert [133-135]. Somit würde eine weitere plastidäre Sequenz (BAF26474.1, *Oryza sativa*) die Gruppe II als Gruppe der Chloroplasten-*PFK*s manifestieren.

Als nächste verwandte Sequenzen aller in diesem Netzwerk (Abb. 27) gezeigten Proteine findet man PFKs aus *Entamoeba histolytica*, *Leishmania donovani* und *Trypanosoma brucei* [25, 86, 87], die in einem phylogenetischen Baum von Baptiste *et al.* (2003) in der Gruppe „X“ der atypischen PFKs aufgeführt sind [105]. Diese Proteine sind ausschließlich als Homotetramere mit Untereinheitsgrößen von etwa 50 kDa bekannt, vergleichbar mit der in dieser Arbeit gereinigten SoPFK1. Sie verwenden ebenso ATP als Kosubstrat und weisen die typische Aminosäurekomposition G<sub>104</sub> und K<sub>124</sub> der atypischen PFKs auf [105].

#### 4.11 Ausblick

In dieser Arbeit konnte trotz der hier erbrachten Ergebnisse nicht vollständig geklärt werden, ob es sich bei dem Enzym *SoPFK1* um ein plastidär oder cytosolisch lokalisiertes Protein handelt. Durch Immunodetektion (siehe Abschnitt 2.4.9) in gereinigten Chloroplasten [104] wäre eine Abgrenzung vom cytosolischen Isoenzym und somit eine spezifische Lokalisierung möglich. Bisher sind funktionelle Antikörper von Krüger *et al.* [143] für die Detektion der PFK aus Kartoffel beschrieben worden. Nach persönlicher Anfrage war es jedoch nicht mehr möglich diese anzufordern (siehe Abschnitt 4.3.1). Eine nachträgliche Produktion ist momentan auch nicht durchführbar, und nur *in spe* vorstellbar (Krüger, pers. Mitteilung).

Als förderlichste Ergänzung zu dieser Arbeit wäre eine erneute 5'-Sequenzierung von *SoPFK1* durchzuführen, um den vor dem Startkodon liegenden Bereich um mindestens weitere 150-200 Nukleotide zu komplementieren. Da die hier gewählten Methoden limitierende Ergebnisse erbrachten (siehe Abschnitt 2.5.7.7) wäre eine alternative Sequenzierung nach Motz *et al.* oder Fakhrai-Rad *et al.* [167, 168] denkbar. Sollte *SoPFK1* eine unvollständige Sequenz für ein eventuelles Transitpeptid besitzen, so wäre auf diesem Wege eine Komplementierung möglich.

Das entsprechende Enzym könnte erneut in heterologen Systemen exprimiert und weiter biochemisch charakterisiert werden. Dazu würde sich bei Zutreffen eines Transitpeptides die Expression in geeigneten Pflanzen wie *Arabidopsis thaliana* oder *Nicotina bentamiana* anbieten, um sicher zu stellen, dass eine Translokation in das Zielkompartiment gegeben ist. Ein geeignetes Proteinreinigungsverfahren würde sich durch C-terminale Fusion mit einem StrepII-Epitop, beschrieben, und erfolgreich mit pflanzlichen Proteinen praktiziert nach Witte *et al.*, anbieten [169]. Ebenso wäre eine C-terminale Fusion mit einem Fluoreszenzfarbstoff denkbar, der das Protein *in vivo* sichtbar machen könnte [170]. Im hypothetischen Falle eines cytosolischen Proteins wäre eine Expression im aktuell generierten *E.coli*-Stamm RL257 ( $MQ \Delta pfkB::FRT \Delta pfkA::FRT$ ) möglich [171].

Des Weiteren wären grundlegende Arbeiten zur PFK-Sequenz *SoPFK2* interessant. Da zu diesem Protein noch keine biochemischen Daten vorhanden sind, wäre eine der vorher genannten Expressionssysteme anzuwenden, um anschließend die Kosubstratspezifität, Lokalisierung und weitere biochemische Charakteristika zu bestimmen.

## 5 Zusammenfassung

Obwohl ATP-PFK eines der bedeutensten Enzyme im pflanzlichen Stoffwechsel ist, sind bisher keine Sequenzdaten für dieses Enzym (ATP-PFK; EC 2.7.1.11) in Genbanken zugänglich. In dieser Arbeit wurde das Enzym 309fach bis zur vollständigen, elektrophoretischen Homogenität gereinigt. Die Reinigung wurde mit DEAE-Sepharose, S-400 Gelfiltration, einem Saccharose-Gradienten, Reactive-Red Affinitätschromatographie, Mono-Q Anionentauscher und Hydroxylapatit Chromatographie erreicht. Unter nativen Bedingungen liegt die gereinigte ATP-PFK als Homotetramer vor, bestehend aus Untereinheiten von ~52 kDa. Das Enzym katalysiert mit einer spezifischen Aktivität von  $600 \text{ mU mg}^{-1}$ . Der  $K_m$ -Wert für ATP wurde mit  $81 \mu\text{M}$  bestimmt. Der  $K_m$ -Wert für D-Fru-6-P liegt bei  $1.7 \text{ mM}$ . Die gereinigte PFK zeigte in der finalen Präparation keinerlei Aktivität mit Pyrophosphat ( $\text{PP}_i$ ) als Phosphoryldonor. Da die ATP-PFK durch Zugabe von ortho-Phosphat inaktiviert wurde, ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um die plastidäre Isoform des Enzyms handelt [56]. Nach einer massenspektroskopischen Untersuchung des gereinigten Enzyms konnten insgesamt neun interne Peptidfragmente mikrosequenziert werden, aus deren Vorlage sich mittels geeigneter molekularbiologischer Techniken ein korrespondierender cDNA Klon (*SoPFK1*) erstellen ließ. Das Protein konnte heterolog immunologisch in einem *PFK*-defizienten Hefestamm detektiert werden; eine biochemische Aktivität ließ sich jedoch nicht messen. Obwohl eine *in silico* Analyse von *SoPFK1* keinerlei Transit-Peptid prognostiziert, gruppiert es sich in einem phylogenetischen Netzwerk in der Gruppe II der vermutlichen plastidären *PFKs* (siehe Abb. 27). Zum Zeitpunkt dieser Arbeit wurden sämtliche möglichen *PFK*-Enzyme aus Pflanzen in der Genbank des NCBI ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/)) als  $\text{PP}_i$ -abhängig vermutet. Hier konnte erstmals die Gensequenz für eine enzymatisch aktive ATP-PFK aus Pflanzen annotiert werden.

## 6 Summary

Despite its importance in plant metabolism, no sequences of higher plant ATP-dependent phosphofructokinase (ATP-PFK; EC 2.7.1.11) are annotated in the databases. In this work the enzyme was purified from spinach leaves to electrophoretic homogeneity. The purification protocol included DEAE-Sepharose, Sephacryl S-400 gel filtration, sucrose gradient, reactive-red dye affinity, Mono-Q and hydroxylapatite chromatography. The purified enzyme occurred under native conditions in a homotetrameric conformation with subunits of ~52 kDa and a specific activity of 600 mU mg<sup>-1</sup>. The  $K_m$ -value was determined as 81  $\mu$ M for ATP and 1.7 mM for D-Fru-6-P respectively. The purified enzyme was not activated by ortho-phosphate, but slightly inhibited instead, suggesting that it was the chloroplast isoform [56]. The sequences of nine tryptic peptides from the final protein preparation, which did not accept pyrophosphate (PP<sub>i</sub>) as a phosphoryl donor, were determined and a corresponding cDNA was cloned (*SoPFK1*). Expression of *SoPFK1* in *PFK*-deficient yeast cells yielded immunologically detectable protein but no detectable ATP-PFK activity. Despite of being absent of a predicted chloroplast transit peptide *SoPFK1* clustered within the class of PFK sequences that have been designated as group II in phylogenetic network (sketched in Fig. 27), concluding that putative chloroplast PFKs were accumulating there. This sequence of enzymatically active spinach ATP-PFK suggests that a large family of genomics-derived higher plant sequences currently annotated in the databases as putative PP<sub>i</sub>-dependent PFK by the measure of sequence similarity is misannotated with respect to the cosubstrate.

---

**7      Literatur**

- [001] **Mansour** (1972) Phosphofruktokinase, in: Horecker, B.L., Stadtman, E.R. (eds.), *Current Topics in Cell Regulation* 5, 1-46, Academic Press.
- [002] **Kengen, S.W., Tuininga, J.E., de Bok, F.A., Stams, A.J., de Vos, W.M.** (1995) Purification and characterization of a novel ADP-dependent glucokinase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus furiosus*. *J. Biol. Chem.* 270: 30453-7.
- [003] **Selig, M., Xavier, K.B., Santos, H., Schonheit, P.** (1997) Comparative analysis of Embden-Meyerhof and Entner-Doudoroff glycolytic pathways in hyperthermophilic archaea and the bacterium *Thermotoga*. *Arch Microbiol.* 167: 217-32.
- [004] **Hansen, T., Schonheit, P.** (2000) Purification and properties of the first-identified, archaeal, ATP-dependent 6-phosphofruktokinase, an extremely thermophilic non-allosteric enzyme, from the hyperthermophile *Desulfurococcus amylolyticus*. *Arch Microbiol.* 173: 103-109.
- [005] **Berg, Jeremy M., Tymoczko, John L., Stryer, Lubert** (2003) Biochemie. 5. Aufl. *Spektrum Akademischer Verlag*., Heidelberg.
- [006] **Ramaiah, A.** (1974) Pasteur effect and phosphofruktokinase *Curr. Top. Cell Reg.* 8: 297-345.
- [007] **Banuelos, M., Gancedo, C., Gancedo, J.M.** (1977) Activation by phosphate of yeast phosphofruktokinase. *The Journal of Biological Chemistry.* 252. 6394-6398.
- [008] **Van Schaftingen, E., Hers, H.G.** (1980) Synthesis of a stimulator of phosphofruktokinase, most likely fructose 2,6-bisphosphate, from phosphoric acid and fructose 6-phosphoric acid. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 96:1524-1531.
- [009] **Kirchberger, J., Edelmann, A., Kopperschlager, G., Heinisch, J.J.** (1999) A single point mutation leads to an instability of the hetero-octameric structure of yeast phosphofruktokinase. *Biochem. J.* 341 ( Pt 1):15-23.
- [010] **Kulkarni, G., Sabnis, N.A., Bhat, K.S., Harris, B.G.** (2005) Cloning and nucleotide sequence of a full-length cDNA encoding *Ascaris suum* phosphofruktokinase. *J. Parasitol.* 91: 585-90.
- [011] **Riquelme, P.T., Hosey, M.M., Marcus, F., Kemp, R.G.** (1978) Phosphorylation of muscle phosphofruktokinase by the catalytic subunit of cyclic AMP-dependent protein kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 85:1480-7.
- [012] **Kemp, R.G., Foe, L.G.** (1983) Allosteric regulatory properties of muscle phosphofruktokinase. *Mol. Cell Biochem.* 57: 147-54.
- [013] **Taucher, M., Kopperschlager, G., Hofmann, E.** (1975) Limited proteolysis of yeast phosphofruktokinase by subtilisin. Alterations in enzyme activity, subunit composition, and hydrodynamic properties. *Eur. J. Biochem.* 59: 319-25.
- [014] **Buschmeir, B.** (1985) Purification and properties of 1-PFK from *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 29: 231-235.
- [015] **Kotlarz, D., Buc, H.** (1977) Two *Escherichia coli* fructose-6-phosphate kinases. Preparative purification, oligomeric structure and immunological studies. *Biochim. Biophys. Acta.* 484: 35-48.
- [016] **Kotlarz, D., Buc, H.** (1981) Regulatory properties of phosphofruktokinase 2 from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* 117: 569-74.

- [017] **Daldal, F., Babul, J., Guixe, V., Fraenkel, D.G.** (1982) An alteration in phosphofructokinase 2 of *Escherichia coli* which impairs gluconeogenic growth and improves growth on sugars. *Eur. J. Biochem.* 126: 373-9.
- [018] **Reeves, R.E., South, D.J., Blytt, H.J. and Warren, L.G.** (1974) Pyrophosphate:D-fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase. A new enzyme with the glycolytic function of 6-phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 249: 7737-7741.
- [019] Weiner, H., Stitt, M. and Heldt, H.W. (1987) Subcellular compartmentation of pyrophosphate and alkaline pyrophosphatase in leaves. *Biochim. Biophys. Acta.* 893, 13-21.
- [020] **Davies, J.M., Poole, R.J., Sanders, D.** (1993) The computed free energy charge of hydrolysis of inorganic pyrophosphate and ATP: apparent significance for inorganic-pyrophosphate-driven reactions of intermediary metabolism. *Biochim. Biophys. Acta.* 1141: 29-36.
- [021] **Petzel, J.P., McElwain, M.C., DeSantis, D., Manolukas, J., Williams, M.V., Hartman, P.A., Allison, M.J., Pollack, J.D.** (1989) Enzymic activities of carbohydrate, purine, and pyrimidine metabolism in the Anaero-plasmataceae (class Mollicutes). *Arch. Microbiol.* 152: 309-16.
- [022] **Mertens, E.** (1991) Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase, an anaerobic glycolytic enzyme? *FEBS Lett.* 285: 1-5.
- [023] **Zimmermann, G., Kelly, G.J., Latzko, E.** (1978) Purification and properties of spinach leaf cytoplasmic fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.* 253: 5952-5956.
- [024] **Kemp, R.G. and Tripathi, R.L.** (1993) Pyrophosphate-dependent phosphofructo-1-kinase complements fructose-1,6-bisphosphatase but not phosphofructokinase deficiency in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175: 5723-5724.
- [025] **Chi, A.S., Deng, Z., Albach, R.A., Kemp, R.G.** (2001) The two phosphofructokinase gene products of *Entamoeba histolytica*. *J. Biol. Chem.* 276: 19974-19981.
- [026] **Mertens, E., De Jonckheere, J., Van Schaftingen, E.** (1993) Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from the amoeba *Naegleria fowleri*, an AMP-sensitive enzyme. *Biochem. J.* 292 (Pt 3): 797-803.
- [027] **Alves, A.M., Euverink, G.J., Santos, H., Dijkhuizen, L.** (2001) Different physiological roles of ATP- and PP(i)-dependent phosphofructokinase isoenzymes in the methylophilic actinomycete *Amycolatopsis methanolica*. *J. Bacteriol.* 183: 7231-40.
- [028] **Ding, Y-H.R., Ronimus, R.S., Morgan, H.W.** (2001) *Thermotoga maritima* phosphofructokinases: Expression and characterization of two unique enzymes. *J. Bacteriol.* 183: 791-794.
- [029] **Stephens, R.S., Kalman, S., Lammel, C., Fan, J., Marathe, R., Aravind, L., Mitchell, W., Olinger, L., Tatusov, R.L., Zhao, Q., Koonin, E.V., Davis, R.W.** (1998) Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: *Chlamydia trachomatis*. *Science.* 282: 754-9.
- [030] **Garland, W.J., Dennis, D.T.** (1980) Plastid and cytosolic phosphofructokinase from the developing endosperm of *Ricinus communis*. I. Separation, purification and initial characterisation of the isoenzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 204: 302-309.
- [031] **Kelly, G.J., Latzko, E.** (1977) Chloroplast Phosphofructokinase I. Proof of Phosphofructokinase activity in chloroplasts *Plant Physiol.* 60: 290-294.
- [032] **Garland, W.J. and Dennis, D.T.** (1980) Separation, purification and initial characterization of isoenzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* 204: 35-317.

- [033] **Botha, F.C., Dennis, D.T.** (1987) Phosphoglyceromutase activity and concentration in the endosperm of developing and germinating *Ricinus communis* seeds. *Can. J. Bot.* 65: 1908-1912.
- [034] **Plaxton, W.C.** (1996) The organization and regulation of plant glycolysis. *Annu. Rev. Plant Physiol. / Plant Mol. Biol.* 47: 185-214.
- [035] **Carlisle, S.M., Blakeley, S.D., Hemmingsen, S.M., Trevanion, S.J., Hiyoshi, T., Kruger, N.J., Dennis, D.T.** (1990) Pyrophosphate-dependent phosphofructokinase. Conservation of protein sequence between the alpha- and beta-subunits and with the ATP-dependent phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 265: 18366-71.
- [036] **Kapri, R.E., Dahan, A., Sadka, U., Zehavi, Goren R.** (2000) Cloning and characterization of PPI-phosphofructokinase from citrus fruit. *Goren, R and E.E.Goldschmidt, (eds). Acta Hortic.* 535: 113-118.
- [037] **Suzuki, J., Mutton, M.A., Ferro, M.I.T., Lemos, M.V.F., Pizauro, F.M., Mutton, M.J.R., DiMauro, S.M.Z.** (2003) Putative pyrophosphate phosphofructose 1-kinase genes identified in sugar cane may be getting energy from pyrophosphate. *Genet. Mol. Res.* 2: 376-382.
- [038] **Nielsen T.H.** (1994) Pyrophosphate:fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase from barley seedlings. Isolation, subunit composition and kinetic characterization. *Physiol. Plant* 92: 311-321.
- [039] **Kombrink, E., Kruger, N.J.** (1984a) Inhibition by metabolic intermediates of pyrophosphate:fructose 6-phosphate phosphotransferase from germinating castor bean endosperm. *Z. Pflanzenphysio.* 114: 443-453.
- [040] **Kombrink, E., Kruger, N.J., Beevers, H.** (1984b) Kinetic properties of pyrophosphate:fructose 6-phosphate phosphotransferase from germinating castor bean endosperm. *Plant Physiol.* 74: 395-401.
- [041] **Podesta, F.E., Plaxton, W.C.** (1994) Regulation of cytosolic carbon metabolism in germinating *Ricinus communis* cotyledons. I. Developmental profiles for the activity, concentration, and molecular structure of the pyrophosphate- and ATP-dependent phosphofructokinases, phosphoenolpyruvate carboxylase and pyruvate kinase. *Planta* 194: 374-380.
- [042] **Carnal, N.W., Black, C.C.** (1979) Pyrophosphate dependent 6-phosphofructokinase, a new glycolytic enzyme in pineapple leaves. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 86: 20-26.
- [043] **Tripodi, K.E.J., Podesta, F.E.** (1997) Purification and structural and kinetic characterization of the pyro-phosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase from the crassulacean acid metabolism plant, pineapple. *Plant Physiol.* 113: 779-786.
- [044] **Botha, A.M., Botha, F.C.** (1991) Pyrophosphate dependent phosphofructokinase of *Citrullus lanatus*: molecular forms and expression of subunits. *Plant Physiol* 96: 1185-1192.
- [045] **Botha, A.M., Botha, F.C.** (1993) Effect of the radicle, and hormones on the subunit composition and molecular form of pyrophosphate-dependent phosphofructokinase in the cotyledons of *Citrullus lanatus*. *J. Plant Physiol.* 20: 265-273.
- [046] **Botha, A.M., Botha, F.C.** (1993) Induction of pyrophosphate-dependent phosphofructokinase in watermelon (*Citrullus lanatus*) cotyledons coincides with insufficient cytosolic D-fructose-1,6-bisphosphate 1-phosphohydrolase to sustain gluconeogenesis. *Plant Physiol.* 101: 1385-1390.
- [047] **Theodorou, M.E., Cornel, F.A., Duff, S.M., Plaxton, W.C.** (1992) Phosphate starvation-inducible synthesis of the alpha-subunit of the pyrophosphate-dependent phosphofructokinase in black mustard suspension cells. *J. Biol. Chem.* 267: 21901-21905.

- [048] **Theodorou, M.E., Plaxton, W.C.** (1996) Purification and characterization of pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from phosphate-starved *Brassica nigra* suspension cells. *Plant Physiol.* 112: 343-351.
- [049] **Turner, W.L., Plaxton, W.C.** (2003) Purification and characterization of pyrophosphate- and ATP-dependent phosphofructokinase from banana fruit. *Planta* 217: 113-121.
- [050] **Kruger, Nicholas J. and Dennis, David T.** (1987) Molecular properties of Pyrophosphate: Fructose-6-Phosphate Phosphotransferase from Potato Tuber. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 256: 273-279.
- [051] **Yan, T.J., Tao, M.** (1984) Multiple forms of pyrophosphate: D-Fructose-6- phosphate 1-Phosphotransferase from wheat seedlings. *Journal of Biological Chemistry* 259: 5087-5092.
- [052] **Theodorou, M.E. and Kruger, N.J.** (2001) Physiological relevance of fructose 2,6-bisphosphate in the regulation of spinach leaf pyrophosphate:fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase. *Planta* 213: 147-57.
- [053] **Häusler, R.E., Holtum, J.A.M., Latzko, E.** (1989) Cytosolic Phosphofructokinase from Spinach Leaves I. Purification, Characteristics and Regulation. *Plant. Physiol.* 90, 1498-1505.
- [054] **Wong, J.H., Yee, B.C., Buchanan, B.B.** (1987) A novel type of phosphofructokinase from plants. *J. Biol. Chem.* 262: 3185-3191.
- [055] **Kruger, Nicholas J. and Hammond, Burrell, M.M.** (1988) Molecular characterization of four forms of Phosphofructokinase from potato tuber *Archives of Biochemistry and Biophysics* 267: 690-700.
- [056] **Latzko, E., Kelly, G.J.** (1975) Evidence for phosphofructokinase in chloroplasts. *Nature* 256: 429-430.
- [057] **Cséke, C., Nishizawa, A.N., Buchanan, B.B.** (1982) Modulation of Chloroplast Phosphofructokinase by NADPH : A Mechanism for Linking Light to the Regulation of Glycolysis. *Plant Physiol.* 70: 658-661.
- [058] **Vella, J. and Copeland, L.** (1993) Phosphofructokinase from the host fraction of soybean nodules. *Journal of Plant Physiology* 141: 398-404.
- [059] **Isaac, J.E. and Rhodes, M.J.C.** (1982) Purification and general properties of phosphofructokinase from *Lycopersicon esculentum* fruits. *Phytochemistry* 21: 1553-1556.
- [060] **Cawood, M.E., Botha, F.C., Small, J.G.C.** (1988) Molecular properties of the ATP: D-fructose-phosphate 1 phosphotransferase isoenzymes from *Cucumis sativus*. *Plant. Cell. Physiol.* 29: 195-199.
- [061] **Häusler, R.E., Holtum, J.A.M., Latzko, E.** (1987) Cytosolic ATP-Dependent Phosphofructokinase from Spinach *Plant Physiol.* 84: 205-207.
- [062] **Häusler, R.E., Holtum, J.A.M., Latzko E.** (1989) Cytosolic Phosphofructokinase from Spinach Leaves II. Affinity for Mg<sup>2+</sup> and Nucleoside phosphates. *Plant Physiol.* 90: 1506-1512.
- [063] **Knowles, V.L., Greyson, M.F., Dennis, D.T.** (1990) Chatacterization of ATP-dependent fructose 6-phosphate 1-phosphotrasferase from leaf and endosperm tissues of *Ricinus communis*. *Plant Physiol.* 92:155-159.
- [064] **Bloxham, D.P., Lardy, H.A.** (1973) Phosphofructokinase In: *PD Boyer, ed, The Enzymes, Vol. 8 Academic Press, New York*, pp. 239-278.
- [065] **Isaac, J.E., Rhodes, M.J.C.** (1986) Phosphofructokinase from *Lycopersicon esculentum* fruits – I. Kinetic properties in relation to its substrates. *Phytochemistry* 25: 339-343.

- [066] **Mavus, R.D., Stellwagen, E.** (1970) The role of cations in yeast phosphofructokinase catalysis. *J. Biol. Chem.* 245: 674-680.
- [067] **Etiemble, J., Simeon, J., Picat, C., Boivin, P.** (1981) Influence of free  $Mg^{2+}$  on the kinetics of human erythrocyte phosphofructokinase. *Biochimie.* 63: 61-5.
- [068] **Uyeda, K.** (1979) Phosphofructokinase. *Adv. Enzymol* 48: 193-243.
- [069] **Kelly, G.J., Lutzko, E.** (1977) Chloroplast Phosphofructokinase II. Partial purification, kinetic and regulatory properties *Plant Physiol.* 60: 295-299.
- [070] **Lee, H.S., Copeland, L.** (1996) Phosphofructokinase from the host fraction of chickpea nodules. *Physiol Plantarum* 96: 607-614.
- [071] **Van Schaftingen, E.** (1987) Fructose-2,6-bisphosphate. *Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol.* 59: 315-395.
- [072] **Okar, D.A. and Lange, A.J.** (1999) Fructose-2,6-bisphosphate and control of carbohydrate metabolism in eukaryotes. *Biofactors* 10: 1-14.
- [073] **Stitt, M.** (1990) Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 153-185.
- [074] **Cseke, C., Weeden, N.F., Buchanan, B.B., Uyeda, K.** (1982) A special fructose bisphosphate functions as a cytoplasmic regulatory metabolite in green leaves. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79: 4322-4326.
- [075] **Kato-Noguchi, H., Watada, A.E.** (1996) Low-oxygen atmosphere increases fructose-2,6-bisphosphatase in fresh-cut carrots. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 121: 307-309.
- [076] **Kato-Noguchi, H.** (2002) The catalytic direction of pyrophosphate: fructose 6-phosphate 1-phosphotransferase in rice coleoptiles in anoxia. *Physiol. Plant* 116: 345-350.
- [077] **Huber, S.C.** (1986) Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory metabolite in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 37: 233-246.
- [078] **Chang, S.H., Kemp, R.G.** (2002) Role of Ser<sub>530</sub>, Arg<sub>292</sub>, and His<sub>662</sub> in the allosteric behavior of rabbit muscle phosphofructokinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 290: 670-675.
- [079] **Van Praag, E.** (1997) Use of 3-D computer modelling and kinetic studies to analyse grapefruit pyrophosphate-dependent phosphofructokinase. *Int. J. Biol. Macromol.* 21: 307-17.
- [080] **Botha, F.C., Turpin, D.H.** (1990) Molecular, kinetic and immunological properties of the 6-phosphofructokinase from the green alga *Selenastrum minutum*. *Plant Physiol.* 93: 871-879.
- [081] **Van Schaftingen, E., Lederer, B., Bartrons, R., Hers, H.G.** (1982) A kinetic study of pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase from potato tubers. Application to a microassay of fructose-2,6-bisphosphate. *Eur. J. Biochem.* 129: 191-5.
- [082] **Podesta, F.E., Plaxton, W.C.** (2003) Fluorescence study of ligand binding to potato tuber pyrophosphate-dependent phosphofructokinase: evidence for competitive binding between fructose-1,6-bisphosphate and fructose-2,6-bisphosphate. *Arch. Biochem. Biophys.* 414: 101-7.
- [083] **Balogh, A., Wong, J. H., Wotzel, C., Soll, J., Cseke, C., Buchanan, B. B.** (1984) Metabolite-mediated catalyst conversion of PFK and PFP: a mechanism of enzyme regulation in green plants. *FEBS Lett.* 169: 287-292.
- [084] **Chi, A., Kemp, R.G.** (2000) The primordial high energy compound: ATP or inorganic pyrophosphate? *J. Biol. Chem.* 275: 35677-35679.

- [085] **Moore, S.A., Ronimus, R.S., Roberson, R.S., Morgan, H.W.** (2002) The structure of a pyrophosphate-dependent phosphofructokinase from the Lyme disease spirochete *Borrelia burgdorferi*. *Structure (Camb.)* 10: 659-671.
- [086] **Lopez, C., Chevalier, N., Hannaert, V., , D.J., Michels, P.A., Ramirez, J.L.** (2002) *Leishmania donovani* phosphofructokinase. Gene characterization, biochemical properties and structure- modeling studies. *Eur. J. Biochem.* 269: 3978-3989.
- [087] **Claustre, S., Denier, C., Lakhdar-Ghazal, F., Lougare, A., Lopez, C., Chevalier, N., Michels, P.A., Perie, J., Willson, M.** (2002) Exploring the active sites of *Trypanosoma brucei* phosphofructokinase by inhibition studies: specific irreversible inhibition. *Biochemistry* 41: 10183-10193.
- [088] **Alves, A.M.C.R., Euverink, G.J.W., Bibb, M.J., Dijkhuizen, L.** (1997) Identification of ATP-dependent phosphofructokinase as a regulatory step in the glycolytic pathway of the actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 956-961.
- [089] **Shirakihara, Y., Evans, P.R.** (1988) Crystal structure of the complex of phosphofructokinase from *Escherichia coli* with its reaction products. *J. Mol. Biol.* 204: 973-994.
- [090] **Sasaki, T., Matsumoto, T., Yamamoto, K., Sakata, K., Baba, T., Katayose, Y., Wu, J., Niimura, Y., Cheng, Z., Nagamura, Y., Antonio, B.A., Kanamori, H., Hosokawa, S., Masukawa, M., Arikawa, K., Chiden, Y., Hayashi, M., Okamoto, M., Ando, T., Aoki, H., Arita, K., Hamada, M., Harada, C., Hijishita, S., Honda, M., Ichikawa, Y., Idonuma, A., Iijima, M., Ikeda, M., Ikeno, M., Ito, S., Ito, T., Ito, Y., Ito, Y., Iwabuchi, A., Kamiya, K., Karasawa, W., Katagiri, S., Kikuta, A., Kobayashi, N., Kono, I., Machita, K., Maehara, T., Mizuno, H., Mizubayashi, T., Mukai, Y., Nagasaki, H., Nakashima, M., Nakama, Y., Nakamichi, Y., Nakamura, M., Namiki, N., Negishi, M., Ohta, I., Ono, N., Saji, S., Sakai, K., Shibata, M., Shimokawa, T., Shomura, A., Song, J., Takazaki, Y., Terasawa, K., Tsuji, K., Waki, K., Yamagata, H., Yamane, H., Yoshiki, S., Yoshihara, R., Yukawa, K., Zhong, H., Iwama, H., Endo, T., Ito, H., Hahn, J.H., Kim, H.I., Eun, M.Y., Yano, M., Jiang, J., Gojobori, T.** (2002) The genome sequence and structure of rice chromosome 1. *Nature.* 420: 312-6.
- [091] **Yu, J., Hu, S., Wang, J., Wong, G.K., Li, S., Liu, B., Deng, Y., Dai, L., Zhou, Y., Zhang, X., Cao, M., Liu, J., Sun, J., Tang, J., Chen, Y., Huang, X., Lin, W., Ye, C., Tong, W., Cong, L., Geng, J., Han, Y., Li, L., Li, W., Hu, G., Huang, X., Li, W., Li, J., Liu, Z., Li, L., Liu, J., Qi, Q., Liu, J., Li, L., Li, T., Wang, X., Lu, H., Wu, T., Zhu, M., Ni, P., Han, H., Dong, W., Ren, X., Feng, X., Cui, P., Li, X., Wang, H., Xu, X., Zhai, W., Xu, Z., Zhang, J., He, S., Zhang, J., Xu, J., Zhang, K., Zheng, X., Dong, J., Zeng, W., Tao, L., Ye, J., Tan, J., Ren, X., Chen, X., He, J., Liu, D., Tian, W., Tian, C., Xia, H., Bao, Q., Li, G., Gao, H., Cao, T., Wang, J., Zhao, W., Li, P., Chen, W., Wang, X., Zhang, Y., Hu, J., Wang, J., Liu, S., Yang, J., Zhang, G., Xiong, Y., Li, Z., Mao, L., Zhou, C., Zhu, Z., Chen, R., Hao, B., Zheng, W., Chen, S., Guo, W., Li, G., Liu, S., Tao, M., Wang, J., Zhu, L., Yuan, L., Yang, H.** (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science.* 296: 79-92.
- [092] **Tyagi, A.K., Khurana, J.P., Khurana, P., Raghuvanshi, S., Gaur, A., Kapur, A., Gupta, V., Kumar, D., Ravi, V., Vij, S., Khurana, P., Sharma, S.** (2004) Structural and functional analysis of rice genome. *J. Genet.* : 79-99.
- [093] **Wing, R.A., Ammiraju, J.S., Luo, M., Kim, H., Yu, Y., Kudrna, D., Goicoechea, J.L., Wang, W., Nelson, W., Rao, K., Brar, D., Mackill, D.J., Han, B., Soderlund, C., Stein, L., SanMiguel, P., Jackson, S.** (2005) The oryza map alignment project: the golden path to unlocking the genetic potential of wild rice species. *Plant Mol Biol.* 59: 53-62.

[094] **The Arabidopsis Genome Initiative (AGI):**

## Genome Sequencing Groups

**Samir Kaul, Hean L. Koo, Jennifer Jenkins, Michael Rizzo, Timothy Rooney, Luke J. Tallon, Tamara Feldblyum, William Nierman, Maria-Ines Benito, Xiaoying Lin, Christopher D. Town, J. Craig Venter & Claire M. Fraser** *The Institute for Genomic Research, 9712 Medical Centre Drive, Rockville, Maryland 20850, USA*

**Satoshi Tabata, Yasukazu Nakamura, Takakazu Kaneko, Shusei Sato, Erika Asamizu, Tomohiko Kato, Hirokazu Kotani & Shigemi Sasamoto**  
*Kazusa DNA Research Institute, 1532-3 Yana, Kisarazu, Chiba 292, Japan*

**Joseph R. Ecker<sup>1\*</sup>, Athanasios Theologis<sup>2\*</sup>, Nancy A. Federspiel<sup>3\*</sup>, Curtis J. Palm<sup>3</sup>, Brian I. Osborne<sup>2</sup>, Paul Shinn<sup>1</sup>, Aaron B. Conway<sup>3</sup>, Valentina S. Vysotskaia<sup>2</sup>, Ken Dewar<sup>1</sup>, Lane Conn<sup>3</sup>, Catherine A. Lenz<sup>2</sup>, Christopher J. Kim<sup>1</sup>, Nancy F. Hansen<sup>3</sup>, Shirley X. Liu<sup>2</sup>, Eugen Buehler<sup>1</sup>, Hootan Altafi<sup>3</sup>, Hitomi Sakano<sup>2</sup>, Patrick Dunn<sup>1</sup>, Bao Lam<sup>3</sup>, Paul K. Pham<sup>2</sup>, Qimin Chao<sup>1</sup>, Michelle Nguyen<sup>3</sup>, Guixia Yu<sup>2</sup>, Huaming Chen<sup>1</sup>, Audrey Southwick<sup>3</sup>, Jeong Mi Lee<sup>2</sup>, Molly Miranda<sup>3</sup>, Mitsue J. Toriumi<sup>2</sup>, Ronald W. Davis<sup>3</sup>** <sup>1</sup>, *Plant Science Institute, Department of Biology, University of Pennsylvania, Philadelphia, Pennsylvania 19104 USA*; <sup>2</sup>, *Plant Gene Expression Center/ USDA-U.C.Berkeley, 800 Buchanan Street, Albany, California 94710, USA*; <sup>3</sup>, *Stanford Genome Technology Center, 855 California Avenue, Palo Alto, California 94304, USA*. \*These authors contributed equally to this work. <sup>2</sup> Present addresses: *The Salk Institute for Biological Studies, 10010 North Torrey Pines Road, La Jolla, California 92037, USA (J.R.E.)*; *Exelixis, Inc., 170 Harborway, P.O. Box 511, South San Francisco, California 94083-0511, USA (N.A.F)*

European Union Chromosome 4 and 5 Sequencing Consortium: **R. Wambutt<sup>1</sup>, G. Murphy<sup>2</sup>, A. Düsterhöft<sup>3</sup>, W. Stiekema<sup>4</sup>, T. Pohl<sup>5</sup>, K.-D. Entian<sup>6</sup>, N. Terry<sup>7</sup>, G. Volckaert<sup>8</sup>**  
<sup>1</sup>, *AGOWAGmbH, GlienickeWeg 185, D-12489 Berlin, Germany*; <sup>2</sup>, *John Innes Centre, Colney Lane, Norwich NR47UH, UK*; <sup>3</sup>, *QIAGEN GmbH, Max-Volmer-Str. 4, D-40724 Hilden, Germany*; <sup>4</sup>, *Greenomics, Plant Research International, Droevendaalsleeg 1, NL 6700, AAWageningen, The Netherlands*; <sup>5</sup>, *GATC GmbH, Fritz-Arnold Strasse 23, D-78467 Konstanz, Germany*; <sup>6</sup>, *SRD GmbH, Oberurseler Str. 43, Oberursel 61440, Germany*; <sup>7</sup>, *Department for Plant Genetics, (VIB), University of Gent, K.L. Ledeganckstraat 35, B-9000 Gent, Belgium*; <sup>8</sup>, *Katholieke Universiteit Leuven, Laboratory of Gene Technology, Kardinaal Mercierlaan 92, B-3001 Leuven, Belgium*

European Union Chromosome 3 Sequencing Consortium: **M. Salanoubat<sup>1</sup>, N. Choisne<sup>1</sup>, M. Rieger<sup>2</sup>, W. Ansorge<sup>3</sup>, M. Unsel<sup>4</sup>, B. Fartmann<sup>5</sup>, G. Valle<sup>6</sup>, F. Artiguenave<sup>1</sup>, J. Weissenbach<sup>1</sup>, F. Quetier<sup>1</sup>** <sup>1</sup>, *Genoscope and CNRS FRE2231, 2 rue G. Crémieux, 91057 Evry Cedex, France*; <sup>2</sup>, *Genotype GmbH Angelfhofweg 39, D-69259Wilhelmshfeld, Germany*; <sup>3</sup>, *European Molecular Biology Laboratory, Biochemical Instrumentation Program, Meyerhofstr. 1, D-69117 Heidelberg, Germany*; <sup>4</sup>, *LION Bioscience AG, Im Neuenheimer Feld 515-517, 69120 Heidelberg, Germany*; <sup>5</sup>, *MWG-Biotech AG, Anzinger Strasse 7a, 85560 Ebersberg, Germany*; <sup>6</sup>, *CRIBI, Università di Padova, via G. Colombo 3, Padova 35131, Italy*

The Cold Spring Harbor and Washington University Genome Sequencing Center Consortium: **Richard K. Wilson<sup>1</sup>, Melissa de la Bastide<sup>2</sup>, M. Sekhon<sup>1</sup>, Emily Huang<sup>2</sup>, Lori Spiegel<sup>2</sup>, Lidia Gnoj<sup>2</sup>, K. Pepin<sup>1</sup>, J. Murray<sup>1</sup>, D. Johnson<sup>1</sup>, Kristina Habermann<sup>2</sup>, Neilay Dedhia<sup>2</sup>, Larry Parnell<sup>2</sup>, Raymond Preston<sup>2</sup>, L. Hillier<sup>1</sup>, Ellson Chen<sup>3</sup>, M. Marra<sup>2</sup>, Robert Martienssen<sup>4</sup>, W. Richard McCombie<sup>2</sup>** <sup>1</sup>, *Washington University Genome Sequencing Center Washington University in St Louis School of Medicine, 4444 Forest Park Blvd., St. Louis, Missouri 63108 USA*; <sup>2</sup>, *Lita Annenberg Hazen Genome Center, Cold Spring HarborLaboratory, Cold Spring Harbor, New York 11724, USA*; <sup>3</sup>, *Celera Genomics, 850 Lincoln Center Drive, Foster City, California 94494, USA*; <sup>4</sup>, *Plant Biology Group, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 11724, USA*

## Genome Analysis Group:

Klaus Mayer<sup>1\*</sup>, Owen White<sup>2\*</sup>, Michael Bevan<sup>3</sup>, Kai Lemcke<sup>1</sup>, Todd H. Creasy<sup>2</sup>, Cord Bielke<sup>2</sup>, Brian Haas<sup>1</sup>, Dirk Haase<sup>1</sup>, Rama Maiti<sup>2</sup>, Stephen Rudd<sup>1</sup>, Jeremy Peterson<sup>2</sup>, Heiko Schoof<sup>1</sup>, Dimitrij Frishman<sup>1</sup>, Burkhard Morgenstern<sup>1</sup>, Paulo Zaccaria<sup>1</sup>, Maria Ermolaeva<sup>2</sup>, Mihaela Pertea<sup>2</sup>, John Quackenbush<sup>2</sup>, Natalia Volfvsky<sup>2</sup>, Dongying Wu<sup>2</sup>, Todd M. Lowe<sup>4</sup>, Steven L. Salzberg<sup>2</sup>, Hans-Werner Mewes<sup>1</sup> 1, *GSF-Forschungszentrum f. Umwelt u. Gesundheit*, Munich Information Center for Protein Sequences, am Max-Planck-Institut f. Biochemie, Am Klopferspitz 18a, D-82152, Germany; 2, *The Institute for Genomic Research*, 9712Medical Center Drive, Rockville, Maryland 20850, USA; 3, *Molecular Genetics Department*, John Innes Centre, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, UK; 4, *Dept Genetics*, StanfordUniversityMedical School, Stanford, California 94305-5120, USA.

\* Diese Autoren haben ebenfalls zu der Arbeit beigetragen.

- [095] **Arabidopsis Genome Initiative.** (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature*. 410: 299.
- [096] **Nielsen, T.H., Rung, J.H., Villadsen, D.** (2004) Fructose-2,6-bisphosphate: a traffic signal in plant metabolism. *Trends Plant Sci.* 9: 556-63.
- [097] **Gottlieb, L.D.** (1982) Conservation and duplication of isoenzymes in plants. *Science* 216: 373-380.
- [098] **Weeden, N.F.** (1981) Genetic and biochemical Implications of the endosymbiotic origin of the chloroplast *J. Mol. Evol.* 17: 133-139.
- [099] **Goksøyr, J.** (1967) Evolution of eucaryotic cells. *Nature* 214: 1161.
- [100] **Martin, W., Rujan, T., Richly, E., Hansen, A., Cornelsen, S., Lins, T., Leister, D., Stoebe, B., Hasegawa, M., Penny, D.** (2002) Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 99: 12246-51.
- [101] **Poorman, R.A., Randolph, A., Kemp, R.G., Henrikson, R.L.** (1984) Evolution of phosphofructo-kinase-gene duplication and creation of new effector sites. *Nature* 309: 467-9.
- [102] **Heinisch, J., Ritzel, R.G., von Borstel, R.C., Aguilera, A., Rodicio, R., Zimmermann, F.K.** (1989) The phosphofructokinase genes of yeast evolved from two duplication events. *Gene* 78: 309-21.
- [103] **Todd, J.F., Blakeley, S.D., Dennis, D.T.** (1995) Structure of the genes encoding the alpha- and beta-subunits of castor pyrophosphate-dependent phosphofructokinase. *Gene* 152: 181-6.
- [104] **Bartlett, S. G., Grossman, A. R., Chua, N. H.** (1982) Methods in Chloroplast. *Molecular Biology* (ed. Edelman, M.) 1081–1091.
- [105] **Baptiste, E., Moreira, D., Philippe, H.** (2003) Rampant horizontal genetransfer and phospho-donor change in the evolution of the phosphofructokiase. *Gene* 318: 185-191.
- [106] **Siebers, B., Klenk, H.P., Hensel, R.** (1998). PP<sub>i</sub>-dependent phosphofructokinase from *Thermoproteus tenax*, an archaeal descendant of an ancient line in phosphofructokinase evolution. *J. Bacteriol.* 180: 2137-2143.
- [107] **Müller, M., Lee, J.A., Gordon, P., Gaasterland, T., Sensen, C.W.** (2001) Presence of procaryotic and eukaryotic species in all subgroups of the pp<sub>i</sub>-dependent group II phosphofructokinase protein family. *J. Bacteriol.* 183: 6714-6716.
- [108] **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.

- [109] **Michels, P.A.M., Chevalier, N., Oppendoes, F.R., Rider, M.H., Rigden, D.** (1997) The glycosomal ATP-dependent phosphofructokinase of *Trypanosoma brucei* must have evolved from an ancestral pyrophosphate dependent enzyme. *Eur.J.Biochem.* 250:698-704.
- [110] **Emanuelsson, O., Nielsen, H., Heijne, G.** (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci.* 8, 978-984.
- [111] **Laemmli, U.K.** (1970) Cleavages of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685.
- [112] **Watson, D.H., Harvey, M.J., Dean, P.D.** (1978) The selective retardation of NADP<sup>+</sup>-dependent dehydrogenases by immobilized procion red HE-3B. *Biochem J.* 173: 591-6.
- [114] **Eisenschenk FC, Houle JJ, Hoffmann EM.** (1992) Purification of the ninth component of the bovine complement cascade. *Am. J. Vet. Res.* 53: 435-9.
- [114] **Porath J., Carlsson J., Olsson I., Belfrage G.** (1975) Metal chelate affinity chromatography, a new approach to protein fractionation. *Nature* 258: 598-9.
- [115] **Arvanitidis A., Heinisch J. J.** (1994) Studies on the function of yeast phosphofructokinase subunits by *in vitro* mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 269: 8911-8.
- [116] **Jensen, O.N., Wilm, M., Schevchenko, A., Mann, M.** (1998) Sample preparation methods for mass spectrometric peptide mapping directly from 2D gels. *Methods in Molecular biology* 112: 513-530.
- [117] **Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York.
- [118] **Neuhoff V., Arold N., Taube D., Ehrhardt W.** (1988) Improved staining of proteins in polyacrylamide gels including isoelectric focusing gels with clear background at nanogram sensitivity using Coomassie Brilliant Blue G-250 and R-250. *Electrophoresis.* 9: 255-62.
- [119] **Heukeshoven J, Dernick R.** (1988) Increased sensitivity for Coomassie staining of sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels using Phast System Development Unit. *Electrophoresis.* 9: 60-1.
- [120] **Blum, H., Beier H., Gross H.J.** (1987) Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. *Electrophoresis* 8: 93-99.
- [121] **Gharahdaghi F., Weinberg C.R., Meagher D.A., Imai B.S., Mische S.M.** (1999) Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. *Electrophoresis.* 20: 601-5.
- [122] **Kyhse-Andersen J.** (1984) Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Methods.* 10: 203-9.
- [123] **Fink, G.R., Hicks, J.B., Sherman, F.** (1983) *Methods in yeast genetics.* Laboratory manual, Cold Spring Harbour Laboratory, New York
- [124] **Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R.** (1977) DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc.Nat.Acad. Sci.* 74. 5463-5467.
- [125] **Feinberg, A.P., Vogelstein, B.** (1984) A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochem.* 137: 266-267.
- [125] **Gubler, U., Hoffman, B.J.** (1983) A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. *Gene.* 25: 263-9.

- [126] **Hanahan, D.** (1983) Techniques for transformation of *E. Coli*. Glover, P.M. (Hrsg.) *DNA cloning Vol. I* IRL Press Oxford.
- [127] **Klebe, R.J., Harriss, J.V., Sharp, Z.D., Douglas, M.G.** (1983) A general method for polyethylene-glycol-induced genetic transformation of bacteria and yeast *Gene*. 25: 333-41.
- [128] **Dohmen, R.J., Strasser, A.W., Honer, C.B., Hollenberg, C.P.** (1991) An efficient transformation procedure enabling long-term storage of competent cells of various yeast genera. *Yeast*. 7: 691-2.
- [129] **Inis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, J.T.** (1990) PCR protocols: A guide to methods and applications. *Academic Press Inc.*
- [130] **Rice, P., Longden, I., Bleasby, A.** (2000) EMBOSS: The European molecular biology open software suite. *Trends in Genetics* 16: 276-277.
- [131] **Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J.** (1990) Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215: 403-410.
- [132] **Altschul, S.F., Madden, T.L., Schaffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* 25: 3389-402.
- [133] **Emanuelsson, O., Nielsen, H., von Heijne, G.** (1999) ChloroP, a neural network- based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites *Protein Science* 8: 978-984.
- [134] **Bannai, H., Tamada, Y., Maruyama, O., Nakai, K. and Miyano, S.** (2002) Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals. *Bioinformatics* 18: 298-305.
- [135] **Schein, A.I., Kissinger, J.C., Ungar, L.H.** (2001) Chloroplast transit peptide prediction: a peek inside the black box. *Nucleic Acids Res.* 15; 29: E82.
- [136] **Bendtsen, J.D., Nielsen, H., von Heijne, G., Brunak, S.** (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J. Mol. Biol.*, 340: 783-795.
- [137] **Thompson, J.D., Higgins, D.G. and Gibson, T.J.** (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- [138] **Thollessen, M.** (2004) LDDist: a Perl module for calculating LogDet pair-wise distances for protein and nucleotide sequences. *Bioinformatics* 20: 416-418.
- [139] **Huson, D.H., Bryant, D.** (2006) Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol. Biol. Evol.* 23: 254-267.
- [140] **Cavalier-Smith, T.** (1981) Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems*. 14: 461-81.
- [141] **Nakamura, Y., Gojobori, T., Ikemura, T.** (2000) Codon usage tabulated from the international DNA sequence databases: status for the year 2000. *Nucl. Acids Res.* 28: 292.
- [142] **Hanes, C. S.** (1932) Studies on plant amylases. I. The effect of starch concentration upon the velocity of hydrolysis by the amylase of germinated barley. *Biochem. J.* 26: 1406-1421.
- [143] **Kruger, Nicholas J. and Hammond, John B.W.** (1988) Molecular comparison of pyrophosphate- and ATP-dependent Fructose 6-Phosphate 1-Phosphotransferase from Potato Tuber. *Plant Physiol.* 86: 645-648.
- [144] **Kopperschlager, G., Freyer, R., Diezel, W., Hofmann, E.** (1968) Some kinetic and molecular properties of yeast phosphofructokinase. *FEBS Lett.* 1:137-141.

- [145] **Haeckel, R., Hess, B., Lauterborn, W., Wuster, K.H.** (1968) Purification and allosteric properties of yeast pyruvate kinase. *Hoppe Seylers Z. Physiol. Chem.* 349: 699-714.
- [146] **Arvanitidis, A., Heinisch, J.J.** (1994) Studies on the function of yeast phosphofructokinase subunits by *in vitro* mutagenesis. *J. Biol. Chem.* 269: 8911-8.
- [147] **Lee, C-Y., Johansson, C.J.** (1977) Purification of cofactor-dependent enzymes by affinity chromatography. *Anal. Biochem.* 77: 90-102.
- [148] **Haystead, C.M., Gregory, P., Sturgill, T.W., Haystead, T.A.** (1993) Gamma-phosphate-linked ATP-sepharose for the affinity purification of protein kinases. Rapid purification to homogeneity of skeletal muscle mitogen-activated protein kinase kinase. *Eur. J. Biochem.* 214: 459-67.
- [149] **Trayer, I.P., Trayer, H.R., Small, D.P., Bottomley, R.C.** (1974) Preparation of adenosine nucleotide derivatives suitable for affinity chromatography. *Biochem. J.* 139: 609-23.
- [150] **Parry, M.A.J., Schmidt, C.N.G., Cornelius, M.J., Millard, B.N., Burton, S., Gutteridge, S., Dyer, T.A., Keys, A.J.** (1987) Variations and properties of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase from various species related to differences in amino acid sequences. *J. Exp. Bot.* 38: 1260-1271.
- [151] **Koike, H., Yoshio, M., Kashino, Y., Satoh, K.** (1998) Polypeptide composition of envelopes of spinach chloroplasts: two major proteins occupy 90% of outer envelope membranes. *Plant Cell Physiol.* : 526-32.
- [152] **Schein, A.I., Kissinger, J.C., Ungar, L.H.** (2001) Chloroplast transit peptide prediction: a peek inside the black box. *Nucleic Acids Res.* 29 (16): E82.
- [153] **Bhushan, S., Kuhn, C., Berglund, A.K., Roth, C., Glaser, E.** (2006) The role of the N-terminal domain of chloroplast targeting peptides in organellar protein import and miss-sorting. *FEBS Lett.* 580: 3966-72.
- [154] **Glaser, E., Soll, J.** (2004) Targeting signals and import machinery of plastids and plant mitochondria in: *Molecular Biology and Biotechnology of Plant Organelles* (Daniell, H. And Chase, C., Eds.), pp. 385–418, Springer, Dordrecht, The Netherlands.
- [155] **Jarvis, P., Robinson, C.** (2004) Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. *Curr. Biol.* 14: 1064–1077.
- [156] **Mackenzie, S.A.** (2005) Plant organellar protein targeting: a traffic plan still under construction. *Trends Cell. Biol.* 15: 548–554.
- [157] **Bruce, B.D.** (2000) Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. *Trends Cell Biol.* 10: 440-7.
- [158] **Zhang, X.P., Glaser, E.** (2002) Interaction of plant mitochondrial and chloroplast signal peptides with the Hsp70 molecular chaperone. *Trends Plant Sci.* 7: 14–21.
- [159] **Lancelin, J.M., Bally, I., Arlaud, G.J., Blackledge, M., Gans, P., Stein, M., Jacquot, J.P.** (1994) NMR structures of ferredoxin chloroplastic transit peptide from *Chlamydomonas reinhardtii* promoted by trifluoroethanol in aqueous solution. *FEBS Lett.* 343: 261-6.
- [160] **Krimm, I., Gans, P., Hernandez, J.F., Arlaud, G.J., Lancelin, J.M.** (1999) A coil-helix instead of a helix-coil motif can be induced in a chloroplast transit peptide from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur. J. Biochem.* 265: 171-80.
- [161] **von Heijne, G.** (1986) Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO J.* 5: 1335–1342.

- [162] **Moberg, P., Nilsson, S., Ståhl, A., Eriksson, A.-C., Glaser, E., Mäler, L.** (2004) NMR solution structure of the mitochondrial F<sub>1</sub>beta presequence from *Nicotiana plumbaginifolia*. *J. Mol. Biol.* 336: 1129–1140.
- [163] **Bruce, B.D.** (2001) The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure. *Biochim. Biophys. Acta* 1541: 2–21.
- [164] **Claros, M.G., Brunak, S., von Heijne, G.** (1997) Prediction of N-terminal protein sorting signals. *Curr. Opin. Struct. Biol.* 7: 394–8.
- [165] **Mustroph, A.** (2005) Die Bedeutung von Fermentation, Photosynthese und Pyrophosphat für das Überleben von Pflanzen unter Sauerstoffmangel. Dissertation; eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I der Humboldt-Universität zu Berlin.
- [166] **Mann, M., Jensen, O.N.** (2003) Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nat. Biotechnol.* 21: 255–61.
- [167] **Fakhrai-Rad, H., Pourmand, N., Ronaghi, M.** (2002) Pyrosequencing: an accurate detection platform for single nucleotide polymorphisms. *Hum. Mutat.* 19: 479–85.
- [168] **Motz, M., Sagner, G., Paabo, S., Kilger, C.** (2003) Sequential DEXAS: a method for obtaining DNA sequences from genomic DNA and blood in one reaction. *Nucleic Acids Res.* 31: e121.
- [169] **Witte, C.P., Noel, L.D., Gielbert, J., Parker, J.E., Romeis, T.** (2004) Rapid one-step protein purification from plant material using the eight-amino acid StrepII epitope. *Plant Mol. Biol.* 55: 135–47.
- [170] **Tsien, R.Y.** (1998) The green fluorescent protein. *Annu. Rev. Biochem.* 67: 509–44.
- [171] **Lovingshimer, M.R., Siegele, D., Reinhart, G.D.** (2006) Construction of an inducible, *pfkA* and *pfkB* deficient strain of *Escherichia coli* for the expression and purification of phosphofructokinase from bacterial sources. *Protein Expr. Purif.* 46: 475–82.
- [172] **Estevez, A.M., Heinisch, J.J., Aragon, J.J.** (1995) Functional complementation of yeast phosphofructokinase mutants by the non-allosteric enzyme from *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Lett.* 374: 100–4.
- [173] **Fuhrmann, M., Hausherr, A., Ferbitz, L., Schödl, T., Heitzer, M., Hegemann, P.** (2004) Monitoring dynamic expression of nuclear genes in *Chlamydomonas reinhardtii* by using a synthetic luciferase reporter gene. *Plant Mol Biol.* 55: 869–81.
- [174] **Kruger, N.J., Demmis, D.T.** (1985) A source of apparent pyrophosphate: fructose-6-phosphate phosphotransferase activity in rabbit muscle phosphofructokinase: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 126: 320–326.
- [175] **Ohyanagi, H., Tanaka, T., Sakai, H., Shigemoto, Y., Yamaguchi, K., Habara, T., Fujii, Y., Antonio, B.A., Nakamura, Y., Imanishi, T., Ikeo, K., Itoh, T., Gojobori, T., Sasaki, T.** (2006) The Rice Annotation Project Database (RAP-DB): hub for *Oryza sativa* ssp. *japonica* genome information. *Nucleic Acids Res.* 34: 741–4.
- [176] **Heinisch, J.J.** (1993) Expression of heterologous phosphofructokinase genes in yeast. *FEBS Letters* 328: 35–40.
- [177] **Blom, N., Gammeltoft, S., and Brunak, S.** (1999) Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *Journal of Molecular Biology*: 294: 1351–1362.
- [178] **Spolter, P.D., Adelman, R.C., Weinhouse, S.** (1965) Distinctive properties of native and Carboxypeptidase-treated Aldolases of rabbit muscle and liver. *J Biol Chem.* 40: 1327–37.

- [179] **Hansen, A.** (2004) Bioinformatik, ein Leitfaden für Naturwissenschaftler. 156 S., 47 *illus.*, Softcover ISBN: 3-7643-6253-7.
- [180] **Gyrolakhmedov, S.G., Omarov, Y.A., Mamedov, Z.M., Kuliev, A.A.** (2006) Isolation and study of active ATP-dependent phosphofruktokinase from apple fruits *Pyrus domestica* Borkh. *Biochemistry and Microbiology* 42: 468-471.
- [181] **Heber, U.W., Santarius, K.A.** (1965) Compartmentation and reduction of pyridine nucleotides in relation to photosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta.* 109: 390-408.
- [182] (1968) IUPAC IUB – A one letter notation of amino acid sequences. *Eur. J. Biochem* 5: 151-153.
- [183] **Delvos, B.** (2005) Untersuchungen zur Phosphofruktokinase aus *Spiancia oleracea*. Diplomarbeit; eingereicht an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

## 8 Abkürzungen

|                |  |
|----------------|--|
| °C             | = Grad Celsius   |
| Abb.           | = Abbildung  |
| ACN            | = Acetonitril  |
| ADP            | = Adenosindiphosphat   |
| AMP            | = Adenosinmonophosphat   |
| APS            | = Ammoniumpersulfat  |
| AS             | = Aminosäure   |
| ATP            | = Adenosintriphosphat  |
| BiCa           | = Ammoniumbicarbonat   |
| BLAST          | = <i>engl.</i> "basic local alignment search tool"   |
| BMFZ           | = Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum   |
| Bp             | = Basenpaar  |
| BSA            | = Rinderserumalbumin   |
| C-             | = Carboxyterminal  |
| cDNA           | = komplementäre DNA umgeschrieben aus mRNA   |
| cm             | = Zentimeter   |
| cpm            | = <i>engl.</i> counts per minute   |
| cv             | = cultivar   |
| ddNTP          | = Didesoxynukleotidtriphosphat   |
| DEAE           | = Diethylaminoethyl  |
| DEPC           | = Diethylpyrocarbonat  |
| DMF            | = Dimethylformamid   |
| DNA            | = Desoxyribonukleinsäure   |
| DTT            | = Dithiotreitol  |
| EDTA           | = Ethylendiamintetraessigsäure   |
| EMBOSS         | = <i>engl.</i> European Molecular biology open software suite  |
| ESI-Q-TOF      | = <i>engl.</i> Elektrospray-Ionisation-Quadrupol-Time-Of-Flight  |
| EST            | = ( <i>engl.</i> expressed sequenced tags) wahllose cDNA Abschnitte die für potentielle Klone kodieren |
| FPLC           | = <i>engl.</i> Fast-Protein-Liquid-Chromatographie   |
| g              | = Faktor der Erdbeschleunigung   |
| GAPDH          | = Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase   |
| HEPES          | = 4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethansulfonsäure   |
| IPTG           | = Isopropyl-β-thiogalactopyranosid   |
| IRD            | = Infrarot Farbstoff   |
| K              | = Lysin  |
| kb             | = KiloBase   |
| kDa            | = Molekulargewicht; entspricht 1000 Dalton   |
| K <sub>m</sub> | = Michaelis-Konstante  |
| l              | = Liter  |
| LB             | = Luria Broth  |
| M              | = Molar  |
| MCS            | = <i>engl.</i> Multiple cloning site   |
| min            | = Minute   |
| MQW            | = Milli-Q-Wasser   |
| M <sub>r</sub> | = Molekulargewicht (siehe auch MW)   |
| mRNA           | = messenger RNA  |
| MS             | = Massenspektroskopie  |
| MW             | = Molekulargewicht (siehe auch M <sub>r</sub> )  |
| N-             | = Aminoterminal  |
| NADPH          | = Nicotinsäureamid-Adenosin-Dinukleotid-Phosphat   |
| Ni-NTA         | = Nickel-Nitrilotriessigsäure  |

|         |  |
|---------|--|
| NJ      | = ( <i>engl.</i> Neighbor-Joining)Verfahren, nach dem die Astlängen in einem phylogenetischen Baum über eine Sterntopologie ermittelt werden [117] |
| OD      | = optische Dichte  |
| ORF     | = offener Leserahmen   |
| PCR     | = Polymerasekettenreaktion   |
| PEG     | = Polyethylenglykol  |
| PEP     | = Phosphoenolpyruvat   |
| PFK     | = Phosphofruktokinase  |
| PPF     | = Pyrophosphat-abhängige PFK   |
| pH      | = negativer, dekadischer Logarithmus der $H_3O^+$ -Ionen in Wasser   |
| $P_i$   | = ortho-Phosphat   |
| Pos.    | = Position   |
| $PP_i$  | = Pyrophosphat   |
| RACE    | = <i>engl.</i> rapid amplification of cDNA ends  |
| RNA     | = Ribonukleinsäure   |
| RT      | = Raumtemperatur   |
| RuBisCo | = Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/-oxygenase  |
| s       | = Sekunde  |
| SAP     | = alkalische Phosphatase   |
| SDS     | = Natriumdidecylsulfat   |
| ssDNA   | = Einzelstrang-DNA   |
| TAE     | = Tris-Acetat-EDTA   |
| TE      | = Tris-EDTA  |
| TEMED   | = N,N, N',N'-Tetramethylethylendiamin  |
| TIM     | = Triosephosphat-Isomerase   |
| $T_m$   | = Schmelztemperatur  |
| Tris    | = Tris(hydroxymethyl)-aminomethan  |
| U       | = Unit (entspricht $\mu\text{mol}/\text{min}$ )  |
| Upm     | = Umdrehungen pro Minute   |
| V       | = Volt   |
| v/v     | = Volumen pro Volumen  |
| w/v     | = Gewicht pro Volumen  |
| X-Gal   | = 5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-beta-D-Galaktopyranosid   |
| YEPD    | = <i>engl.</i> Yeast extract pepton glucose  |
| YEPGE   | = <i>engl.</i> Yeast extract pepton glycerin ethanol   |
| YNB     | = <i>engl.</i> Yeast nitrogen base   |
| ÜN      | = über Nacht   |

Aminosäuresequenzen wurden im Ein-oder Drei-Buchstabenkod nach IUPAC Regeln angegeben [182]

## Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. W. Martin für die Überlassung des Themas, die Betreuung während der Arbeit durch konstruktive und kritische Diskussionen, sowie für die sorgfältige Durchsicht dieser Dissertation.

Ich danke Herrn Prof. Dr. R. Wagner für die Übernahme des Korreferates.

Ich möchte mich ganz herzlich bei meinen Eltern Horst und Astrid Winkler bedanken, die immer an meine Fähigkeiten geglaubt haben, und mir während meines bisherigen Lebensweges mit die wichtigsten Ratgeber waren.

Ich danke meiner Freundin Monika Wojtalik, die mich immer während meiner Arbeit unterstützt hat und stets für mich da war.

Ich danke meinen Büromitstreitern Meike Hoffmeister für Unterstützungen während der Laborarbeit. Bei Christian Esser bedanke ich mich für die Hilfestellung bei bioinformatischen Problemen.

Ich danke Britta Delvos und Vera Bockemühl für ihr jeweiliges Engagement während Ihrer Diplomarbeiten.

Ich möchte mich bei Dr. Carsten Amuel bedanken, der mir auch nach meiner Diplomarbeit immer mit Rat und Tat zur Seite stand.

Mein Dankeschön geht an die Priv. Doz. Dr. Katrin Henze, die mir bei der Proteinsequenzierung, sowie bei der Fertigstellung dieser Arbeit geholfen hat.

Ich danke Isabell Fuchs, die mir bei jeglicher Laborarbeit stets eine Unterstützung war.

Ich bedanke mich bei Marianne Limpert für die Hilfe bei Organisation und Verwaltung.

Ich bedanke mich bei Dr. U. Nowitzki, welcher mich in die Mythen der Proteinreinigung eingearbeitet hat.

Ich bedanke mich bei allen Institutsmitgliedern, welche sich die Mühe gemacht haben, diese Arbeit von Tippfehlern und überflüssigen Lehrzeichen zu befreien.

Ich danke dem restlichen Institut für Botanik III für die gute Zusammenarbeit. Auch den Diplomanden, welche bereits das Institut verlassen haben.

Ich möchte mich abschließend bei meinen Freunden Rainer Wimmers und Alex Löffler bedanken, die immer daran geglaubt haben, das man auch als „Biotop“ was werden kann.

Die hier vorgelegte Dissertation habe ich eigenständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt. Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in ähnlicher Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, November 2006

Christian Winkler