

Strukturelle und funktionelle Analyse der Pyruvat-Phosphat Dikinase

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von
Alexander Ralph Michael Minges
aus Hannover

Düsseldorf, Februar 2017

aus dem Institut für Biochemische Pflanzenphysiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

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

Referent: Univ. Prof. Dr. Georg Groth

Korreferent: Univ. Prof. Dr. Holger Gohlke

Tag der mündlichen Prüfung: 28.03.2017

Meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung 7

Abstract 9

1. Einleitung 11
   - 1.1. Duale Funktionalität der RuBisCO . . . 11
   - 1.2. RuBisCO und Photorespiration . . . 12
   - 1.3. C_4-Photosynthese . . . 14
     - 1.3.1. Evolution der C_4-Photosynthese . . . 15
   - 1.4. Das Genus *Flaveria* als Modell der C_4-Evolution . . . 20
   - 1.5. Das Enzym Pyruvat-Phosphat Dikinase . . . 20
     - 1.5.1. Struktureller Aufbau und Mechanismus . . . 21
     - 1.5.2. Regulation . . . 23
     - 1.5.3. Funktion der Pyruvat-Phosphat Dikinase . . . 24
   - 1.6. Zielsetzung der Arbeit . . . 27

2. Strukturelle Intermediate und gerichtete Bewegung der Zentraldomäne im katalytischen Mechanismus der Pyruvat-Phosphat Dikinase 29

3. Identifizierung weiterer Teilschritte im katalytischen Mechanismus der Pyruvat-Phosphat Dikinase durch die vom Enzym nicht umsetzbare Nukleotidform ADP 73

4. Kompetitive Hemmung der Pyruvat-Phosphat Dikinase durch Inhibitoren der Nukleotidbindestelle 87

5. Diskussion 109
   - 5.1. Strukturelle Intermediate der Nukleotid-Bindedomäne und Teilschritte des *Swiveling-Domain*-Mechanismus . . . 109
     - 5.1.1. Konformationen der Nukleotid-Bindedomäne . . . 110
     - 5.1.2. Teilschritte des *Swiveling-Domain*-Mechanismus . . . 112
   - 5.2. Entwicklung spezifischer Inhibitoren der Pyruvat-Phosphat Dikinase . . . 114
   - 5.3. Ausblick . . . 117

Abkürzungen 121

Abbildungsverzeichnis 124

Tabellenverzeichnis 125

Literatur 127

A. Anhang 135
A.1. Nuklein- und Aminosäuresequenzen 135
A.2. Plasmidkarten 145

Danksagung 147

Erklärung 149

Zusammenfassung

Die PPDK ist ein vielseitiges Enzym, welches die reversible Umwandlung von Pyruvat, Orthophosphat (P_i) und Adenosintriphosphat (ATP) zu Phosphoenolpyruvat (PEP), Pyrophospat (PP_i) und Adenosinmonophosphat (AMP) katalysiert. Es spielt eine Rolle als glykolytisches Enzym einiger Bakterien und Protozoen, wo es in die ATP bildende Richtung arbeitet und somit die Energieeffizienz erhört. In C_4-Pflanzen hingegen wird Pyruvat unter ATP-Verbrauch in PEP umgewandelt und der primäre CO_2-Akzeptor PEP regeneriert. Die PPDK ist somit eines der geschwindigkeitsbestimmenden Enzyme der C_4-Photosynthese. Die Übertragung einer Phosphorylgruppe zwischen den weit auseinander liegenden Substratbindedomänen erfolgt über den so genannten *Swiveling Domain*-Mechanismus, bei dem die Zentraldomäne (*Central Domain*, CD) eine Schwenkbewegung durchläuft. Über Zwischenkonformationen, welche diese CD im katalytischen Zyklus möglicherweise einnimmt, waren bislang allerdings keinerlei Erkenntnisse verfügbar. Der Bindungsmodus von Nukleotiden innerhalb der NBD und deren Öffnungs- und Schließbewegung bei Substratbindung waren nicht abschließend geklärt und nur in Analogie zu Proteinen mit homologer NBD postuliert.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden neue Kristallstrukturen der PPDK aus der C_4-Pflanze *Flaveria trinervia*, sowie der C_3-Pflanze *Flaveria pringlei* gelöst, welche detaillierte Einblicke in die Domänenbewegungen der PPDK in ihrem katalytischen Zyklus ermöglichen. Es wurden zwei bislang unbekannte intermediäre Konformationen der CD beschrieben, wodurch gezeigt werden konnte, dass die Bewegung der CD nicht linear interpoliert zwischen zwei definierten Extermkonformationen, sondern stattdessen über isolierbare Zwischenstufen abläuft. Weiterhin wurden geschlossene nukleotidgebundene und offene nukleotidfreie Konformationen der NBD gefunden, welche möglicherweise auf einen alternierenden Mechanismus der Substratbindung und -freisetzung im funktionellen Homodimer/-tetramer hindeuten.

Abschließend wurde eine Bibliothek von bekannten Kinaseinhibitoren auf ihre Wirksamkeit bezüglich der PPDK hin getestet. Hierbei konnten für die PPDK bislang unbekannte hocheffiziente Inhibitoren aus der Klasse der Bisindolylmaleimide identifiziert werden. Ein vergleichendes *in silico* Docking zeigte das Potential einer strukturellen Anpassung dieser Inhibitoren mit dem Ziel einer erhöhten Selektivität in Bezug auf die PPDK auf.

Abstract

The pyruvate phosphate dikinase (PPDK) is a versatile enzyme which catalyzes the reversible interconversion of pyruvate, inorganic phosphate (P_i) and adenosine triphosphate (ATP) to phosphoenolpyruvate (PEP), pyrophosphate (PP_i) and adenosine monophosphate (AMP). PPDK is involved in the energy metabolism of several bacteria and protists as a glycolytic enzyme where it acts in the ATP-forming direction, boosting the energy efficiency of these organisms. The PEP-forming direction is used in C_4 plants where the primary CO_2 acceptor PEP is regenerated by PPDK. Hence, PPDK is one of the rate-limiting enzymes of C_4 photosynthesis. Phosphoryl group transfer between the distant substrate binding domains is realized by the so-called swiveling domain mechanism which employs a swiveling movement of the central domain (CD). However, intermediate conformations of the CD have been unresolved so far. Similarly, the binding mode of nucleotides within the nucleotide binding domain (NBD) and the opening and closing motion of this domain were only postulated in analogy to other proteins with homologous nucleotide binding domains. A possible crosstalk between monomers in the functional homodimer or homotetramer has not been investigated so far.

In the course of this work, a number of novel crystallographic structures of PPDK from the C_4 plant *Flaveria trinervia* and the C_3 plant *Flaveria pringlei* have been solved. These allow to derive a more detailed view on the domain movements of PPDK in its catalytic cycle. Two conformational intermediates of the CD have been trapped which show that the swiveling movement of the CD does not proceed in a linear interpolation between two extreme conformations, but instead proceeds via distinct sub-steps. Additionally, nucleotide-bound (closed) and nucleotide-free (open) conformations of the NBD were identified in these structures. This hints at a possible alternate binding change mechanism employed in the functional dimeric or tetrameric assembly.

Eventually a library of known kinase inhibitors was screened for inhibitory effects on PPDK. During this study, novel high efficacy inhibitors of PPDK have been identified which belong to the class of bisindolylmaleimides. A comparative *in silico* docking approach revealed high potential for structural adjustment of these inhibitors with the aim of an improved selectivity towards PPDK.

1. Einleitung

Die Fixierung von CO_2 durch Pflanzen mittels Photosynthese ist eine – mit Ausnahme weniger extremer Biotope – Grundvoraussetzung für das Fortbestehen des Lebens. Im Laufe der Evolution entwickelten sich zwei hauptsächlich genutzte Typen der Photosynthese. Die am häufigsten anzutreffende Form ist die C_3-Photosynthese, bei welcher die primäre CO_2-Fixierung im Calvin-Benson-Bassham-Zyklus (CBB) stattfindet (Bassham et al. 1950; Benson 2002; Bassham 2003). Durch die duale Funktionalität der Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/oxygenase (RuBisCO) als Carboxylase und Oxygenase (Miziorko und Lorimer 1983) ergeben sich allerdings in Abhängigkeit von den vorherrschenden Umweltbedingungen – insbesondere bei Trockenheit oder großer Hitze – Nachteile bei der Effizienz der CO_2-Fixierung. Um diese zu umgehen, entwickelte sich mehrfach unabhängig voneinander – aktuelle Untersuchungen gehen von mindestens 61 unabhängigen Abstammungslinien aus (Sage et al. 2012; Sage 2016) – die so genannte C_4-Photosynthese.

1.1. Duale Funktionalität der RuBisCO

Der erste Schritt des CBB, die Carboxylierung von Ribulose-1,5-bisphosphat (RuBP), wird durch das Enzym RuBisCO katalysiert. Es stellt somit ein Schlüsselenzym der Photosynthese dar. Hierbei entstehen aus jeweils drei Molekülen RuBP und CO_2 sechs Moleküle 3-Phosphoglycerat (3PGA). Das aktive Zentrum der RuBisCO besteht aus einem Magnesium-Ion, welches über ein Carbamat gebunden wird. Das Carbamat selbst entsteht durch die Bindung eines Moleküls CO_2 an die ε-Aminogruppe des Lys201 im katalytischen Zentrum der RuBisCO.

RuBP wird über seine Ketogruppe, sowie eine benachbarte Hydroxyfunktion an Mg^{2+} gebunden (Lundqvist und Schneider 1991). Aus diesem Komplex wird leicht ein Proton eliminiert, wodurch sich ein Endiolat bildet, dessen negative Ladung über das Mg^{2+} stabilisiert wird. Das reaktive Endiolat wiederum reagiert mit einem Molekül CO_2 zu 2-Carboxy-3-keto-D-arabinitol-1,5-bisphosphat. Durch die Addition von Wasser entsteht ein instabiles,

hydratisiertes Zwischenprodukt, welches in zwei Moleküle 3PGA zerfällt (Abb. 1.1).

Das am Mg^{2+} gebildete, reaktive Zwischenprodukt kann anstatt mit CO_2 auch mit molekularem Sauerstoff (O_2) reagieren (Abb. 1.1). Bei dieser Oxygenierungsreaktion der RuBisCO – welche in der Regel etwa viermal langsamer abläuft, als die Carboxylierung – entstehen dann jeweils ein Molekül 3PGA und 2-Phosphoglycolat (2PG). Im Gegensatz zu 3PGA ist 2PG kein vielseitig einsetzbarer Metabolit, so dass dessen Kohlenstoffgerüst über den Mechanismus des oxidativen C_2-Zyklus – der so genannten „Photorespiration" – zurückgewonnen wird.

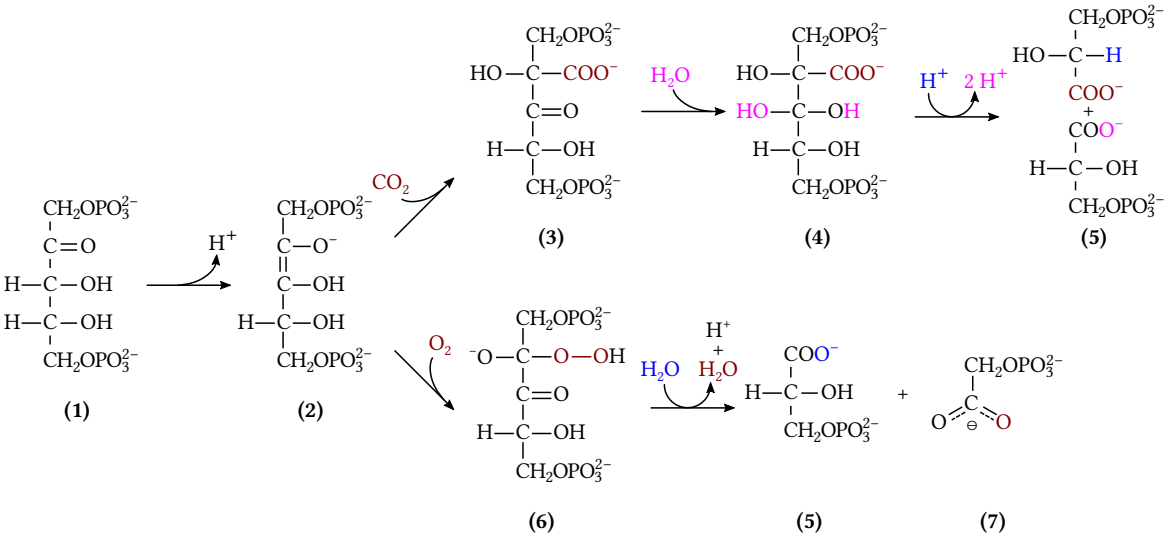


Abbildung 1.1.: Reaktionen der RuBisCO (verändert nach Berg et al. 2015). Ribulose-1,5-bisphosphat (1) steht zur Enolform über eine Keto-Enol-Tautomerie im Gleichgewicht. Wird die Enolform deprotoniert, entsteht das aktivierte Enolat (2). Dieses reagiert mit CO_2 zu 2-Carboxy-3-keto-D-arabinitol-1,5-bisphosphat (3). Durch Addition von Wasser entsteht ein instabiles hydratisiertes Zwischenprodukt (4), welches in zwei Moleküle 3-Phosphoglycerat zerfällt (5). Das aktivierte Enolat kann alternativ auch mit molekularem Sauerstoff reagieren, woduch ein Hydroperoxid-Zwischenprodukt (6) gebildet wird. Dieses hydrolysiert unter Bildung von einem Molekül 2PG (7) und einem Molekül 3PGA (5).

1.2. RuBisCO und Photorespiration

Die oxygene Photosynthese entwickelte sich im anaeroben Ozean des Präkambiums. Früheste Hinweise auf das mögliche Wirken oxygener Photosynthese lassen sich auf einen Zeitraum von vor ca. 3,7 Ga bis 3,2 Ga datieren (Buick 2008). Als wahrscheinlich gilt ihre Existenz zu einem Zeitpunkt vor ca. 2,45 Ga, gut 100 Ma vor der so genannten „Großen

Sauerstoffkatastrophe“ (engl. *Great Oxygenation Event*, GOE) vor 2,33 Ga (Canfield 2005; Buick 2008; Crowe et al. 2013; Luo et al. 2016). Im weiteren Verlauf stieg der atmosphärische Sauerstoffgehalt auf bis zu 35 % an, bevor er vor etwa 0,85 Ga auf sein heutiges Niveau von rund 21 % abfiel und sich dort stabilisierte (Holland 2006). Der Sauerstoffgehalt der Ozeane folgte im Wesentlichen dem des atmosphärischen Sauerstoffgehalts, war aber größeren – auch lokalen – Schwankungen unterworfen. Insbesondere in der Tiefsee traten auch nach dem GOE längere anoxische Phasen auf (Holland 2006). Zudem sank in den letzten 40 Ma die atmosphärische CO_2-Konzentration ab und erreichte vor etwa 15 Ma ihr heutiges Niveau (Sage et al. 2012).

Da sich die Photosynthese unter anaeroben Bedigungen entwickelte, stellte die duale Spezifität der RuBisCO (Kap. 1.1) für CO_2 und O_2 keine nachteilige Eigenschaft in Bezug auf die Effizienz der Kohlenstofffixierung dar. Mit dem Auftreten signifikanter Mengen Sauerstoff in der Atmosphäre und den Ozeanen und dem Absinken des CO_2-Gehaltes der Atmosphäre änderte sich dies jedoch. Insbesondere bei Trockenheit und hohen Temperaturen werden die Spaltöffnungen der Blätter geschlossen, um einen übermäßigen Wasserverlust durch Transpiration zu vermeiden. Hierdurch wird aber auch die Aufnahme von CO_2 über die Spaltöffnungen verhindert, so dass die intrazelluläre CO_2-Konzentration weiter absinkt, was letztlich die konkurrierende Oxygenierungsreaktion der RuBisCO zusätzlich begünstigt.

Bei der Carboxylierung von einem Molekül RuBP durch die RuBisCO entstehen unter Verbrauch von einem Molekül CO_2 zwei Moleküle 3PGA. Dieses wird in den nachfolgenden Reaktionen des CBB zu Triosephosphat reduziert. Die Oxygenierung von RuBP führt hingegen unter Verbauch eines Moleküls O_2 zu equimolaren Mengen 3PGA und 2PG (Bowes et al. 1971). 2PG kann nicht im CBB verwertet werden, sondern wird über mehrere Zwischenstufen unter Beteiligung von Peroxisomen und Mitochondrien und unter Sauerstoffverbrauch oxidativ zu 3PGA umgewandelt. Zudem wirkt 2PG in höheren Konzentrationen toxisch auf die Pflanze (Anderson 1971). Bei diesem Umwandlungsprozess – dem oxidativen C_2-Zyklus oder Photorespiration – wird netto CO_2 freigesetzt. Da die Oxygenierung – wie auch die Carboxylierung – von RuBP durch die RuBisCO nur bei Belichtung eintritt, ist der oxidative C_2-Zyklus ebenfalls nur bei Illumination aktiv. Er läuft somit immer gleichzeitig zum CBB und diesem entgegengesetzt ab.

Aktuelle Daten legen nahe, dass der Anteil der Photorespiration rezenter Landpflanzen bei gemäßigten Temperaturen und guter Düngung bis zu 17 % der Photosynthese ausmacht

(Cegelski und Schaefer 2006). Bei hohen Temperaturen und Trockenheit kann dieser Anteil nochmals höher ausfallen, so dass die Photorespiration in Abhängigkeit der vorherrschenden Umweltbedingungen eine ernstzunehmende Limitation der photosynthetischen Effizienz darstellt, da primär fixiertes CO_2 wieder freigesetzt wird und refixiert werden muss. Hieraus resultiert ein Selektionsdruck, der insbesondere in warmen Regionen die Entstehung von angepassten Formen der Kohlenstofffixierung – beispielsweise dem Crassulaceen-Säurestoffwechsel (*Crassulacean Acid Metabolism*, CAM), oder der C_4-Photosynthese – begünstigte (Bauwe 2011).

1.3. C_4-Photosynthese

Die C_4-Photosynthese stellt eine – durch konvergente Entwicklung mehrfach unabhängig voneinander entstandene – Variante der Photosynthese dar, welche durch einen CO_2-Konzentrationsmechanismus die Effizienz der Photosynthese in warmen und trockenen Habitaten mit hoher Lichtintensität deutlich erhöht. Die erhöhte Effizienz wird durch die räumliche Trennung einer CO_2-Vorfixierung, deren Produkt der C_4-Körper Oxalacetat ist, vom CBB erreicht. Diese räumliche Trennung von der CO_2-Fixierung durch die RuBisCO wird zumeist über zwei Zelltypen hinweg sichergestellt: Mesophyllzellen und Bündelscheidenzellen. Einige wenige Spezies realisieren die C_4-Photosynthese aber auch innerhalb einer Zelle (Voznesenskaya et al. 2001; Voznesenskaya et al. 2002; Edwards und Voznesenskaya 2011). Die aus dem primären Carboxylierungsprodukt Oxalacetat gebildeten C_4-Körper Malat oder Aspartat dienen hierbei als Transportform des CO_2. Durch ihre Decarboxylierung kann CO_2 kontrolliert und in hoher Konzentration in unmittelbarer Nähe der RuBisCO freigesetzt und angereichert werden, wodurch die Oxygenaseaktivität der RuBisCO unterdrückt wird.

Typisch für viele C_4-Pflanzen ist die charakteristische Anatomie ihrer Blätter, die so genannte „Kranz-Anatomie“ (Haberlandt 1896). Bei dieser umgibt ein namensgebender Kranz von Bündelscheidenzellen (BS-Zellen) das im Zentrum liegende Leitbündel (Abb. 1.3). Die BS-Zellen selbst sind ebenfalls kranzförmig von Mesophyllzellen umgeben. Beide sind über ein dichtes Netz von Plasmodesmata miteinander verbunden, wodurch das in den Mesophyllzellen vorfixierte CO_2 möglichst schnell in die BS-Zellen gelangen kann (Botha 1992). Biochemisch lassen sich verschiedene Subtypen der C_4-Photosynthese unterscheiden: Der NADP-Malatenzym-Typ (NADP-ME) (Abb. 1.2), der NAD-Malatenzym-Typ (NAD-ME) und

der Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase-Typ (PEPCK), wobei der NADP-ME-Typ der einfachste und am häufigsten anzutreffende ist. Zusätzlich besitzt er eine größere katalytische Effizienz der RuBisCO im Vergleich zum NAD-ME-Typ und PEPCK-Typ (Ghannoum et al. 2011). Im Folgenden soll näher auf den NADP-ME-Typ eingegangen werden, da dieser auch in *Flaveria trinervia* Anwendung findet, aus welcher eine der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten PPDK-Isoformen stammt.

Gasförmiges CO_2 diffundiert ins Cytosol der Mesophyllzellen, wo es über eine Carboanhydrase (CA) zu Hydrogencarbonat umgesetzt wird. Dieses dient anschließend zur Carboxylierung von Phosphoenolpyruvat (PEP) mittels einer Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC), wobei Oxalacetat entsteht. PEP fungiert also als primärer CO_2-Akzeptor, dessen Carboxylierungsprodukt in den Chloroplasten transportiert wird, wo es entweder durch eine NADP-abhängige Malatdehydrogenase (NADP-MDH) zu Malat reduziert, oder durch die Aspartat-Aminotransferase (AspAT) zu Aspartat transaminiert wird. Sowohl Aspartat, als auch Malat diffundieren über Plasmodesmata in benachbarte Bündelscheidenzellen und werden dort in die Chloroplasten transportiert, wo Aspartat zu Oxalacetat und dieses wiederum über eine NADP-MDH in Malat umgesetzt werden. Malat wird dann über das namensgebende NADP-ME decarboxyliert. Hierdurch wird CO_2 freigesetzt, welches im Chloroplasten der BS-Zellen akkumuliert und dann direkt in den CBB eingeschleust wird. Das entstandene Pyruvat wird im Cytosol entweder zu Alanin transaminiert oder diffundiert unverändert zurück in die Mesophyllzelle, wo im Chloroplasten aus Pyruvat der primäre CO_2-Akzeptor PEP durch die PPDK unter Adenosintriphosphat(ATP)-Verbrauch regeneriert wird.

1.3.1. Evolution der C_4-Photosynthese

Es wird heute allgemein angenommen, dass die stark erhöhte Photorespirationsrate in warmen und trockenen Habitaten im Zusammenspiel mit dem Absinken der atmosphärischen CO_2-Konzentration letztlich die treibende evolutionäre Kraft für die Entstehung der C_4-Photosynthese darstellt (Sage et al. 2012). Der Selektionsdruck ist hierbei durch die massive photorespiratorische Freisetzung von CO_2 bedingt, so dass zunächst Mechanismen begünstigt werden, welche die Refixierung des freigesetzten CO_2 unterstützen. Bemerkenswert ist das völlige Fehlen von Spezies mit C_4-Photosynthese in den meisten Familien von C_3-Pflanzen. Dies deutet darauf hin, dass eine Prädisposition bei einigen Familien besteht,

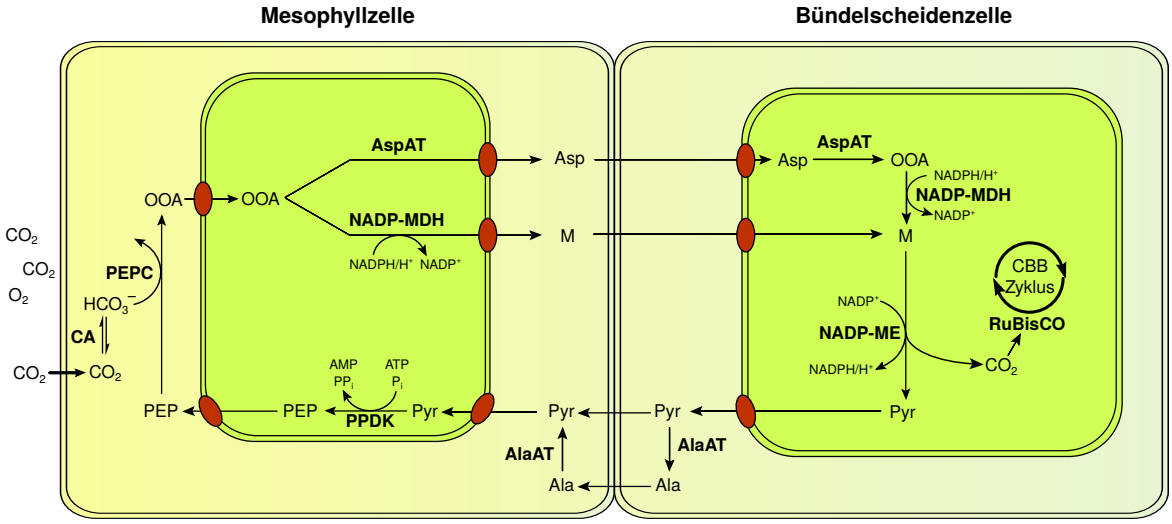


Abbildung 1.2.: Schema der C_4-Photosynthese des NADP-ME-Typs, wie sie in C_4-Pflanzen des Genus *Flaveria* zu finden ist (eigene Darstellung nach Bräutigam und Weber 2011; Gowik et al. 2011). CO_2 wird im Cytosol der Mesophyllzellen in Form von Oxalacetat (OOA) vorfixiert und zu Malat (M) reduziert. Dieses wird in die Chloroplasten der Bündelscheidenzellen transportiert und dort decarboxyliert, wobei CO_2 freigesetzt wird. Pyruvat (Pyr) gelangt zurück in die Mesophyllzellen wo durch die PPDK der primäre CO_2-Akzeptor PEP regerneriert wird. Eine genaue Beschreibung dieses Zyklus findet sich in Kap. 1.3. Weitere verwendete Abkürzungen: Alanin-Aminotransferase (AlaAT), Aspartat-Aminotransferase (AspAT), Carboanhydrase (CA), NADP-abhängige Malatdehydrogenase (NADP-MDH), Phosphoenolpyruvat-Carboxylase (PEPC).

C_4-Photosynthese hervorzubringen, während bei den meisten anderen bestimmte grundlegende Voraussetzungen hierfür offenbar nicht gegeben sind (Sage 2004; Sage et al. 2012). Vereinfacht lässt sich die Evolution der C_4-Photosynthese als fünfstufiges Modell darstellen (Abb. 1.4), dessen erste Stufe eine Präkonditionierungsphase umfasst, in deren Verlauf die notwendigen Eigenschaften für die Entwicklung einer funktionalen C_4-Photosynthese erworben werden.

Zu diesen Grundvoraussetzungen zählt eine erhöhte Dichte an Leitbündeln. Diese wurde in engen C_3-Verwandten von C_4-Spezies aus z.B. *Flaveria* oder *Heliotropium* dokumentiert (Sage et al. 2012). Weiterhin ist denkbar, dass die Duplikation von Genen, welche für Schlüsselenzyme der C_4-Photosynthese – beispielsweise der PEPC, PPDK oder der CA – kodieren eine weitere Voraussetzung darstellt. Hierdurch wird die Neufunktionalisierung dieser Enzyme für die Ausbildung der C_4-Photosynthese ermöglicht, ohne Auswirkungen auf die ursprüngliche Funktionalität zu haben. Aus *Flaveria* ist bekannt, dass die Expression von *ppcA* und *ca3* durch das so genannte M-regulatorisches Modul (*M Regulatory Module*, MEM) cis-regulatorisch kontrolliert wird. Eine Variante dieses regulatorischen

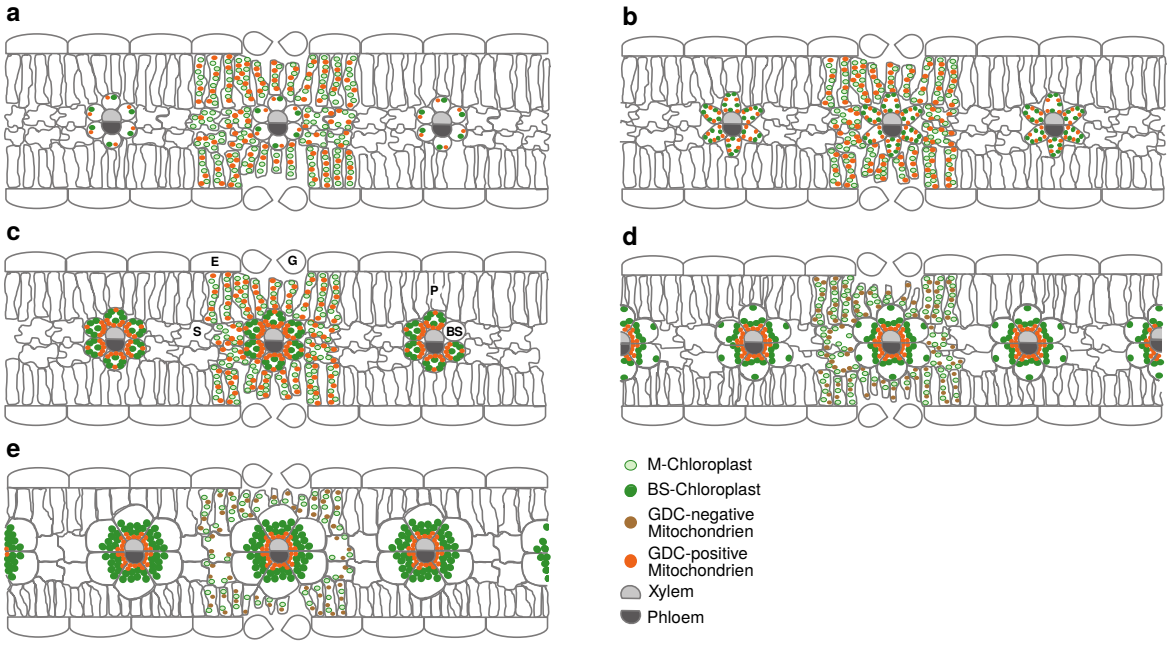


Abbildung 1.3.: Darstellung der sich im Laufe der C_4-Evolution verändernden Blattanatomie (verändert nach Sage et al. 2012). Die BS-Zellen in C_3-Pflanzen sind typischerweise klein und weisen wenige Organellen auf. Die Glycindecarboxylase (GDC) wird in den Mitochondrien aller Zellen exprimiert (a). Nahe C_3-Verwandte von C_4-Spezies zeigen hingegen vergrößerte BS-Zellen und eine größere Anzahl von Organellen (b). In Pflanzen mit einer Proto-Kranzanatomie (c) sind die BS-Zellen weiter vergrößert, deutlich abgerundet und mit vielen Organellen ausgestattet. Die GDC ist weiterhin in allen Mitochondrien zu finden, allerdings sind diese in den BS hauptsächlich zum Leitbündel hin ausgerichtet. In C_3-C_4 intermediären Spezies mit funktioneller C_2-Photosynthese ist die GDC ausschließlich in den Mitochondrien der BS-Zellen zu finden. Auch die Mehrzahl der Chloroplasten der BS-Zellen ist nun zum Leitbünden hin orientiert (d). Bei C_4-Photosynthese (e) mit voll ausgeprägter Kranz-Anatomie sind die BS-Zellen stark vergrößert und alle Organellen in den BS-Zellen zentripetal lokalisiert. Weitere Abkürzungen: Palisaden- (P) und Schwammparenchym (S), sowie Schließzellen (G) und Epidermis (E).

Elements sorgt in C_4-*Flaveria* für eine spezifische Expression dieser Gene in den Mesophyllzellen (Gowik et al. 2004; Gowik und Westhoff 2011; Gowik et al. 2016). Den nächsten Schritt stellt die Ausbildung einer Proto-Kranz-Anatomie dar. In C_3-Pflanzen weisen die BS-Zellen nur eine geringe photosynthetische Aktivität – diese läuft in der Hauptsache in den Mesophyllzellen ab – und entsprechend wenige Zellorganellen auf. Bei Pflanzen mit Proto-Kranz-Anatomie (Muhaidat et al. 2011) ist die Anzahl der Mesophyllzellen jedoch auf Grund der erhöhten Anzahl an Leitbündeln verringert. Gleichzeitig sind die BS-Zellen deutlich vergrößert, haben vermehrt Kontakt zum Intrazellularraum, und weisen eine erhöhte Anzahl an Chloroplasten und Mitochondrien auf, wobei sich die Mitochondrien zum Leitbündel hin orientieren und die Chloroplasten entlang der Zellwand zum Intrazellular-

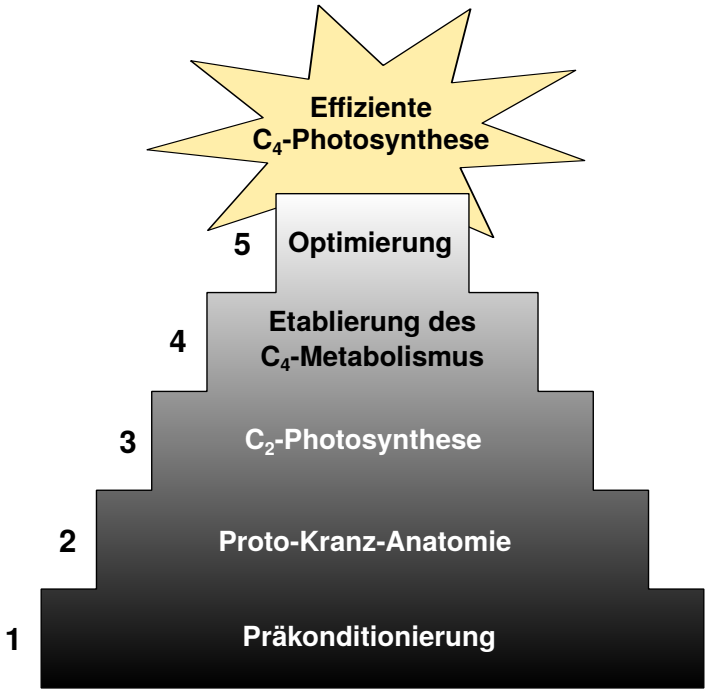


Abbildung 1.4.: Modell der C_4-Evolution (nach Sage 2004). Diese lässt sich in fünf Stufen einteilen: (1) Erfüllen von grundlegenden Voraussetzungen (z.B. Genduplikation, dicht gepackte Leitbündel), (2) Ausbildung einer Proto-Kranz-Anatomie, (3) Photorespiratorische CO_2-Pumpe in Form der C_2-Photosynthese, (4) Etablierung des C_4-Metabolismus (insbesondere Erhöhung der PEPC-Aktivität), (5) Optimierung des C_4-Metabolismus und der Kranz-Anatomie.

raum hin akkumulieren. Einige Chloroplasten befinden sich aber auch in direkter Nähe der Mitochondrien. Die erhöhte Organellzahl in der BS-Zellen ist als Indiz dafür zu werten, dass die durch die verminderte Anzahl hervorgerufene geringere Photosyntheseleistung der Mesophyllzellen durch die BS-Zellen kompensiert wird (Sage et al. 2012). Muhaidat et al. skizzierten 2011 die Möglichkeit eines intrazellurären Glycin-Shuttles als funktionellen Hintergrund der Proto-Kranz-Anatomie: Durch die Photorespiration in den Peroxisomen anfallendes Glycin wird in den Mitochondrien durch die Glycindecarboxylase (GDC) decarboxyliert. Durch die zentripetale Lokalisation der meisten Mitochondrien und die große Vakuole der BS-Zellen wird das dabei freigesetzte CO_2 in diesem Bereich konzentriert, wodurch die RuBisCO derjenigen Chloroplasten, welche sich in räumlicher Nähe befinden, mit höherer Effizienz arbeiten kann. Es handelt sich also um einen einfachen Mechanismus, um die Refixierung von photorespiratorischem CO_2 zu erleichtern. Tatsächlich ließ sich

experimentell für einige Spezies ein um bis zu 15 % verringerter CO_2-Kompensationspunkt[1] im Vergleich zu nahen C_3-Verwandten ermitteln (Muhaidat et al. 2011).

Die GDC wird bei Pflanzen mit Proto-Kranz-Anatomie in allen Mitochondrien der Mesophyllzellen, sowie der BS-Zellen exprimiert. Geht in den Mesophyllzellen die Aktivität der GDC verloren und verstärkt sich in gleichem Maße ihre Aktivität in den Mitochondrien der BS-Zellen, so etabliert sich ein über zwei Gewebe verteilter photorespiratorischer CO_2-Kreislauf, bei welchem Glycin aus den Mesophyllzellen in den Mitochondrien der BS-Zellen decarboxiliert wird. Durch diesen Kreislauf wird CO_2 in den BS-Zellen weitaus stärker angereichert, als dies bei dem zuvor dargelegten intrazellulären Glycin-Shuttle der Fall ist. Durch die damit einhergehende Effizienzsteigerung der RuBisCO in den Chloroplasten der BS-Zellen verändert sich der Selektionsdruck, welcher von der Photorespiration ausgeht, grundlegend: Sie stellt nun kein Hinderniss durch Effizienzverlust mehr dar, sondern erfüllt im Gegenteil nun die Rolle einer internen CO_2-Quelle für die Chloroplasten der BS-Zellen (Sage et al. 2012). Bei C_3-C_4-intermediären Spezies führt dies zur so genannten „C_2-Photosynthese“. Die BS-Zellen und ihre Vakuolen sind im Vergleich zu Proto-Kranz-Pflanzen weiter vergrößert, was die Diffusion von CO_2 aus der Zelle heraus zusätzlich erschwert. Darüber hinaus ist nun auch der Großteil der Chloroplasten in den BS-Zellen zentripetal lokalisiert und bildet eine Schicht direkt benachbart zu den Mitochondrien aus (Abb. 1.3d), wodurch das entstehende CO_2 effizient refixiert werden kann (Caemmerer 1989).

Anatomisch sind somit die Voraussetzungen für die Etablierung der C_4-Photosynthese durch eine Trennung in Photosynthetisch inaktive Mesophyllzellen und photosynthetisch aktive BS-Zellen gegeben. Neben C_3-C_4-intermediären Pflanzen, die ausschließlich eine C_2-Photosynthese betreiben existiert eine weitere Gruppe, welche parallel einen – in unterschiedlichem Umfang – funktionellen C_4-Zyklus besitzt. Dieser kennzeichnet sich durch deutlich gesteigerte Aktivitäten von PEPC und PPDK in den Mesophyllzellen, sowie NADP-ME in den BS-Zellen und eine höhere CO_2-Fixierungsrate (Monson et al. 1986; Ku et al. 1991; Vogan und Sage 2011). Durch weitere Anpassungen, wie beispielsweise eine Verminderung des CBB in den Mesophyllzellen, entstanden dann die ersten Pflanzen mit ausschließlicher C_4-Photosynthese.

[1] Der CO_2-Kompensationspunkt Γ bezeichnet die CO_2-Konzentration, bei der die CO_2-Aufnahme (Photosynthese) mit der CO_2-Abgabe (Photorespiration und Atmung) im Gleichgewicht steht. Er beträgt für typische C_3-Pflanzen etwa 40 $\mu L\,L^{-1}$ bis 60 $\mu L\,L^{-1}$, für C_4-Pflanzen ist er zumeist kleiner als 10 $\mu L\,L^{-1}$(Bauwe 2011).

1.4. Das Genus *Flaveria* als Modell der C_4-Evolution

Das Genus *Flaveria* umfasst eine Vielzahl an Spezies, welche C_4-Photosynthese betreiben. Für die Untersuchung der C_4-Evolution wertvoll ist der Umstand, dass dieses Genus zudem Spezies mit konventioneller C_3-Photosynthese, sowie etliche intermediäre C_3-C_4-Formen umfasst (Gowik et al. 2011). Dieser Umstand erlaubt es nicht nur, wie in Kap. 1.3.1 beschrieben, die evolutionäre Entwicklung der C_4-Photosynthese anhand von anatomischen, genetischen oder biochemischen Vergleichen zwischen C_3, C_3-C_4 und C_4-*Flaverias* nachzuvollziehen, sondern auch vergleichende Studien mit praktischem Anwendungsbezug durchzuführen. So unterliegen beispielsweise C_3-PEPCs im Gegensatz zu C_4-PEPCs einer Feedback-Inhibierung durch Malat und Aspartat (Wedding et al. 1990). Der Verlust der Malat-Sensitivität in der C_4-PEPC aus *F. trinervia* konnte durch strukturelle Vergleiche mit einer C_3-PEPC aus *Flaveria pringlei* auf eine einzelne Aminosäuresubstitution zurückgeführt werden (Paulus et al. 2013). Weitere Studien konnten zeigen, das Wirkstoffe aus der Klasse der Chalkone spezifisch in die veränderte Malat/Aspartat-Bindetasche der C_4-Form binden und dort in geringen Konzentrationen inhibitorisch wirken können, während die C_3-Form nicht oder deutlich weniger affin inhibiert wird, was potentiell die Entwicklung C_4-spezifischer Herbizide ermöglicht (Nguyen et al. 2016).

1.5. Das Enzym Pyruvat-Phosphat Dikinase

Die Pyruvat-Phosphat Dikinase (PPDK, EC 2.7.9.1) ist ein Enzym aus der Klasse der Phosphotransferasen (Kinasen). Es katalysiert reversibel die Umsetzung von Pyruvat, ATP und Orthophosphat (P_i) zu PEP, AMP und Pyrophospat (PP_i) (Abb. 1.5). Isoformen der PPDK wurden in Pflanzen, einigen Bakterien, Archäen und Protozoen, allerdings nicht in Vertebraten oder Insekten gefunden.

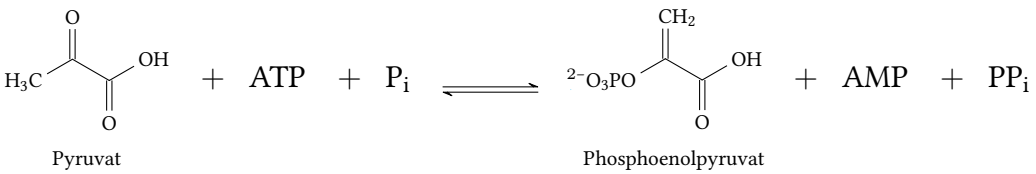


Abbildung 1.5.: Katalysierte Reaktion der PPDK. Pyruvat wird unter ATP-Verbrauch zu PEP phosphoryliert. Eine weitere Phosphorylgruppe wird auf P_i übertragen, wodurch PP_i entsteht.

1.5.1. Struktureller Aufbau und Mechanismus

Die PPDK kann anhand ihrer dreidimensionalen Struktur, sowie der Verteilung ihrer funktionalen Elemente in drei Domänen unterteilt werden (AS in *Flaveria*-Notation):

1. Nukleotid-Bindedomäne (NBD, AS 1-340)
2. Zentrale Domäne (CD, AS 380-515)
3. PEP/Pyruvat-Bindedomäne (PBD, AS 535-874)

Die Reste der NBD bilden eine so genannte *ATP-grasp*, welche typisch für eine Vielzahl an ATP bindenden Proteinen ist (Yamaguchi et al. 1993; Wang et al. 2011). Die NBD kann weiterhin in drei Subdomänen unterteilt werden (Fawaz et al. 2011): Die erste (NBD1, AS 1-111 und AS 197-243) weist eine α+β-Faltung mit einem fünfsträngigen, antiparallelen β-Faltblatt auf (Efimov 1995; Herzberg et al. 1996). NBD2 (AS 112-196) besteht aus vier α-Helices während die NBD3 (AS 244-340) wiederum eine α+β-Faltung zeigt, bei der zwei Helices ein fünfsträngiges, antiparalleles β-Faltblatt einfassen. Etwa 340 Reste der PBD formen ein *TIM Barrel*-Motiv (Banner et al. 1975), welches auch die Substratbindestelle beinhaltet. Diese weist strukturell Ähnlichkeiten zur Pyruvat-Bindestelle der Pyruvat-Kinase auf (Herzberg et al. 1996; Herzberg et al. 2002). Die CD ist über zwei flexible Linker-Helices N-terminal mit der NBD und C-terminal mit der PBD verbunden. Das katalytisch aktive His-456 (*Flaveria*-Notation), welches die Phosphorylgruppe überträgt, befindet sich am der wässrigen Phase zugewandten Ende der Helix 20 in der CD (Abb. 1.6). Ein PPDK-Monomer weist ein Molekulargewicht von etwa 95 kDa auf.

Eine bemerkenswerte Eigenschaft der PPDK ist die Kältelabilität der meisten Isoformen. Bei Temperaturen unter 10 °C büßt das Enzym einen Großteil seiner Aktivität ein (Hatch und Slack 1968). Nachfolgende Untersuchungen führten diesen beobachteten Aktivitätsverlust auf eine Änderung des oligomeren Zustandes zurück: So ist die aktive Form der aus Mais isolierten PPDK ein Tetramer, während die durch Kälte inaktivierte Form als Di- und Monomer vorliegt (Sugiyama 1973; Shirahashi et al. 1978). Zudem ist die Inaktivierung durch einfaches Erwärmen auf 30 °C weitestgehend reversibel (Burnell und Hatch 1985; Ashton et al. 1990). Sugiyama (1973) konnte auch bei der isolierten Dimerform eine Restaktivität feststellen. Für die Ausbildung von Tetrameren, sowie für die katalytische Aktivität werden zudem Mg^{2+}-Ionen benötigt (Sugiyama 1973; Nakamoto 1990). Für bakterielle PPDKs wurde hingegen das Dimer als aktive Form beschrieben.

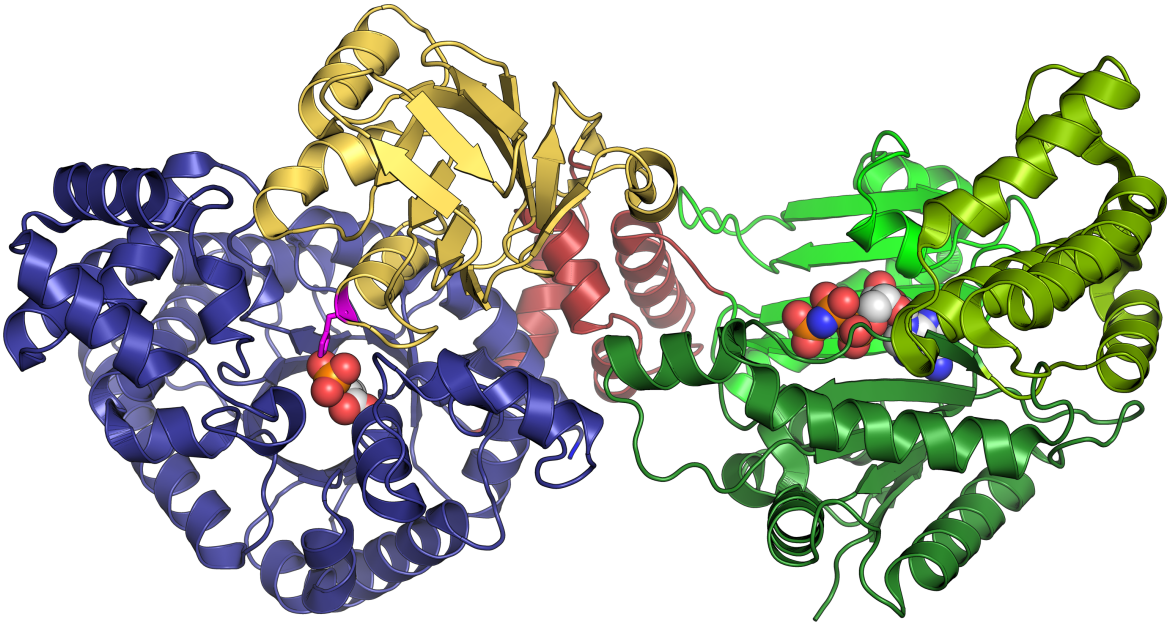


Abbildung 1.6.: Darstellung der Domänenorganisation der PPDK aus *F. trinervia* (PDB 5JVL/D) als Bändermodell. Die N-terminale NBD ist in grün abgebildet, wobei die einzelnen Subdomänen in verschiedenen Grüntönen dargestellt sind. Die CD ist gelb und die C-terminale PBD blau gefärbt. Dem Betrachter zugewandt ist das N-terminale Ende der Helix 20 mit dem dort befindlichen katalytischen His-456 (magenta). Die die CD mit den beiden Substratbindesomänen verbindenden Linker sind rot gefärbt. In den beiden Substratbindedomänen sind das ATP-Analogon 2'-Br-dAppNHp sowie PEP als Kalottenmodell dargestellt.

Die Ausprägung der Kältelabilität variiert teils auch innerhalb eines Genus stark. So wird die PPDK aus *F. trinervia* bei einer Inkubation von 30 min bei 0 °C nahezu vollständig inhibiert (Abb. 1.7), während die PPDK aus *Flaveria brownii* nach Kältebehandlung noch eine Restaktivität von 80 % aufweist (Burnell 1990). Sequenzvergleiche zwischen den verschiedenen *Flaveria*-Spezies lassen aufgrund der ansonsten überaus hohen Sequenzidentität darauf schließen, dass die in z.B. *F. brownii* beobachtete Unempfindlichkeit der PPDK gegenüber Kälte auf nur drei Aminosäuresubstitutionen (Gln790Pro, Ile806Leu, Ile873Val; vgl. Anhang A.1) zurückzuführen ist (Usami et al. 1995; Ohta et al. 1996). Vermutlich spielen diese drei Reste eine besondere Rolle bei der Stabilisierung des dimeren und/oder tetrameren Oligomerisierungszustands über hydrophobe Wechselwirkungen.

Herzberg et al. klärten 1996 die dreidimensionale Struktur der bakteriellen PPDK aus *Clostridium symbiosum* auf (PDB 1DIK). Anhand dieser und unter Berücksichtigung der oben genannten Domänenorganisation postulierten sie den so genannten *Swiveling-Domain*-Mechanismus, welcher seitdem als Modell zur Erklärung der Funktion der PPDK dient. Die CD

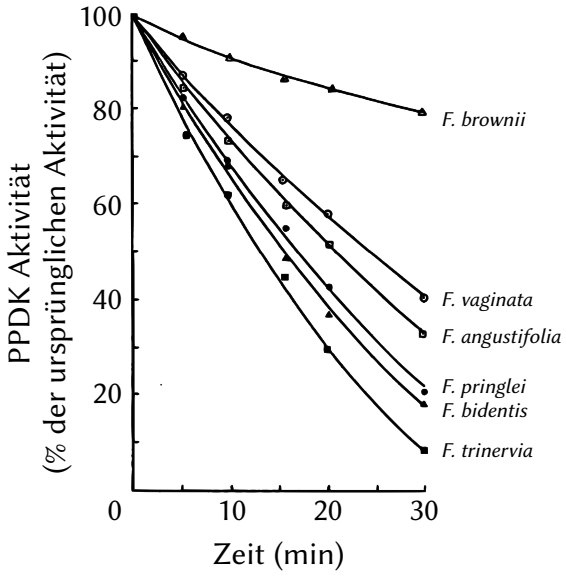


Abbildung 1.7.: Kältelabilität der PPDK (verändert nach Burnell 1990). Aktivität der PPDK verschiedener Spezies des Genus *Flaveria* nach Inkubation bei 0 °C. Während die PPDK aus *F. trinervia* eine Restaktivität von etwa 10 % nach 30 min zeigt, beträgt die Restaktivität der PPDK aus *F. brownii* gut 80 %.

beschreibt dabei zusätzlich zu einer Translationsbewegung eine Rotation von ∼104° um eine gedachte Drehachse entlang der sie mit den beiden Substratbindedomänen verbindenden flexiblen Linker-Helices. Hierdurch kann dann die an die ε-Aminogruppe des katalytischen Histidins gebundene Phosphorylgruppe von der NBD auf die PBD und umgekehrt übertragen werden, wobei eine Distanz von etwa 45 Å überbrückt wird (Herzberg et al. 1996; Lim et al. 2007). Später veröffentlichte Strukturen von PPDKs aus *Trypanosoma brucei* (Cosenza et al. 2002) und *Zea mays* (Nakanishi et al. 2005) bestätigten den vorgeschlagenen Mechanismus.

1.5.2. Regulation

Reguliert wird die Aktivität der PPDK über die ADP-abhängige Phosphorylierung eines Threoninrestes (Thr-454 in *Flaveria*) (Burnell und Hatch 1985). Die Phosphorylierung der PPDK hat hierbei eine Inaktivierung zur Folge (Abb. 1.8). Dies erfolgt in Pflanzen lichtabhängig durch das PPDK regulierende Protein (PPDK-RP): Bei Illumination wird die PPDK dephosphoryliert, bei Dunkelheit phosphoryliert. Eine zentrale Domäne des PPDK-RP findet sich auch in Bakterien, welche die PPDK als glykolytisches Enzym einsetzen (Burnell und Chastain 2006; Burnell 2010), so dass – auch aufgrund des konservierten Vorhandenseins des regulatorischen Threoninresten – davon ausgegangen werden kann, dass die Regulation der PPDK im Allgemeinen und nicht nur in Pflanzen über einen ähnlichen

Mechanismus erfolgt. Bemerkenswert ist hierbei, dass sowohl die Phosphorylierung, als auch die Dephosphorylierung durch ein und dasselbe Enzym katalysiert werden (Burnell und Hatch 1983), welche bei anderen posttranslational phosphorylierten Proteinen zumeist von jeweils einer distinkten Kinase und einer Phosphatase übernommen werden (Smith und Walker 1996; Hardie 1999). Anhand der jüngst aufgeklärten Kristallstruktur des PPDK-RP aus *Z. mays* (PDB 5D0N) werden beide Funktionalitäten einer Domäne am C-Terminus des PPDK-RP zugeordnet (Jiang et al. 2016). Der regulatorische Threoninrest der PPDK befindet

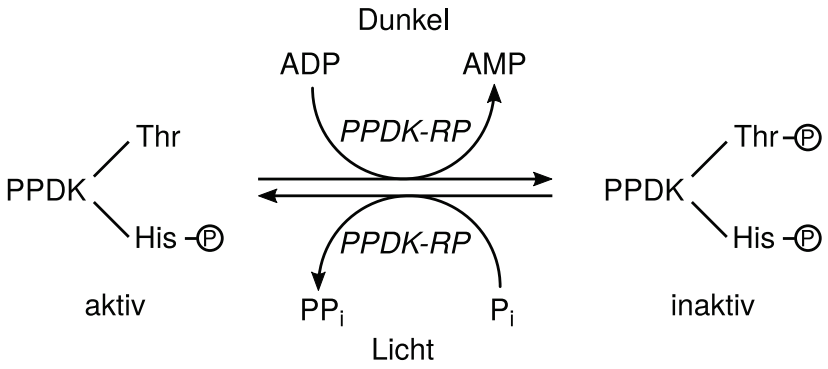


Abbildung 1.8.: Regulation der PPDK über post-translationale Phosphorylierung eines Threonins (verändert nach Chastain et al. 2011). Die am katalytischen Histidin phosphorylierte Form der PPDK kann durch das PPDK-RP unter ADP-Verbrauch an einem regulatorisch wirksamen Threoninrest phosphoryliert werden. Die resultierende, zweifach phosphorylierte Form der PPDK ist inaktiviert.

sich in unmittelbarer Nähe des katalytisch relevanten Histidins (Thr-454 und His-456). Der postulierte Wirkmechanismus geht von einer elektrostatischen Abstoßung bei Annäherung an die ähnlich geladenen Substrate PEP und Pyruvat aufgrund der zusätzlichen zweifach negativen Ladung des phosphorylierten Threonins aus. Somit wird eine Phosphorylgruppenübertragung effektiv unterbunden. Diese Hypothese wurde durch Subtitutionsmutanten überprüft, bei welchen das regulatorische Threonin durch Aspartat oder Glutamat ersetzt wurde, was die negative Ladung bei Phosphorylierung dieses Restes nachbildet. Die so generierten Phosphorylierungsmutanten zeigten keinerlei Aktivität, was dem beobachteten Effekt der Threoninphosphorylierung entspricht (Chastain et al. 2000).

1.5.3. Funktion der Pyruvat-Phosphat Dikinase

Die PPDK erfüllt auf Grund der freien Reversibilität der von ihr katalysierten Reaktion in verschiedenen Organismen unterschiedliche Funktionen. So wird in Bakterien, Archäen

und Protozoen in der Regel die Pyruvat bildende Richtung vorgefunden, wobei zusätzliches ATP gebildet wird. In C_4-Pflanzen bedingt der Einsatz im Rahmen der C_4-Photosynthese die PEP bildende Reaktionsrichtung. Vielfältig und noch nicht umfassend geklärt stellt sich die Funktion der PPDK hingegen in C_3-Pflanzen dar.

C_3-Pflanzen

Die biochemische Charakterisierung von C_3-PPDKs wird, trotz ihres ubiquitären Vorkommens in vielen Geweben von C_3-Pflanzen, durch ihre nur sehr geringe Konzentration erschwert (Chastain und Chollet 2003). *In vivo* ist es so nur schwer möglich die Umsetzung der Substrate, sowie die Produktbildung der PPDK zuverlässig zu verfolgen, da ihre Aktivität durch den Hintergrund anderer Reaktionen – beispielweise der Pyruvat-Kinase oder der PEP-Carboxykinase – maskiert wird (Chastain et al. 2011). Zudem zeigen *knock-out* Linien von *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* bei normalen Wachstumsbedingungen keinerlei phänotypischen Auffälligkeiten (Kang et al. 2005; Chastain et al. 2011).

Für einige Spezialfälle, bei denen die PPDK lokal in großen Konzentrationen vorkommt, liegen hingegen genauere Erkenntnisse vor. So wird in sich entwickelnden Samen von *O. sativa* und *Z. mays* die PPDK in frühen Entwicklungsphasen in großen Mengen im Cytosol des Endosperms exprimiert (Chastain et al. 2006; Mechin et al. 2007; Hennen-Bierwagen et al. 2009). In späteren Phasen wird hingegen die Genexpression herunterreguliert, sowie vorhandene PPDK durch Phosphorylierung posttranslational inaktiviert (vgl. 1.5.1). Hieraus wurde geschlossen, dass die PPDK in diesem Fall funktionell mit Stoffwechselwegen verknüpft ist, welche charakteristisch für die frühe Samenentwicklung sind. Zu nennen sind beispielsweise die Fett- und Aminosäure-, sowie die Lipidsynthese. Gestützt wird diese Annahme durch die starke pH-Abhängigkeit der PPDK in Bezug auf die bevorzugte Reaktionsrichtung. Von C_4-PPDKs ist aus *in vitro* Studien bekannt, dass ihr pH-Optimum für die PEP bildende Reaktionsrichtung bei pH 8,3 liegt. Dieser pH entspricht in etwa dem im Stroma belichteter Chloroplasten. Hingegen läuft die Reaktion in Pyruvat bildender Richtung bevorzugt bei pH 6,8 ab, was in etwa dem vorherrschenden pH im Cytosol entspricht. Bei diesen Bedingungen läuft die PEP bildende Reaktion nur noch mit etwa 6 % der ursprünglichen Reaktionsrate bei pH 8,3 ab (Jenkins und Hatch 1985). Das gebildete Pyruvat steht dann als Substrat für den Aufbau von freien Fettsäuren, oder die Transaminierung von Pyruvat zu Alanin zur Verfügung.

In seneszenten Blättern von *A. thaliana* konnte ebenfalls gezeigt werden, dass die cytosolische Form der PPDK vermehrt exprimiert wird (Taylor et al. 2010). Hier wurde postuliert, dass die PPDK wahrscheinlich an der Stickstoffremobilisierung beteiligt ist. Dabei soll Pyruvat, welches aus der Desaminierung von anderen Aminosäuren frei gesetzt wird durch die PPDK in PEP umgesetzt und nachfolgend der Glutamin-Biosynthese zugeführt werden (Taylor et al. 2010). Dieser vorgeschlagene Mechanismus setzt allerdings die freie Reversibilität der durch die PPDK katalysierten Reaktion bei den im Cytosol vorherrschenden Bedingungen voraus. Wie bereits zuvor diskutiert, ist die PEP bildende Reaktion bei pH 6,8 stark benachteiligt. Zudem wirkt PP_i als nicht-kompetitiver Inhibitor der PEP-Bildung mit einem K_i von 0,3 mM (Jenkins und Hatch 1985). Im Cytosol liegt PP_i in vergleichsweise hoher Konzentrationen von ebenfalls etwa 0,3 mM vor (Stitt 1990; Dennis und Blakeley 2000). Somit kann die Reaktionsrichtung der PPDK im Cytosol als beschränkt auf die Pyruvat-Bildung angesehen werden. Analog zur Funktion der PPDK in einigen anaerob lebenden Bakterien wurde zusätzlich vorgeschlagen, dass sie möglicherweise ATP in hypoxischen Geweben zur Verfügung stellt (Moons et al. 1998; Chastain et al. 2006).

C_4-Pflanzen

In C_4-Pflanzen katalysiert die PPDK die Regeneration des primären CO_2-Akzeptors PEP im Stroma der Mesophyllzellen-Chloroplasten. Der Anteil der PPDK an der gesamten Menge löslichen Proteins in Blättern von C_4-Pflanzen ist sehr hoch und kann bis zu 10 % betragen (Edwards et al. 1985). Die Bevorzugung der PEP-Bildung wird zum einen durch den bei Belichtung vorliegenden alkalischen pH-Wert im Chloroplastenstroma, sowie durch die im Überschuss vorhandene Pyrophosphatase aufrechterhalten, welche eine Produktinhibierung durch sich im Stroma anreicherndes PP_i verhindert.

In ihren biochemischen Eigenschaften, sowie ihrer Funktionalität unterscheiden sich die C_4-PPDKs nicht von jenen aus C_3-Pflanzen oder PPDKs nicht-pflanzlichen Ursprungs. Die katalytisch wichtigen Regionen des Proteins sind zwischen all diesen Isoformen konserviert (vgl. auch Anhang A.1). Somit ist die besonders herausgehobene Bedeutung der PPDK in C_4-Pflanzen nicht auf eine funktionelle Änderung des Proteins an sich zurückzuführen, sondern eher auf eine Änderung des Promotors, welche eine spezifische und gesteigerte Expression der PPDK im Stroma der Mesophyllzellen zur Folge hatte (Sheen 1991; Chastain 2011).

Nicht-pflanzliche Organismen

Isoformen der PPDK sind aus Bakterien, Archäen und Protozoen bekannt. Insbesondere in Spezies, welche in sauerstoffarmen Habitaten leben, erfüllt die PPDK die Rolle eines primären oder sekundären glykolytischen Enzyms. Die freie Reversibilität der katalysierten Reaktion erlaubt neben der Synthese von ATP unter Verwendung von PEP und PP_i auch die Bildung von PEP im Zuge der Gluconeogenese (Mertens 1993; Chastain et al. 2011). Durch Ausnutzung synergetischer Effekte zwischen der Adenylatkinase (AK), einer PP_i-abhängigen Phosphofructokinase (PFK) und der PPDK lässt sich die Ausbeute im Vergleich zur konventionellen Glykolyse von drei Molekülen ATP je Molekül Glukose auf fünf Moleküle ATP steigern (Abb. 1.9). Hierbei wird die hohe Bindungsenergie des PP_i von der PPDK zum Aufbau von ATP genutzt (Huang et al. 2008).

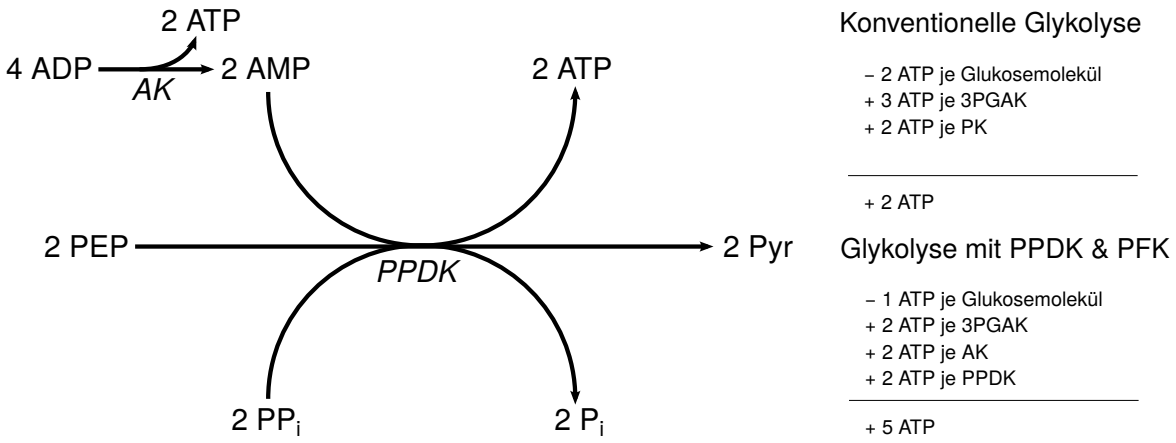


Abbildung 1.9.: Einsatz der PPDK als glykolytisches Enzym zum ATP-Aufbau (verändert nach Chastain et al. 2011). Im Vergleich zur konventionellen Glykolyse können im Zuammenspiel mit der Adenylatkinase (AK) und einer PP_i-abhängigen Phosphofructokinase (PFK) drei zusätzliche Moleküle ATP je Glukosemolekül generiert werden. Weitere verwendete Abkürzungen: 3-Phosphoglyceratkinase (3PGAK), Pyruvatkinase (PK).

1.6. Zielsetzung der Arbeit

Die grundlegende dreidimensionale Organisation der PPDK war zu Beginn dieser Arbeit bereits durch veröffentlichte Strukturen aus *C. symbiosum*, *Z. mays* und *T. brucei* bekannt. Ebenso unstrittig ist ihre enorme Bedeutung im Rahmen der C_4-Photosynthese, bei welcher sie neben der RuBisCO und PEPC eines der limitierenden Enzyme dargstellt. Der anhand der verfügbaren Strukturdaten postulierte *Swiveling-Domain*-Mechanismus erscheint aufgrund

der vorliegenden Erkenntnisse plausibel, ist jedoch nicht durch zeitaufgelöste Einzelmolekülmessungen oder isolierte Zwischenstufen der Schwenkbewegung der Zentraldomäne belegt, sondern interpoliert linear zwischen zwei durch Kristallstrukturen bekannten Extremkonformationen. Eines des primären Ziele dieser Arbeit war daher die Aufklärung putativer Zwischenzustände mittels Röntgenkristallographie. Hierbei sollten durch geeignete Kristallisationsbedingungen intermediäre und potentiell nur kurzlebige Konformationen der CD stabilisiert werden. Hierdurch sollte ein detaillierteres Bild des *Swiveling-Domain*-Mechanismus gewonnen werden. Der Bindungsmodus von Nukleotiden innerhalb der NBD und die Konsequenz der Bindung auf die Konformation der NBD war bisher nur durch Analogie zu anderen Proteinen mit *ATP-grasp* bekannt und sollte daher ebenfalls durch Co-Kristallisation mit geeigneten Nukleotiden oder Nukleotidanaloga aufgeklärt werden.

Weiterhin sollte untersucht werden, ob sich distinkte Unterschiede auf Strukturebene zwischen der C_3- und C_4-Form aus *F. pringlei* bzw. *F. trinervia* zeigen, welche entweder Rückschlüsse auf eine unterschiedliche Funktionalität ermöglichen, oder aber zur spezifischen Inhibierung einer der beiden Formen genutzt werden können. Letztlich galt es auch die generelle Beeinflussung der Aktivität durch geeignete und bislang nicht für die PPDK beschriebene Inhibitoren zu ermitteln.

2. Strukturelle Intermediate und gerichtete Bewegung der Zentraldomäne im katalytischen Mechanismus der Pyruvat-Phosphat Dikinase

Titel Structural intermediates and directionality of the swiveling motion of Pyruvate Phosphate Dikinase

Autoren Alexander Minges, Daniel Ciupka, Christian Winkler, Astrid Höppner, Holger Gohlke und Georg Groth

Eigener Anteil 30 %

Schreiben des Manuskriptes, Expression und Reinigung rekombinanter Proteine, Kristallisation und Strukturaufklärung, Datenanalyse

Veröffentlicht in *Scientific Reports* (DOI: 10.1038/srep45389)

Originalartikel veröffentlicht unter einer Creative Commons-Lizenz: Namensnennung International 4.0 (CC BY 4.0)



Impact-Faktor (2015) 5,228

Pyruvate phosphate dikinase (PPDK) is a vital enzyme in cellular energy metabolism catalyzing the ATP- and P_i-dependent formation of phosphoenolpyruvate from pyruvate in C_4-plants, but the reverse reaction forming ATP in bacteria and protozoa. The multi-domain enzyme is considered an efficient molecular machine that performs one of the largest single domain movements in proteins. However, a comprehensive understanding of the proposed swiveling domain motion has been limited by not knowing structural intermediates or molecular dynamics of the catalytic process. Here, we present crystal structures of PPDKs from *Flaveria*, a model genus for studying the evolution of C_4-enzymes from phylogenetic ancestors. These structures resolve yet unknown conformational intermediates and provide the first detailed view on the large conformational transitions of the protein in the catalytic cycle. Independently performed unrestrained MD simulations and configurational free energy calculations also identified these intermediates. In all, our experimental and computational data reveal strict coupling of the CD swiveling motion to the conformational state of the NBD. Moreover, structural asymmetries and nucleotide binding states in the PPDK dimer support an alternate binding change mechanism for this intriguing bioenergetic enzyme.

Life depends on the light-driven fixation of CO_2 during photosynthesis. Two major types of photosynthesis have been established during evolution. C_3 photosynthesis, where primary carboxylation takes place in the Calvin-Benson cycle, is the typical pathway used by most plants. Higher efficiency in light-driven energy conversion is realized in C_4 plants, where primary carbon fixation is spatially separated from carbon release to the Calvin-Benson cycle. Here, the rate limiting regeneration of the primary CO_2 acceptor phosphoenolpyruvate (PEP) is catalyzed by the multi-domain protein pyruvate phosphate dikinase (PPDK) (Edwards et al. 1985). In addition to its essential role in C_4 plants, PPDK is also found in various bacteria and protozoa, where the enzyme catalyzes the reverse reaction – ATP formation from AMP, pyrophosphate and PEP – during glycolysis (Chastain et al. 2011). The different directions of the catalytic reaction favored in plants and microorganisms underline that the enzyme is a reversible molecular machine. Bacterial PPDKs are known to form fully active homodimers, while for a number of plant PPDKs the active form was attributed to a homotetramer (Hatch 1979; Shirahashi et al. 1978; Sugiyama 1973). Ubiquitous distribution and low expression pattern (Chastain and Chollet 2003) preclude *in vivo* detection of C_3-PPDK catalytic products against a background of other pyruvate/PEP converting enzymes such as pyruvate kinase or PEP carboxykinase (Chastain et al. 2011), leaving the physiological function of PPDK in

C_3 plants largely unknown. Though, cytoplasmic C_3-PPDK is considered to play a role as secondary glycolytic enzyme based on its abundance in developing rice endosperm (Chastain et al. 2006).

Previous studies emphasize that PPDK has a modular structure consisting of distinct substrate binding domains for PEP/pyruvate at the C-terminus (PBD) and for nucleotides ATP/AMP at the N-terminus (NBD, aa 1–340) (Supplementary Fig. 2.7a). The NBD is structured in three subdomains: NBD1 (aa 1–111 and 197–243), NBD2 (aa 112–196), and NBD3 (aa 244–340). A central domain (CD, aa 380–515) catalyzing the phosphoryl group transfer from ATP to pyruvate – or from PEP to AMP – via a phospho-histidine intermediate mediates a catalytic cross-talk between the distant substrate binding domains (Supplementary Fig. 2.7b) (Herzberg et al. 1996; Lim et al. 2007). Distinct conformational states resolved in crystal structures from maize and the non-plant organisms *Clostridium symbiosum* and *Trypanosoma brucei* suggest that the phosphoryl group transfer in the catalytic cycle is accompanied by a large swiveling motion of the CD from a position next to the NBD to a position facing the PBD (~110° and 45 Å) (Herzberg et al. 1996; Lim et al. 2007; Herzberg et al. 2002; Nakanishi et al. 2005). Similar single domain conformational re-arrangements have been observed for other proteins or protein assemblies, and domain swiveling is a common mechanism in enzyme catalysis, molecular transport, or electron transfer (Korolev et al. 1997; Nguyen and Whitford 2016; Schuwirth 2005; Zhang et al. 1998). Still, the proposed translocation of the PPDK CD reflects one of the largest single domain movements observed in proteins yet. However, detailed insights into the molecular processes during the proposed swiveling motion, in particular on intermediate conformations of the CD and NBD, and potential driving forces behind the motion have remained elusive. Here, we co-crystallized the C_4-PPDK from *Flaveria trinervia* and the related C_3-PPDK from *Flaveria pringlei* with their natural product PEP and the substrate analogue 2'-Bromo-2'-deoxy-adenosine-5'-[-(β,γ)-imido]triphosphate (2'-Br-dAppNHp). Both isoforms share 96% sequence identity – excluding the chloroplast transport peptide – and have a monomeric molecular weight of ~95 kDa. Using X-ray crystallography, we solved for the first time structures of ternary complexes of this multi-domain enzyme. The C_4-PPDK structures (PDB 5JVJ and 5JVL) resolve intermediates of the NBD opening-closing motion with 5JVL providing the first structural model with bound nucleotide in the NBD. In addition, these structures substantiate that the catalytic histidine in the CD mediating phosphoryl group transfer between the active sites at the N- and C-terminus is positioned in close proximity to the bound PEP

molecule. More importantly, the C_3-PPDK structure from *F. pringlei* (PDB 5JVN) for the first time has trapped an intermediate state of the central domain, shedding light on sequential steps of the swiveling motion. The analysis of essential motions in available crystal structures and unrestrained molecular dynamics simulations reveal coupled motions of the CD and the NBD for non-phosphorylated PPDK. Extensive 1D and 2D potential of mean force (PMF) calculations of the CD motion also reveal the existence of distinct intermediate conformational states, resulting in sawtooth-like free energy profiles that are indicative of a Brownian ratchet mechanism biasing random thermal fluctuations. Furthermore, they suggest a tilting of the configurational free energy profiles depending on the binding state of the NBD and the phosphorylation state of the CD.

Results and Discussion

Overall structure of *Flaveria* PPDKs

The structure of the C_4-isoform of PPDK from the flowering plant *Flaveria trinervia* was determined by molecular replacement at 2.9 Å resolution using the maize structure (PDB ID 1VBH) (Nakanishi et al. 2005) as a template. The structure (PDB 5JVJ) includes two monomers in the asymmetric unit (ASU) forming a dimer that corresponds to the previously described biological assembly of bacterial and maize PPDK (Herzberg et al. 1996; Nakanishi et al. 2005) with an overall well-defined electron density for the entire monomer A and for the PBD of monomer B. Parts of the NBD of monomer B revealed only poorly defined electron density, and direct tracing of monomer B in these regions was hampered. Yet, both monomers show electron density in the PBD for the co-crystallized substrate PEP. Besides, the NBD of monomer B exhibits additional density in both the $mF_o - DF_c$ difference map and the feature enhanced maps (FEM, see methods section) probably reflecting a bound adenine nucleotide. The overall shape of this additional density is consistent with structural requirements and binding mode of adenine nucleotides in other nucleotide-binding proteins with the ATP-grasp fold (Qi et al. 2016; Weiße et al. 2016). In addition, this density complies with those observed when PPDK was crystallized in the presence of the nucleotide analogue 2'-Br-dAppNHp (see PDB 5JVL and Fig. 2.2c). However, since the molecular identity of the bound compound was not fully resolved at the present resolution, no compound was placed in this density in the deposited structure. Large parts of monomer B were successfully built

using monomer A as a template by iterative manual model building and refinement. Yet, no conclusive electron density was found for residues 18–22, 47–65, 83–87, 101–106, 120–124, 163–166, 192–198, and 216–236. An overall root mean square deviation (RMSD) of 4.8 Å was calculated from a structural alignment of the individual monomers of the PPDK dimer in 5JVJ, indicating a substantial difference in their conformation. The main difference is found in the NBD of both monomers with the A monomer reflecting an open conformation and the B monomer reflecting a closed conformation of this domain. Overall, the orientation of NBD1 (aa 1–111 and 197–243) and NBD2 (aa 112–196) relative to NBD3 (aa 244–340) is greatly changed in the two monomer conformations (Fig. 2.1d-f). Superimposition of the NBD subdomains highlights that NBD1 is reoriented by a large motion of about 40° around a hinge region consisting of two short peptide linkers formed by residues 112–115 and 195–200 towards NBD3. At the same time, NBD2 is displaced by about 40° to accommodate for the new position of NBD1. The hinge motion of NBD1 and NBD2 results in the closing of the large cleft formed in the open configuration of the PPDK monomer (Fig. 2.1d-f). This cleft is no longer accessible in the closed form of the PPDK monomer. The presence of two structurally distinct conformations of the PPDK monomer (NBD open versus closed) within a single crystal structure may suggest that these structural asymmetries reflect functional asymmetries in substrate binding and/or catalytic turnover in the individual subunits of the PPDK dimer. A similar structural asymmetry in the monomer arrangement (open versus closed) was observed in the crystal structure of bacterial ATP-dependent DNA helicases and related to functional asymmetry in the mechanism of ATP hydrolysis in solution in each of the two subunits forming the functional dimer (Korolev et al. 1997; Wong and Lohman 1997).

When 2'-Br-dAppNHp was used for co-crystallization (PDB 5JVL), the crystal contains four monomers in the ASU arranged in terms of two dimers. The dimers correspond to the subunit arrangement in 5JVJ. Electron density maps (Supplementary Fig. 2.9) clearly indicate main chain connectivity and most of the side chain orientations for subunits A, C and D, whereas the majority of the NBD in chain B is not traceable. The overall structures of both *Ft*PPDK crystal forms (Fig. 2.1a/d/e/f) are highly similar to PPDKs from *C. symbiosum*, *T. brucei* and *Z. mays* (Herzberg et al. 1996; Cosenza et al. 2002; Nakanishi et al. 2005) consisting of an N-terminal NBD (aa 1–340), a CD (aa 380–515) of β-strands with associated α-helices that contain the catalytic H456 in helix 20 involved in the phosphoryl group transfer between NBD and PBD, and a C-terminal TIM barrel containing the PBD

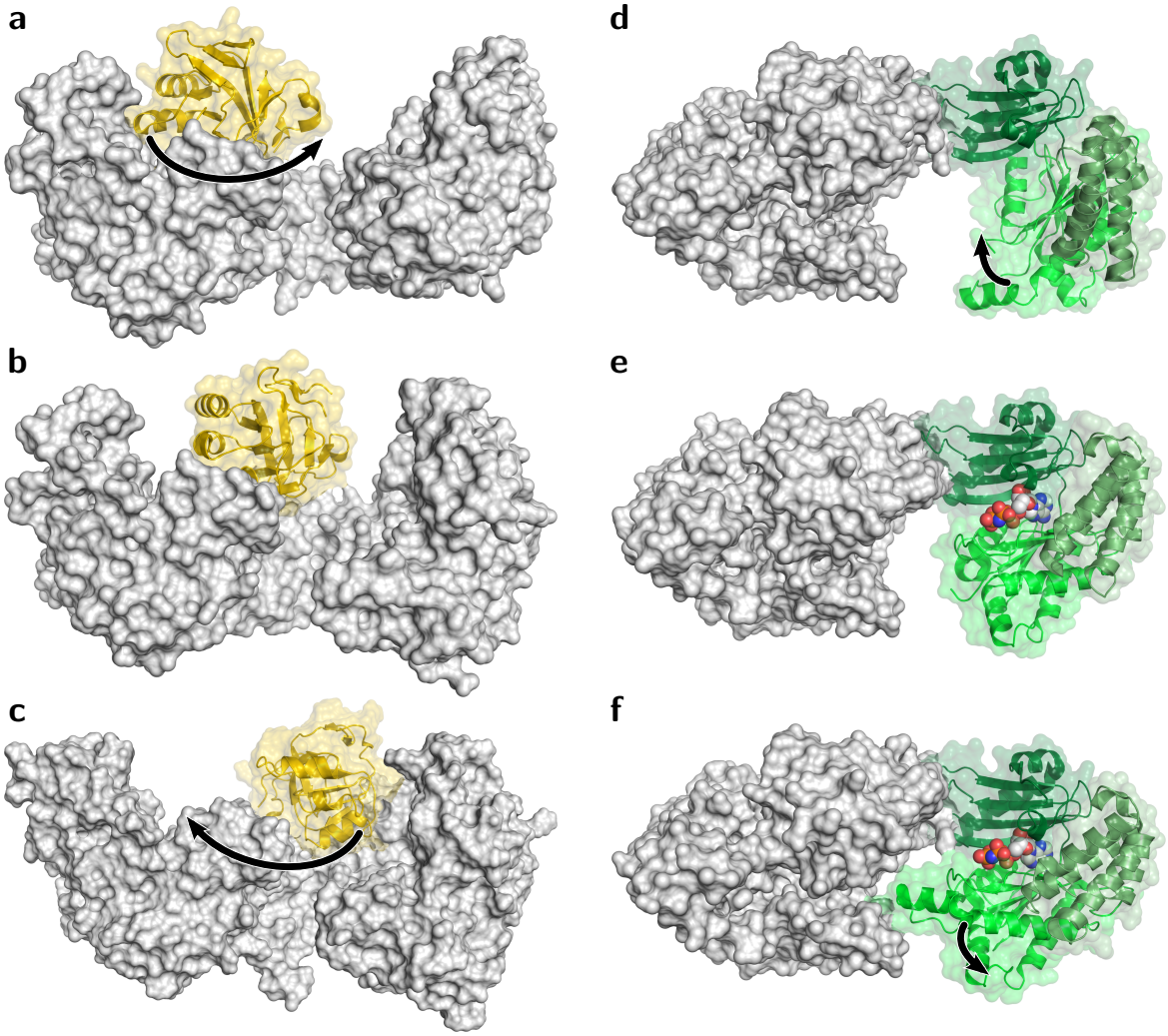


Figure 2.1.: Movement of the PPDK domains. (a-c) Movement of the CD (yellow). (a) *Ft*PPDK in PBD-facing conformation (PDB 5JVL/C). (b) *Fp*PPDK (PDB 5JVN) with CD in an intermediate position. (c) *Tb*PPDK (PDB 2X0S) (Cosenza et al. 2002) with CD in NBD-facing conformation. (d-f) Movement of the NBD (the three subdomains are depicted by three different greens). (d) *Ft*PPDK in nucleotide-unbound state (PDB 5JVJ/A). (e) *Ft*PPDK in semi-closed, nucleotide-bound state (PDB 5JVL/C). (f) *Ft*PPDK in fully closed, nucleotide-bound state (PDB 5JVL/A).

(aa 535–874). For monomers C and D of 5JVL, the catalytic H456 is located in close position and appropriate orientation to the bound PEP substrate to mediate phosphoryl group transfer from the NBD to the PBD (Fig. 2.2a/b). Such a close contact has never been observed in previously reported PPDK structures, but has been resolved in Enzyme I of the *E. coli* Phosphoenolpyruvate:Sugar Phosphotransferase System (PTS), a bacterial carbohydrate import system bearing a homologous PEP binding domain (Teplyakov et al. 2006). For structural comparison of the catalytic sites in PTS Enzyme I and the PPDK a set of reference atoms was selected. While the catalytic histidine in the PTS Enzyme I structure is in the phosphorylated state, the corresponding histidine in the active site of PPDK structure 5JVL is in the non-phosphorylated form. On the contrary, PPDK substrate PEP is phosphorylated, whereas PTS Enzyme I substrate inhibitor oxalate is not. Hence, atoms $N_{\varepsilon 2}$ of the catalytic histidine oxygen atoms O2 in oxalate and PEP in 5JVL were used for distance measurements and structural comparison of both enzymes at their PEP binding site. In the PTS Enzyme I structure, the distance between the phosphorylated $N_{\varepsilon 2}$ atom of the catalytic H189 and the oxygen atom O2 of the oxalate substrate is 4.9 Å. The distance between $N_{\varepsilon 2}$ of the catalytic H456 and O2 of the PEP substrate in chain C and D of the 2'-Br-dAppNHp-*Ft*PPDK structure is similar (4.5 Å) (Fig. 2.2b), which emphasizes the close structural relationship of the newly described extreme conformation observed in 5JVL chains C and D and the PTS Enzyme I structure. This close spatial arrangement of the catalytic histidine and the phosphoryl group substrate in the PEP binding site enables efficient phosphoryl group transfer from PEP to H456 or H456 to pyruvate in PPDK as for PTS Enzyme I. The distance between the nucleophilic nitrogen atom $N_{\varepsilon 2}$ of H456 in the 2'-Br-dAppNHp-*Ft*PPDK structure and the attacked phosphorus of PEP is around 3 Å (Fig. 2.2b). This relatively short distance is indicative for an associative in-line displacement of the phosphoric monoester (Mildvan and Gupta 1978; Knowles 1980). Therefore, the structural conformations resolved in the 2'-Br-dAppNHp-*Ft*PPDK structure visualize and verify for the first time the proposed phosphoryl group transfer mechanism in the PBD and the involvement of the catalytic histidine in the CD in this process.

Considering the overall CD, only small conformational changes between the plant structures from maize and *Flaveria* presented here and the non-plant structures from *Clostridium* and *Trypanosoma* are evident indicating that this domain primarily rotates as a rigid body. However, in contrast to the crystal structures of the non-plant PPDKs where the CD is close to the NBD, the CD of *Ft*PPDK rests alongside the PBD (Fig. 2.1a) as observed for PPDK

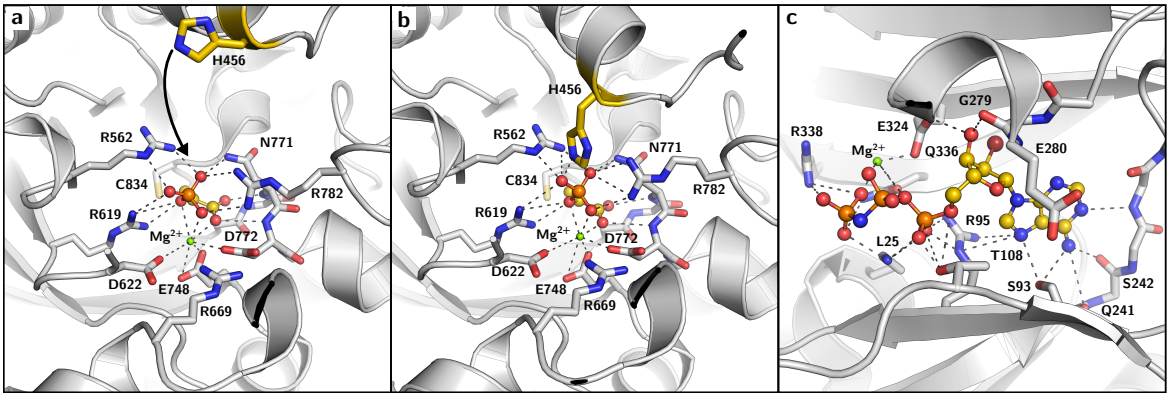


Figure 2.2.: Substrate binding sites of *Ft*PPDK. (a) Semi-closed state of the PEP binding site (PDB 5JVL/A) with the catalytic H456 (yellow) pointing away from PEP. (b) Closed state of the PEP binding site (PDB 5JVL/C) revealing tight interactions between PEP and surrounding residues, including the catalytic H456 (yellow). (c) Closed state of the nucleotide binding site of 5JVL/D occupied with 2'-Br-dAppNHp. Interacting residues are highlighted.

from maize (Nakanishi et al. 2005) and the *Clostridium* triple mutant R219E/E271R/S262D (PDB 2R82) (Lim et al. 2007). The different conformations of the NBD observed in the *Flaveria* structures presented in this work cover the whole range of conformational intermediates observed with other members of the ATP grasp family such as synapsin (Esser 1998) or biotin carboxylase (Novak et al. 2010) and reflect individual snapshots of the closing motion of this domain. These structural intermediates of PPDK have been previously proposed based on structures of homologous nucleotide binding enzymes (Ye et al. 2001) but have not been experimentally verified until now.

Structural intermediate of the swiveling motion

In contrast to the C_4 plant crystal structures from *F. trinervia* and maize, the structure of the C_3-isoform of PPDK from *F. pringlei* (Fig. 2.1b) contains only one monomer in the ASU (PDB 5JVN). Remarkably, in this structure the CD is positioned in an intermediate state between the NBD and PBD, thereby enlarging the solvent accessibility of the PEP binding pocket. The CD position is not enforced by crystal contacts and therefore represents a genuine structural intermediate of the proposed swiveling mechanism. The entire domain is rather mobile resulting in higher B-factors in this region. Consequently, the electron density of several side chains in this region is not well defined. Concerning the substrate and cofactor binding site, density is visible for both ligands, PEP and 2'-Br-dAppNHp. Additional density

Table 2.1.: Data collection and refinement statistics

	5JVJ	5JVL	5JVN
Data collection			
Wavelength (Å)	0.9799	0.9193	0.9763
Space group	C121	P1	P622
Cell dimensions			
a, b, c (Å)	208.74, 69.04, 166.76	69.98, 108.44, 152.75	249.34, 249.34, 84.01
α, β, γ (°)	90, 112.84, 90	106.22, 101.81, 98.32	90, 90, 120
Resolution range (Å)	30.74–2.898 (3.002–2.898)	19.79–2.90 (3.003–2.90)	49.54–2.90 (3.040-2.-90)
R_{merge}	0.1013 (0.4002)	0.0965 (0.4446)	0.089 (0.597)
R_{meas}	0.1231 (0.4847)	0.1119 (0.5155)	0.09513 (0.6552)
R_{pim}	0.0689 (0.2696)	0.05663 (0.2604)	0.03553 (0.2468)
I/σ_I	11.18 (3.13)	13.63 (3.21)	13.9 (2.7)
Wilson B ($Å^2$)	39.69	39.21	79.98
Completeness (%)	98 (98)	98 (99)	100 (100)
Multiplicity	3.2 (3.2)	3.9 (3.9)	6.9 (6.8)
Model and refinement			
Reflections (unique/test)	48150/1227	90103/1874	34536/1695
R_{work}/R_{free} (%)	23.7/26.1	21.2/23.2	20.0/23.5
No. of atoms			
Protein	11928	23511	6518
Ligand/ion	22	140	42
B-factors			
Protein	59.21	46.99	90.41
Ligands	29.62	28.59	116.36
RMSD			
Bonds lengths (Å)	0.002	0.017	0.010
Bond angles (°)	0.46	1.45	1.11
Ramachandran analysis			
Favored regions (%)	96.8	98.3	96.7
Allowed regions (%)	3.1	1.7	3.3
Outliers (%)	0.1	0.0	0.0

Highest resolution shell is shown in parentheses.

in the conformational intermediate was observed in close proximity of the phosphoryl group of the PEP substrate. This additional density might reflect an alternative position of the PEP substrate in the PBD. However, the available resolution and data quality prevent modelling of the PEP substrate in those positions in the active site. Compared to the near-PBD positioned conformation of the CD in the C_4-isoform (PDB 5JVL/C and 5JVL/D) the entire CD in the *Fp*PPDK structure is rotated by 45° towards the NBD around a rotation axis formed by the linker region (Fig. 2.3). When compared to the PPDK structure from *Clostridium symbiosum* (*Cs*PPDK, PDB 1KBL) (Herzberg et al. 2002), the CD is rotated in the opposite direction and displaced by 52° towards the PBD. Focusing on the catalytic H456 in the CD, this residue is displaced by 17 Å (C_α-distance) when the *F. pringlei* conformational intermediate (5JVN) and the PBD-facing *Ft*PPDK structures (e.g. 5JVL/C) are aligned, and by 24 Å in the opposite direction when the NBD-facing conformation observed in the *Cs*PPDK is compared to the *Fp*PPDK structure, respectively (Supplementary Fig. 2.13). Hence, compared

to the two extreme conformations of the CD next to the NBD or PBD previously resolved, the CD in the *F. pringlei* conformational intermediate shows about 50% of the rotational and translational movement of the proposed complete swiveling motion. The CD intermediate identified in our crystallographic studies suggests that the swiveling motion of this domain in the catalytic cycle proceeds via at least one sub-step, starting from a position near either the PBD (Fig. 2.1a) or the NBD (Fig. 2.1c) via the intermediate conformation resolved in 5JVN to a position near the other substrate binding site. Similarly, stepped movements have been described e.g. for the F_1 ATPase rotary molecular motor (Yoshida et al. 2001; Yasuda et al. 2001; Kabaleeswaran et al. 2006; Adachi et al. 2007).

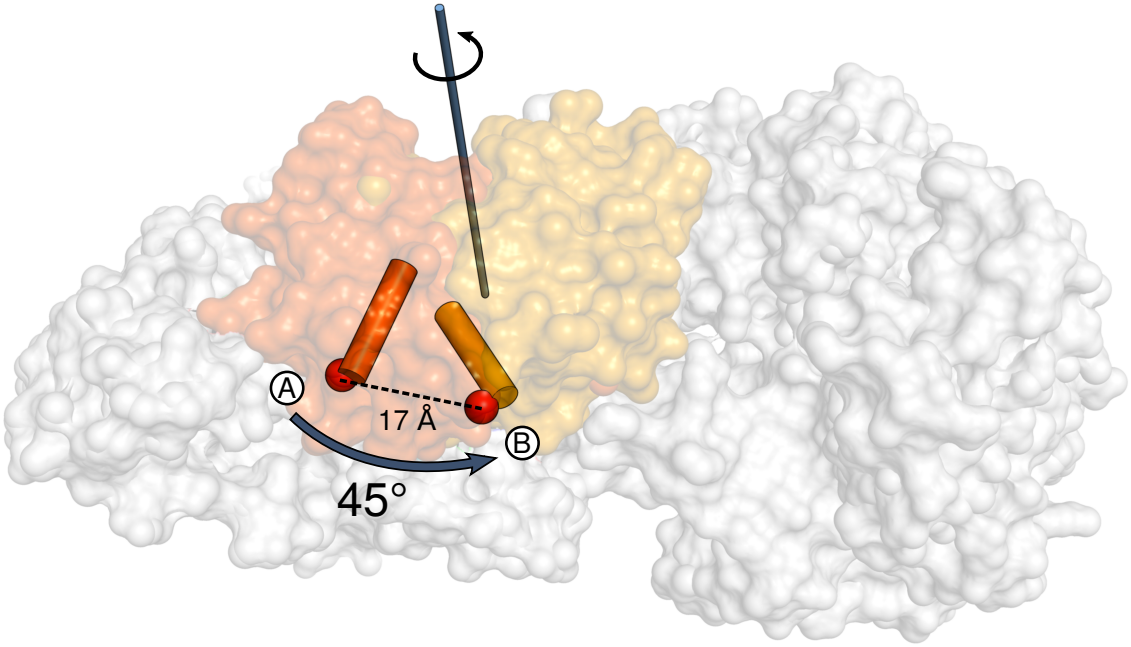


Figure 2.3.: Stepped movement of the CD. CDs of 5JVL/C (A, orange) and 5JVN (B, yellow). Helix 20 containing the catalytic H456 is depicted as cylinder with the C_α atom of H456 shown as red sphere. The rotational axis for the transitions between states A and B is depicted as a blue arrow. The distance between the C_α atoms of the catalytic His456 is shown as a dashed line.

To elucidate critical contacts mediating interactions between the CD or linker domain (LD) and the PBD, the *Fp*PPDK conformational intermediate was analyzed with Cytoscape (Shannon 2003) and RINalyzer (Doncheva et al. 2011), which identified a salt bridge formed between E804 and R462, and non-polar patches at I864 in the PBD and L378 in the LD likely involved in hydrophobic interactions. Both interactions may restrict rotational freedom of

the CD in this state, promoting the stepped motion of the CD. MD simulations confirm the presence of these interactions, although the salt bridge repeatedly forms and breaks (Supplementary Fig. 2.12f/g/h). Conservation analysis of these interactions by ConSurf (Glaser et al. 2003) revealed that only the non-polar patches are universally conserved among plant and non-plant PPDKs, whereas the identified salt bridge is unique to plant PPDKs, although non-plant enzymes might realize a corresponding interaction by an alternative salt bridge formed by R462 with an aspartate residue at position 801.

Conformational space spanned by PPDK structures

To investigate the conformational space spanned by all available PPDK structures including the three newly resolved ones, the structures were clustered with respect to structural similarity. The clustering reveals five conformational states (Fig. 2.4a; Supplementary Tab. 2.3). The *Ft*PPDK structures described above constitute cluster II (PDB 5JVJ/B and 5JVL) and the *Fp*PPDK structure cluster IV (PDB 5JVN) (Supplementary Tab. 2.2 and Supplementary Tab. 2.3), demonstrating that these structures populate hitherto uncharted regions of PPDK's conformational space. In addition, PDB 5JVJ/A supplements cluster III.

A principle component analysis in Cartesian coordinate space (PCA) across PPDK crystal structures corroborates the existence of two predominant motions: ~89% of the variance in the C_α atom coordinates can be explained by the first two principal components (PC) (Supplementary Fig. 2.10a). Atomic displacements along the component directions and a domain-wise index of the collectivity of motions (eq. 2.1, Supplementary Fig. 2.10b) reveal that the first PC predominantly characterizes a swiveling motion of the CD (Fig. 2.4b). The second PC characterizes a coordinated opening-closing motion of the NBD, with almost exclusively the first and second subdomain executing the movement (Fig. 2.4b and Supplementary Fig. 2.10b). Notably, the first PC also indicates a coupling of the swiveling motion of the CD with the opening-closing motion of the NBD as this PC leads to displacements in both domains (Fig. 2.4b). Cross-correlations of atomic fluctuations computed from the cluster-representative crystal structures agree very well with this result (Fig. 2.4c/upper triangle): They reveal, aside from positively correlated motions of the NBD, CD, and PBD themselves, weakly anti-correlated motions between the CD and the NBD (correlation coefficient down to −0.2), in agreement with the collective motions described by the first PC (Fig. 2.4b). Particularly, subdomains NBD1 and NBD2 move towards the CD if the latter

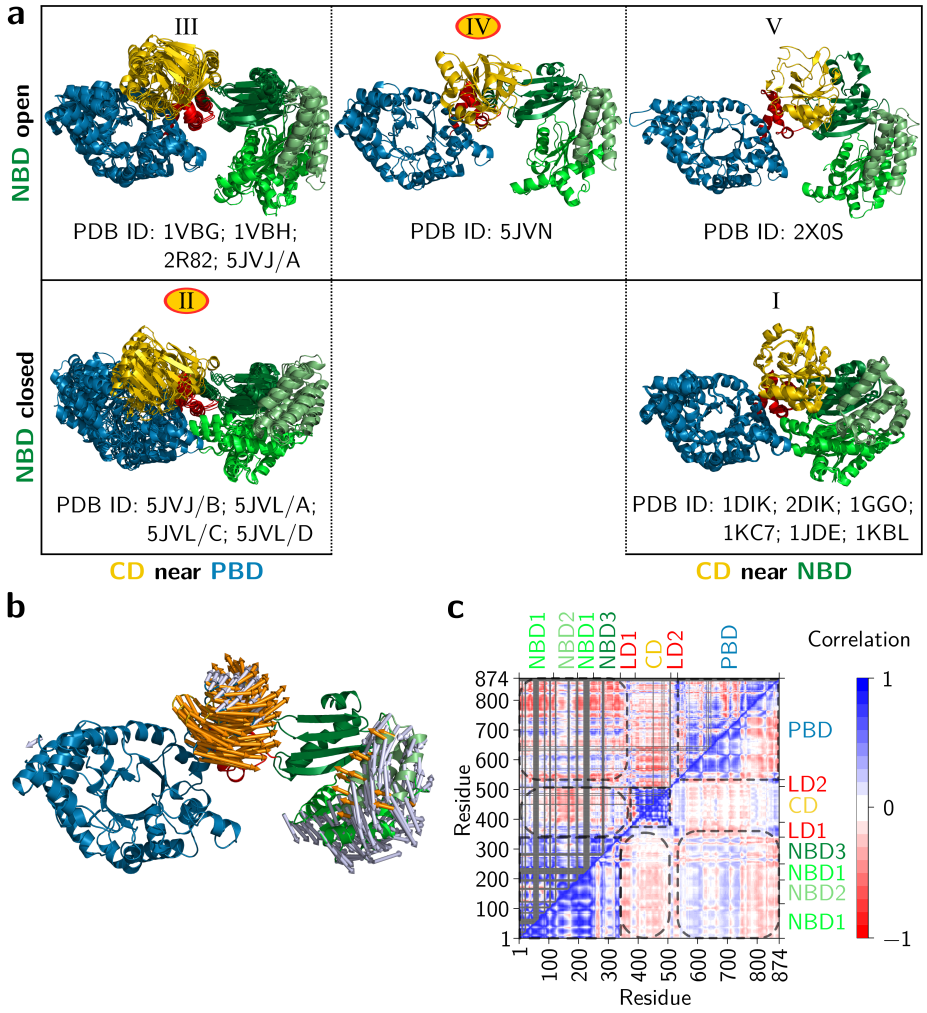


Figure 2.4.: Motions of PPDK. (a) Overview of all currently known crystal structures of the PPDK clustered according to C_α atom RMSD (Roman numerals), showing the CD near the PBD (left), between PBD and NBD (middle), and near the NBD (right) as well as the NBD in an open (top) or closed (bottom) conformation. Conformational states observed for the first time in this work are marked with an orange circle. (b) Representation of atomic displacements along the directions of the first two principal components (1^{st}: gold; 2^{nd}: silver) obtained from a PCA over the representative structures of each cluster depicted in panel (a). The amplitudes of the motions were scaled, and a cutoff for small displacements was applied for best graphical representation. (c) Cross-correlation maps of C_α atom fluctuations of the representative structures of each cluster (upper triangular) and from an aggregate MD simulation time of ~10 µs (lower triangular). The two axes on the left and at the bottom refer to residue indices according to the *F. trinervia* numbering. Positive correlations are indicated in blue, negative correlations in red (see color scale). Residues not resolved in all compared crystal structures are shown in black. Substructures of PPDK are labeled on the top and right axes. Correlated movements within domains are marked with squares, correlated movements between the domains are marked with boxes with round corners.

swivels from the PBD to the NBD and vice versa.

To exclude any bias by the small number of available crystal structures, we further explored the conformational space of *Ft*PPDK by molecular dynamics (MD) simulations of in total ~10 µs length (Supplementary Tab. 2.4). Cross-correlations of atomic fluctuations computed from the MD simulations yield a qualitatively and quantitatively highly similar result compared with correlated motions computed from the cluster-representative crystal structures (Fig. 2.4c), confirming the anti-correlated motions between the CD and the NBD (correlation coefficient down to −0.15).

Directionality of the swiveling motion

The above analysis suggest the *Fp*PPDK structure (cluster IV, Fig. 2.4a) to be an intermediate of the swiveling motion of the CD and indicate coupled motions between the CD and the NBD. To corroborate these findings, we computed the configurational free energy (potential of mean force, PMF) using the distance between $H456_{C_\alpha}$ – $H565_{C_\alpha}$($distance_{CD\text{-}PBD}$, Supplementary Fig. 2.10C, numbering according to *F. trinervia* and *F. pringlei*, see also Supplementary Tab. 2.2) as a reaction coordinate. This reaction coordinate represents the swiveling motion very well (Supplementary Fig. 2.10D). PMFs were computed by umbrella sampling along $distance_{CD\text{-}PBD}$ for three plausible transition paths obtained by targeted constrained geometric simulations (Ahmed et al. 2011) between start / end states of *Ft*PPDK from cluster III / cluster V, cluster III / cluster I, and cluster II / cluster I (Fig. 2.4a and Supplementary Fig. 2.11a). These transition paths were chosen such that the swiveling motion occurs in the presence of an open NBD (Fig. 2.5a/d), a closed NBD (Fig. 2.5c/f), or where the NBD closes when the CD approaches it and vice versa (Fig. 2.5b/e). While the opening-closing motion of the NBD was not restrained during the umbrella sampling, the observed sampling very well represents these paths (Fig. 2.5). $Distance_{CD\text{-}PBD}$ was sampled in intervals of 1 Å, leading to a sufficient overlap of the sampling windows (Fig. 2.5).

The obtained PMFs (Fig. 2.5a/b/d/e) show several remarkable characteristics. First, the overall precision is high, with standard deviations for all points < 0.15 kcal mol^{-1}. Second, the free energy difference between conformational states III and I, or III and V (Fig. 2.4) is < 2 kcal mol^{-1} (Fig. 2.5a/b/d/e), showing that the respective higher-energy conformational state is populated to ~2% at room temperature. Third, we identify a stable conformational intermediate of the CD swivelling motion, revealed by pronounced minima in the PMFs at

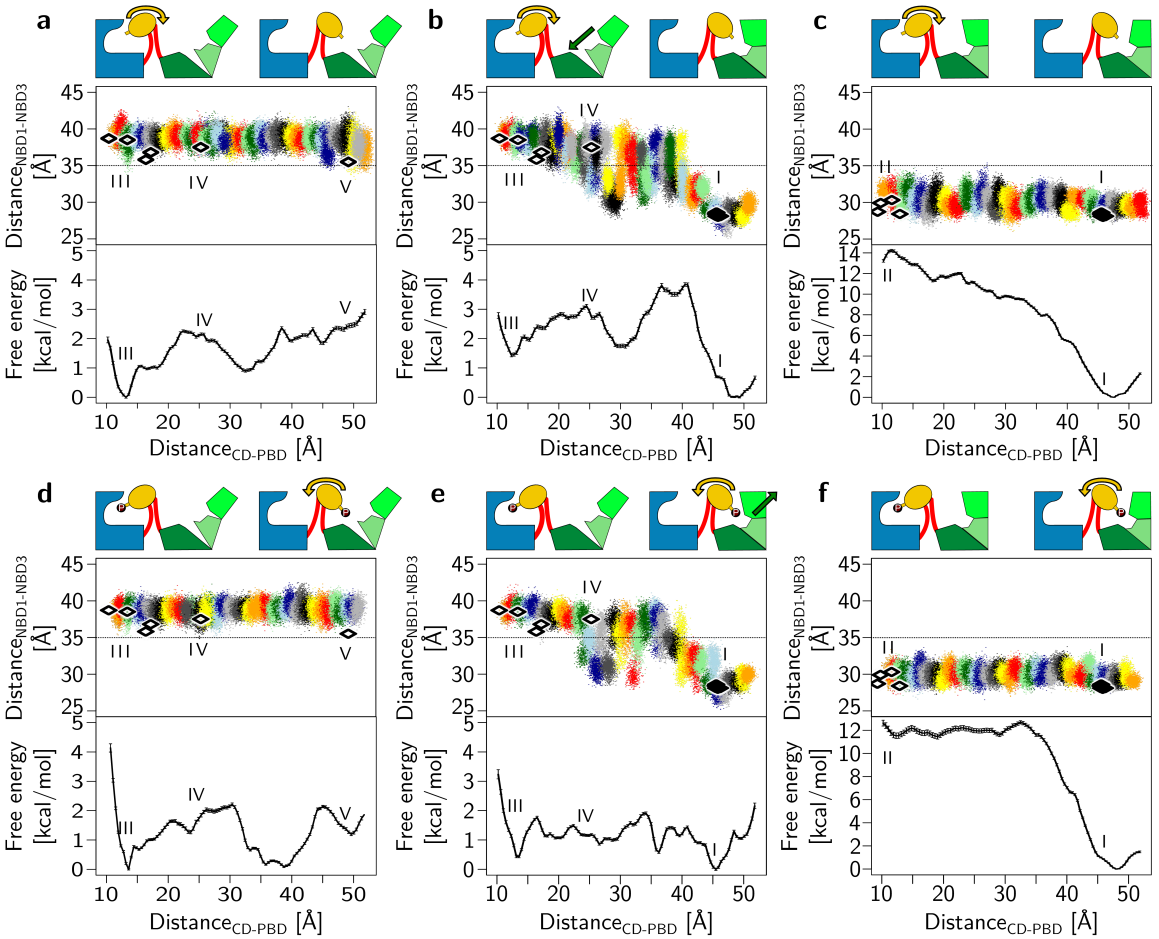


Figure 2.5.: 1D Potential of mean force of the swiveling motion of the CD with the distance H456$_{C_\alpha}$ – H565$_{C_\alpha}$ used as a reaction coordinate. Results for the non-phosphorylated state are depicted in (a-c), those for the state with phosphorylated H456 in (d-f). (a/d) depict results obtained with open NBD, (b/e) those with a simultaneous opening-closing of the NBD, and (c/f) with closed NBD. At the top, schematic representations of each state at the respective endpoints of a PMF are shown. In the middle row, sampled conformations are projected onto distance$_{CD-PBD}$ and distance$_{NBD1-NBD3}$ (Supplementary Fig. 2.10c), with each color representing one MD simulation with an umbrella potential applied at a given value of distance$_{CD-PBD}$. The PMFs are depicted in the bottom row. The diamonds show projections of PPDK crystal structures in conformational states marked by Roman numbers (Fig. 2.4a) onto the plane spanned by the two reaction coordinates (using for each organism the corresponding residues to evaluate the reaction coordinates (Supplementary Tab. 2.2))

a distance$_{\text{CD-PBD}}$ ~30 Å to 35 Å (Fig. 2.5a/b/d/e), which is structurally highly similar to the intermediate state IV found in the *Fp*PPDK crystal structure (located at a distance$_{\text{CD-PBD}}$ ~25 Å) as shown by a C_α atom RMSD of 2.7 Å. Note that the *Fp*PPDK crystal structure was not used for generating the transition path, hence, no information about conformational state IV entered the PMF calculations. The presence of the intermediate state leads to a sawtooth-like PMF. Fourth, the PMFs reveal for PPDK with non-phosphorylated H456 (Fig. 2.5a/b) that the correlated movement of the CD and the NBD results in state I being favored over III by 1.4 kcal mol^{-1} (Fig. 2.5b); in contrast, if the CD moves with the NBD remaining open, state V is disfavored over III by 2.1 kcal mol^{-1} (Fig. 2.5a). Therefore, movement of the non-phosphorylated CD from the PBD towards the NBD is exergonic only if it is coupled to a closing motion of the NBD, which is in line with the swiveling domain model (Herzberg et al. 1996). This finding corroborates cross-correlations between these motions observed from crystal structures (Fig. 2.4c, upper triangle) and from structures obtained by MD simulations (Fig. 2.4c, lower triangle). Fifth, the PMFs suggest that the phosphorylation state of the CD influences the preferred direction of motion of this domain: When H456 is phosphorylated, state III becomes favorable over V by 1.5 kcal mol^{-1} (Fig. 2.5d) or is only slightly disfavored over I by 0.5 kcal mol^{-1} (Fig. 2.5e). Compared to the non-phosphorylated state, the sawtooth-like PMF is thus tilted towards III. Therefore, with phosphorylated H456, the movement of the CD from the NBD towards the PBD is exergonic or approximately isoenergetic. This result is also in line with the swiveling domain model (Herzberg et al. 1996). In the phosphorylated state, coupled motions between the CD and the NBD have a smaller influence on the energetics of the conformational states. We speculate that the electrostatic repulsion between the phosphate group at H456 and reaction products, including adenosine monophosphate, still bound to or being in the vicinity of the NBD fosters the CD movement towards the PBD instead.

Complex, stepped swiveling motion

PMFs calculated for the transition between conformational states I and II unexpectedly do not reveal a structural intermediate along the transition path and show a marked prevalence of state I (free energy difference > 12 kcal mol^{-1}), irrespective of the phosphorylation state of H456 (Fig. 2.5c/f). To provide an explanation for this observation and further details on the coupling between motions of the CD and the NBD, we computed a 2D

PMF, using as reaction coordinates $\text{distance}_{\text{CD-PBD}}$ and the distance between $\text{S215}_{\text{C}_\alpha}$ – $\text{E272}_{\text{C}_\alpha}$($\text{distance}_{\text{NBD1-NBD3}}$, Supplementary Fig. 2.10c, numbering according to *F. trinervia* and *F. pringlei*, see also Supplementary Tab. 2.2) for the non-phosphorylated PPDK. The reaction coordinate $\text{distance}_{\text{NBD1-NBD3}}$ represents the opening-closing motion of the NBD very well (Supplementary Fig. 2.10e). Reference points for umbrella sampling were generated using targeted constrained geometric simulations (Ahmed et al. 2011) between start/end states of *Ft*PPDK from cluster III / cluster I (Supplementary Fig. 2.11a), with further reference points added using the conformation after 6 ns of umbrella sampling as a starting point for the next interval. The sampling windows overlap well along the two reaction coordinates (Supplementary Fig. 2.11b-d), and the 2D PMFs are qualitatively indistinguishable irrespective whether only the first half, the second half, or the complete sampling time is used for their calculation (Supplementary Fig. 2.11e-g), strongly indicating converged results. The most prominent feature of the PMF is that conformational states III and I reside in or close to minima of the free energy landscape (Fig. 2.6). Furthermore, a shallow free energy minimum is identified at $\text{distance}_{\text{CD-PBD}}$ ~28 Å and $\text{distance}_{\text{NBD1-NBD3}}$ ~38 Å (marked by a star in Fig. 2.6), lying close to the structural intermediate from the *Fp*PPDK crystal structure (conformational state IV, Fig. 2.4a). The transition path between conformational state III and IV runs such that $\text{distance}_{\text{NBD1-NBD3}}$ remains almost constant while $\text{distance}_{\text{CD-PBD}}$ changes by ~15 Å. In contrast, between conformational state IV and I, the transition paths continues in a diagonal manner, revealing a correlation between the swiveling motion of the CD (change of $\text{distance}_{\text{CD-PBD}}$ by ~25 Å) and the opening-closing motion of the NBD (change of $\text{distance}_{\text{NBD1-NBD3}}$ by ~10 Å). These characteristics agree very well with those found by the 1D PMFs, where $\text{distance}_{\text{NBD1-NBD3}}$ only starts to decrease once $\text{distance}_{\text{CD-PBD}}$ > 25 Å (Fig. 2.5b/e). Overall, both PMF calculations thus reveal a complex, stepped swiveling motion of the CD with varying degrees of coupling to the NBD motions and proceeding via conformational state IV. Moreover, the 2D PMF reveals that conformational state II is located in a region of elevated free energy (Fig. 2.6), providing an explanation why a transition path obtained by targeted simulations between conformational states II and I results in a downhill motion towards state I (Fig. 2.5c/f). Unrestrained MD simulations confirm this finding (see section Supporting Results in the SI, Supplementary Fig. 2.12). A plausible explanation for why this state is observed in PDB 5JVL may be that protein-protein interactions between the PBD of chain B and the CD of chain A occur as crystal contacts, which can stabilize the CD near the PBD despite a closed NBD.

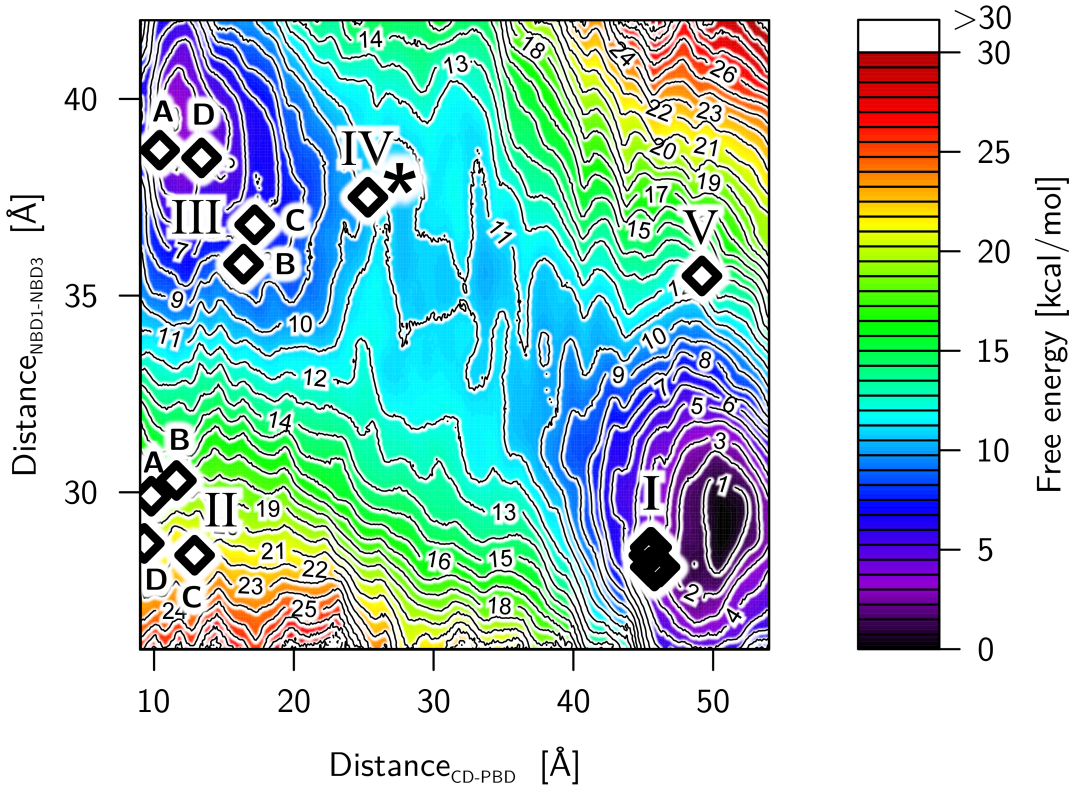


Figure 2.6.: 2D Potential of mean force, with the distance$_{CD-PBD}$ between H456$_{C_\alpha}$ – H565$_{C_\alpha}$ and the distance$_{NBD1-NBD3}$ between S215$_{C_\alpha}$ – E272$_{C_\alpha}$ used as reaction coordinate of the swiveling motion of the CD and the opening-closing motion of the NBD, respectively, (Supplementary Fig. 2.10c) computed for H456 in the non-phosphorylated state. The diamonds show projections of PPDK crystal structures in conformational states marked by Roman numbers (Fig. 2.4a) onto the plane spanned by the two reaction coordinates (using for each organism the corresponding residues to evaluate the reaction coordinates (Supplementary Tab. 2.2)) (I: PDB 1DIK, 2DIK, 1GGO, 1JDE, 1KBL, 1KC7; II$_A$: 5JVJ/B, II$_B$: 5JVL/A, II$_C$: 5JVL/C, II$_D$: 5JVL/D; III$_A$: 2R82, III$_B$: 1VBG, III$_C$: 1VBH, III$_D$: 5JVJ/A; IV: 5JVN; V 2X0S). The star marks a shallow energy minimum close to conformation IV.

Effective driving force of the swiveling motion

The analysis of crystal structures, unrestrained MD simulations, and configurational free energy calculations consistently and independently revealed the existence of structural intermediates of the swiveling motions and coupled motions of the CD and the NBD for non-phosphorylated PPDK. The respective 1D PMF of PPDK with non-phosphorylated H456 is sawtooth-like (Fig. 2.5b), with barrier heights for the transition from state III to I between 1.5-2.5 kcal mol^{-1}(2.5-4.1 kT at T = 300 K). For the reverse transition with phosphorylated H456, the 1D PMF also displays a sawtooth-like character (Fig. 2.5e), with barrier heights of 1.8 kcal mol^{-1} (3 kT at T = 300 K) and the free energy profile being tilted in favor of state III compared to the non-phosphorylated PPDK. The sawtooth-like free energy profiles suggest that PPDK can exploit random thermal fluctuations for directional motion of its CD. Typically, this type of profile is indicative of a Brownian ratchet mechanism (Howard 2010), pioneered by Feynman (Feynman et al. 1965) and Huxley (Huxley 1957). Barrier heights on the order of kT, as associated with the CD motion in the PPDK catalytic cycle, suggest that a Brownian ratchet biases fluctuations rather than rectifying them (Wang and Oster 2002). To drive the respective directional motions, a non-equilibrium situation needs to be created that relaxes towards equilibrium. For the non-phosphorylated PPDK, this situation is suggested to be created by binding of ATP to the NBD, as such binding leads to a closing of the NBD due to the progressive formation of ATP/NBD interactions. Transmitted via coupled motions, the NBD closing then leads to a preference for the CD to be close to the NBD, at least in the second half of the transition pathway between PBD and NBD. However, we are aware that biased Brownian ratchets and power stroke motors have the same phenomenological behavior and are difficult to distinguish experimentally (Wang and Oster 2002). Hence, we cannot exclude that the conformational changes observed in the NBD of our structural intermediates induce a strain in the enzyme that would directly drive the CD motion upon ATP binding, thus resulting in a power stroke mechanism (Eisenberg and Hill 1979). Overall, this situation is similar to ATP synthase and ATP-dependent molecular machines such as myosin, kinesin, or chaperonin parts, where the stepped motions in the catalytic cycle are triggered by binding of the high energy substrates PEP or ATP, respectively (Yasuda et al. 2001). For the phosphorylated PPDK, at least part of the non-equilibrium situation is suggested to arise from electrostatic repulsion between the phosphorylated H456 and the NBD. A similar situation was created by introducing appropriately charged residues

into a mutant of non-phosphorylated *Cs*PPDK, resulting in the CD being adjacent near the PBD (PDB ID 2R82) (Lim et al. 2007). In all, our analyses suggest that both changes of the binding state of PPDK and of its molecular identity ((non-)phosphorylation) contribute to the enzyme acting as a molecular switch with respect to the swiveling motion.

Moreover, our crystallographic and molecular simulation data are indicative that PPDK might employ a Brownian ratchet mechanism biasing thermal fluctuations in order to generate a net directional CD motion. The coupling of this motion to the open-close state of the NBD revealed by the distinct conformational states (Fig. 2.1a-c and Supplementary Fig. 2.11a) and substrate binding states resolved in our dimeric structural intermediate of the PPDK catalytic cycle further suggests that the enzyme might employ an alternate binding change mechanism similar to ATP synthase or bacterial ATP-dependent DNA helicases.

Methods

Expression and purification of recombinant *Ft*PPDK/*Fp*PPDK

Codon-optimized coding regions of PPDK from *Flaveria trinervia* (EMBL-ENA: X57141) (Rosche and Westhoff 1990) or *Flaveria pringlei* (EMBL-ENA: X75516) (Rosche et al. 1994), stripped of the chloroplast transport sequence, were cloned into the multiple cloning site of the pET-16b vector (Novagen) including a histidine$_{10}$ tag and a Tobacco Etch Virus (TEV) protease cleavage site. The plasmid was used to transform *E. coli* BL21 (DE3) cells (Agilent Technologies). Previously described expression and purification protocols (Nakanishi et al. 2005) were adapted for *Ft*PPDK/*Fp*PPDK. Transformed *E. coli* BL21 (DE3) cells (Agilent Technologies) were grown in 2YT medium (5 g L^{-1} NaCl, 10 g L^{-1} yeast extract, 16 g L^{-1} peptone) with ampicillin at 30 °C to OD_{600} = 0.8. Protein expression was induced by the addition of 0.1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG). Cells were harvested 18 h after induction by centrifugation. After harvesting, cells were suspended in lysis buffer (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 10 mM $MgSO_4$, 10% (w/v) glycerol, 5 mM DTT, 0.002% (w/v) phenylmethanesulfonylfluoride) and disrupted using a cell disruptor (Constant Systems). PPDK was purified using a nickel affinity chromatography column (GE Healthcare) using purification (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 mM $MgSO_4$, 10% (w/v) glycerol, 5 mM DTT) and elution buffer (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 500 mM imidazole, 10 mM $MgSO_4$, 10% (w/v) glycerol, 5 mM DTT). The loaded column was

washed with 50 mM and 150 mM imidazole, 500 mM imidazole were used for the elution of PPDK. A PD-10 desalting column (GE Healthcare) was used to exchange the elution buffer against purification buffer before enzymatic cleavage of the affinity tag via Tobacco Etch Virus Protease (TEV) over-night at room temperature. Cleaved PPDK was concentrated by ultrafiltration (30 kDa cutoff, Millipore) and the buffer was exchanged using a PD-10 column. For crystallization trials, crystallization buffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 5 mM $MgSO_4$) was used for the buffer exchange step, otherwise PPDK storage buffer (50 mM Tris/HCl pH 8, 10 mM $MgCl_2$, 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT). Monodispersity of the sample was verified via size exclusion chromatography (SEC) and dynamic light scattering (DLS) (Supplementary Fig. 2.8a). Activity of purified PPDKs was confirmed by a coupled-enzyme assay in the PEP-forming direction (Salahas et al. 1990).

Crystallization

Initial crystallization trials were performed in microbatch technique. *Ft*PPDK in crystallization buffer at a concentration of 10 mg mL^{-1} was incubated at room temperature for 10 min with 20 mM phosphoenolpyruvate (PEP) and either 10 mM nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) or 1.5 mM 2'-Br-dAppNHp. The protein solution was mixed with precipitant at a 1:1 ratio resulting in a final volume of 2 µL. The drop was sealed using mineral oil (Sigma Aldrich). The optimized composition of the precipitant solution included 17% (w/v) PEG 3350, 100 mM MOPS (pH 7) and 100 mM magnesium formate with either 10 mM nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) or 1.5 mM 2'-Br-dAppNHp added to the protein solution 10 min prior of mixing with the precipitant. Crystals sized approx. 500 × 40 × 10 µm^3 appeared within 24 h after incubation at 21 °C, were transferred into a cryoprotection buffer comprised of the precipitant solution supplemented with 20% ethylene glycol and cryo-cooled in liquid nitrogen.

*Fp*PPDK was crystallized in sitting drop technique. *Fp*PPDK in crystallization buffer at a concentration of 10 mg mL^{-1} was incubated for 10 min with 20 mM PEP and 2 mM 2'-Br-dAppNHp at room temperature. The optimized reservoir solution was composed of 85 mM HEPES pH 7.5, 17% (w/v) PEG 4000, 15% (w/v) glycerol and 5% (v/v) isopropanol and mixed at a 1:1 ratio with the protein solution in a final drop volume of 2 µL. Crystals sized approx. 200 × 50 × 50 µm^3 appeared within 48 h after incubation at 12 °C. The crystals were flash-frozen in liquid nitrogen without adding any additional cryoprotectant.

Structure determination

X-ray diffraction data for *Ft*PPDK were collected at the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF), Grenoble at beamline BM30A at 0.9799 Å wavelength for 5JVJ with an oscillation range of 1° per image spanning a total range of 151° at 100 K. Data for the 2'-Br-dAppNHp-bound form was collected at 0.9123 Å with an oscillation range of 0.5° per image and 360° of total range. The data were integrated and scaled with XDS (Kabsch 2010) and data reduction was performed with Aimless (Evans and Murshudov 2013) from the CCP4 suite (Collaborative, Computational Project and others 1994). Initial phases for 5JVJ were obtained by molecular replacement (MR) with *Z. mays* PPDK (Nakanishi et al. 2005) as a template (PDB 1VBH, 79% sequence identity) using Phaser (McCoy et al. 2007). The initial model included two monomers in the asymmetric unit (ASU). For one monomer (chain B) only the PBD was correctly placed in the electron density, hence the misplaced CD and NBD were removed manually. This model was subjected to multiple rounds of manual model rebuilding and extension using Coot (Emsley et al. 2010) and refinement by phenix.refine (Adams et al. 2010) using local non-crystallographic symmetry restraints to account for the obvious conformational differences between both monomers. Parts of chain B were gradually retrieved in this process. The structure of the 2'-Br-dAppNHp-bound *Ft*PPDK (5JVL) was determined by MR using the coordinates of the previously determined 5JVJ/A structure. The resulting model contained four monomers in the ASU. Three monomers were extended to completeness, the fourth monomer (chain B) exhibited inconclusive density for the NBD. The atomic displacement parameters (ADPs) for both crystal forms were refined individually and were partly described as groups of translation, libration and screw-motion (TLS) (Howlin et al. 1993).

Data of the *Fp*PPDK were collected at the ESRF beamline ID29 at a wavelength of 0.9762 Å with an oscillation range of 0.1° per image and 360° of total range. The reflection data were processed with XDS. Initial phases were obtained by MR with Phaser using the PBD and NBD of 5JVL/D as starting model. The resulting structure was subject to automated model-rebuilding using Bucaneer (Cowtan 2006) which recovered the CD followed by iterative rounds of manual model rebuilding using Coot and refinement with phenix.refine and REFMAC5 (Murshudov et al. 2011). In all cases, ligands were not modeled into excess density indicated by the $mF_o - DF_c$ map (where m represents the figure of merit, D the σ-A weighting factor and F_o and F_c the observed (experimental) and calculated (model)

amplitudes respectively) until near-final refinement rounds to reduce model bias. To enhance sensitivity for weak sidechain features, Feature Enhanced Maps (FEM) were used in the model building process. For FEM, a $2mF_o - DF_c$ σ-A-weighted map is modified to strengthen weak signals if present. This includes calculation of omit maps, map randomization and map sharpening. The resulting map shows enhanced sensitivity for weak features and reduced model bias compared to $2mF_o - DF_c$ maps (Afonine 2015). The structure was validated using tools provided by Coot and PHENIX, in particular MolProbity (Chen et al. 2010). Figures were generated using PyMOL (Schrödinger, LLC 2015).

Comparison of PPDK crystal structures

All currently available crystal structures of PPDK were obtained from the Protein Data Bank (Bernstein et al. 1977) (PDB) (Supplementary Tab. 2.2). The structure of PDB 5JVL, chain B and NMR derived structure of the CD only (PDB 2FM4) was excluded from further analysis as the NBD has not been resolved there. A multiple sequence and structural alignment of the PPDK structures was generated with PROMALS3D (Pei et al. 2008). Residues resolved and common to all structures were identified from the alignment and used for further analysis.

Cluster analysis of PPDK conformations

Cluster analysis on all PPDK crystal structures listed in Supplementary Tab. 2.2 was performed with the CPPTRAJ (Roe and Cheatham 2013) module of the AMBER suite of programs (Case et al. 2005) using the hierarchical agglomerative (bottom-up) algorithm. As a distance measure, the best-fit C_α atom root mean square deviation (RMSD) of all residues common in the PPDK structures with all domains resolved (Supplementary Tab. 2.2) was used. A maximal distance between all members of two clusters (complete linkage) of < 4 Å was used as terminating criterion for the clustering. For subsequent analysis, only those crystal structures were used that are cluster representatives in order to avoid a bias towards the number of crystal structures in the same conformational state.

Principle component analysis

To describe the essential dynamics of PPDK, a principle component analysis (PCA) in Cartesian space was performed on a set of experimental structures (Supplementary Tab. 2.2) and snapshots of MD simulations (Supplementary Tab. 2.4) using CPPTRAJ (Roe and

Cheatham 2013) in a similar manner as described in refs. (Roe et al. 2014; Galindo-Murillo et al. 2015). In detail, the coordinate covariance matrix was calculated for all C_α atoms present in all crystal structures without missing domains. The structures were RMS-fit to the average structure of all cluster representative crystal structures using the 15% least fluctuating residues to remove global transitional and rotational motion prior to calculating the coordinate covariance matrix. The symmetric matrix is diagonalized by an orthogonal coordinate transformation, yielding the eigenvalues and eigenvectors (principle components). An eigenvalue corresponds to the mean square eigenvector coordinate fluctuation (the variance) and, hence, describes how much a principal component contributes to the total coordinate fluctuations (Hayward and Groot 2008).

To analyze the locality or collectivity of motions for the domains of PPDK, the collectivity index κ described in refs. (Ahmed et al. 2010) was calculated (eq. 2.1)

$$\kappa = \frac{1}{N} \exp\left\{ -\sum_{i=1}^{N} \Delta\vec{r}_i^{\,2} \log \Delta\vec{r}_i^{\,2} \right\} \tag{2.1}$$

with N being the number of atoms in the domain, and $\Delta\vec{r}_i$ being the relative displacement of the principal component. All values of $\Delta\vec{r}_i$ were scaled consistently such that $\sum_{i=1}^{N} \Delta\vec{r}_i^{\,2} = 1$. A value of $\kappa = 1$ indicates a mode of maximal collectivity, that is, all $\Delta\vec{r}_i$ are identical. Conversely, if only one atom is affected by the mode, κ reaches the minimal value of $\frac{1}{N}$.

Homology modeling of *Ft*PPDK conformational states

As there was no crystal structure of *Ft*PPDK available at the beginning of this project, homology models of conformational states I, III, IV, and V were generated. From each cluster (Fig. 4a), the crystal structures with the highest resolution and without mutations that interfere with the enzymatic activity were used as templates (*C. symbiosum* structure 1KBL and 1KC7 for state I; *Z. mays* structure 1VBH and 1VBG for state II; *F. pringlei* structure 5JVN for state IV; and *T. brucei* structure 2X0S for state V). The sequence alignment of the *Ft*PPDK sequence and the respective template sequence(s) was generated by MAFFT (Katoh 2002). The sequence identities are for conformational state I: 55%; conformational state III: 79%; conformational state IV: 96%; conformational state V: 54%. The homology models were generated using the program MODELLER (Webb and Sali 2014) in a multi-template approach, applying the dope loop model algorithm, and including ligands (if present in the

crystal structure). The quality of our models was assessed for conformational state III, for which now PDB ID 5JVJ, chain A is available: $RMSD_{C_\alpha}$ for NBD: 1.16 Å, for CD including the linker domain: 1.13 Å, and for the PBD: 0.93 Å. Such structural deviations are close to the experimental uncertainty of the crystal structure.

Molecular dynamics simulations of *Ft*PPDK

The crystal structure of *Ft*PPDK (5JVL/C; conformational state II) and homology models of *Ft*PPDK for conformational states I, III, IV and V served as input structures for MD simulations. Three independent replicates of MD simulations were performed for each system which are summarized in Supplementary Tab. 2.4. Co-crystallized water and ligands were removed. Hydrogen atoms were added using REDUCE (Word et al. 1999), flipping side chains of Asn, Gln, and His when appropriate. These model systems were placed in a truncated octahedral box of TIP3P water (Jorgensen et al. 1983) leaving a distance of at least 11 Å between the solute and the border of the box. Counter ions were added to neutralize the systems. All MD simulations were performed with the ff99SB force field (Hornak et al. 2006) using the Amber suite of programs (Case et al. 2005). Parameters for the phosphorylated histidine were obtained from ref. (Homeyer et al. 2005). Bonds containing hydrogen atoms were constrained using the SHAKE algorithm (Ryckaert et al. 1977), and long range interactions were treated by the particle mesh Ewald (PME) method (Cheatham et al. 1995). A time step of 2 fs was used. The system was equilibrated by, first, applying harmonic restraints to solute atom positions with force constants of at least 5 kcal mol^{-1} $Å^{-2}$ for 100 steps of steepest descent and 400 steps of conjugate gradient minimization. Second, the temperature of the system was raised from 100 K to 300 K in 50 ps of NVT-MD simulations. Third, 150 ps of NPT-MD simulations were performed to adjust the system density. Finally, the force constants of harmonic restraints were gradually reduced to zero during 250 ps of NVT-MD simulations. Production NVT-MD simulations were carried out at 300 K, using the Berendsen thermostat (Berendsen et al. 1984) and a coupling constant of 0.5 ps. Three independent replicates of MD simulations were performed for each system by spawning production runs after the thermalization at temperatures of 299.9 K, 300.0 K, and 300.1 K respectively. The first 2 ns of each trajectory were omitted from subsequent analyses. All unrestrained MD simulations are listed in Supplementary Tab. 2.4.

Generation of transition paths

For the potential of mean force calculations, plausible pathways of the swiveling motion and opening-closing motion have been generated using targeted normal mode-based geometric simulations by the NMSim approach (Ahmed et al. 2011). NMSim is a three-step protocol for multiscale modeling of protein conformational changes that incorporates information about preferred directions of protein motions into a geometric simulation algorithm. In the first step, the protein structure is coarse-grained by the software FIRST (Jacobs et al. 2001) into rigid parts connected by flexible links. For this, an energy cut-off for including hydrogen bonds (and salt bridges) of $-1\,\mathrm{kcal\,mol^{-1}}$ and a distance cutoff for including hydrophobic constraints of 0.35 Å were used. In the second step, low-frequency normal modes are computed by rigid cluster normal mode analysis (RCNMA) with a 10 Å distance cutoff for considering interactions between C_α-atoms. In the third step, a linear combination of the first 50 normal modes was used to bias backbone motions along the low-frequency normal modes, while the side chain motions were biased towards favored rotamer states, generating 500 conformations in 500 simulation cycles with a step size of 0.5 Å and side chain distortion of 0.3. Targeted NMSim calculations (Ahmed et al. 2011) were performed between start / end states of cluster III / cluster V, cluster III / cluster I, and cluster II / cluster I, using homology models for cluster III, V, and I, and the cluster-representative crystal structure for cluster II.

Potential of mean force calculations

Free energy profiles of the swiveling motion of the CD (and the opening-closing motion of the NBD) were computed along the NMSim-generated transition paths by umbrella sampling (Torrie and Valleau 1977) followed by the Weighted Histogram Analysis Method (WHAM) (Kumar et al. 1992). As a reaction coordinate for analyzing *Ft*PPDK's swiveling motion, the $\mathrm{distance}_{\mathrm{CD\text{-}PBD}}$ between $\mathrm{H456}_{C_\alpha}$ – $\mathrm{H565}_{C_\alpha}$ was used (Supplementary Fig. 2.10c), as it changes monotonously between the two endpoints and provides an intuitive measure for the progress of the swiveling movement of the CD. The opening-closing motion of the NBD of *Ft*PPDK was analyzed along the reaction coordinate $\mathrm{distance}_{\mathrm{NBD1\text{-}NBD3}}$, measured between $\mathrm{S215}_{C_\alpha}$ – $\mathrm{E272}_{C_\alpha}$ (Supplementary Fig. 2.10c). 1D (2D) umbrella sampling MD simulations were performed along reaction coordinate(s) $\mathrm{distance}_{\mathrm{CD\text{-}PBD}}$ between 10 Å and 52 Å (9 Å and 54 Å) (and $\mathrm{distance}_{\mathrm{NBD1\text{-}NBD3}}$ between 26 Å and 42 Å) in intervals of

1 Å, applying harmonic potentials with a force constant of 1 kcal mol^{-1} $Å^{-2}$ to tether the conformations to the respective reference point. This resulted in 42 (782) umbrella sampling simulations, each 42.5 ns (9 ns) long, excluding the first 2.5 ns (1 ns) from the WHAM analysis, for the 1D (2D) PMF. Approximately Gaussian-shaped frequency distributions were obtained for each reference point along the reaction coordinate(s), with all such distributions well overlapping (Supplementary Fig. 2.11b-d). The latter is a prerequisite for the successful application of WHAM (Kumar et al. 1992) to extract a PMF from these distributions. Bootstrapping was applied to compute the standard deviations at the reference points.

Acknowledges

We are grateful for computational support and infrastructure provided by the "Zentrum für Informations- und Medientechnologie" (ZIM) at the Heinrich Heine University Düsseldorf and the computing time provided by the John von Neumann Institute for Computing (NIC) to H.G. on the supercomputer JURECA at Jülich Supercomputing Centre (JSC) (project IDs: 7036, 9080; user ID: HDD14). We acknowledge the European Synchrotron Radiation Facility for provision of synchrotron radiation facilities and we would like to thank David Flot, David Cobessi and Jean-Luc Ferrer for assistance in using beamlines ID29 and BM30A. This work has been supported by Heinrich Heine University Düsseldorf (scholarships within the $iGRASP_{seed}$-Graduate Cluster for A.M. and D.C.).

Author contributions statement

G.G and H.G designed research; A.M., C.W., A.H. and D.C. performed research; A.M., D.C., A.H., H.G. and G.G. analyzed data; A.M., D.C., A.H., H.G. and G.G. wrote the paper. A.M. and D.C. contributed equally to this work.

Additional information

Accession codes

Coordinates of dimeric and 2'-Br-dAppNHp-bound FtPPDK have been deposited in the Protein Data Bank under accession codes 5JVJ and 5JVL. Coordinates of *FpPPDK* have been

deposited under the accession code 5JVN.

Competing financial interests

The authors declare no competing financial interests.

Supporting Information

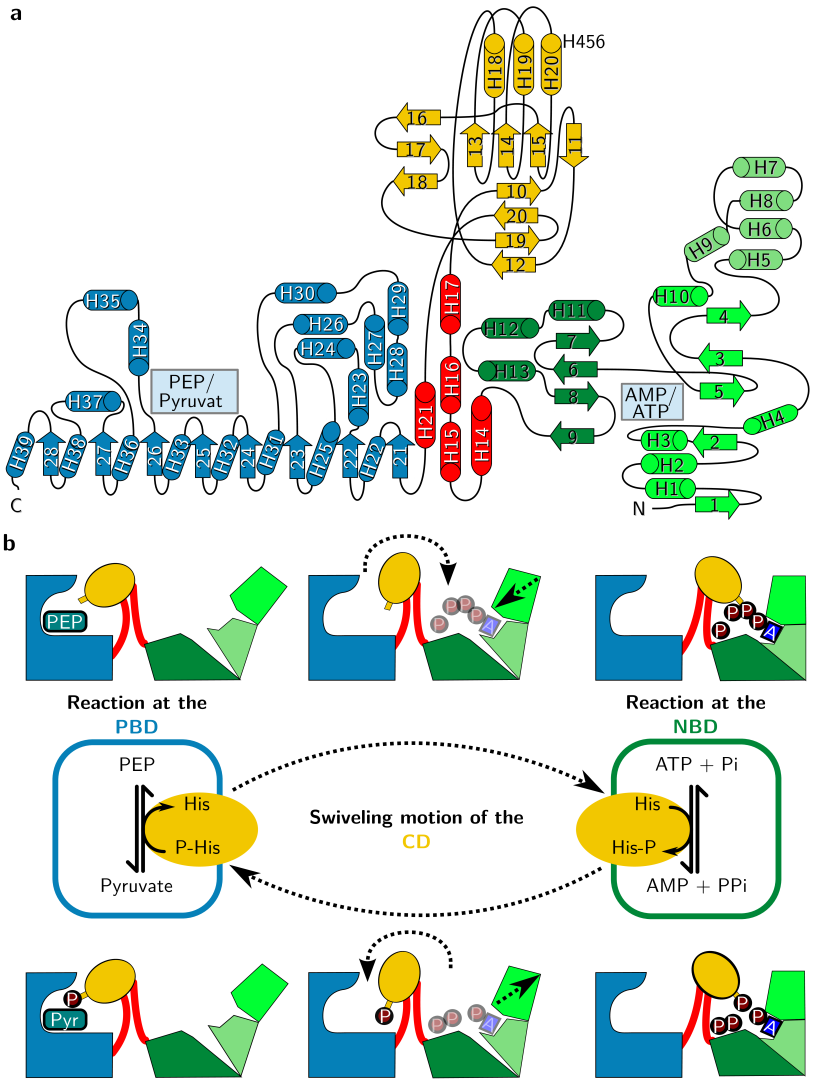


Figure 2.7.: Topology diagram of PPDK and simplified model of the PPDK mechanism. (A) The central domain (CD, yellow) contains the catalytic histidine (H456) and is connected via the linker domain (LD, red) with the PEP/pyruvate-binding domain (PBD, colored blue), and nucleotide-binding domain (NBD, colored in three different greens according to the presence of three subdomains). The locations of the PEP/pyruvate and AMP/ATP binding sites are indicated. The secondary structure was predicted using DSSP (Kabsch and Sander 1983). (B) Simplified model of the PPDK swiveling domain mechanism, adapted from refs. (Herzberg et al. 1996; McGuire et al. 1996). The PPDK-catalyzed reaction (middle row) involves a phosphoryl transfer via H456 of the CD (yellow) between the locations of the two reactions at the NBD (green, right side) and at the PBD (blue, left side). The dotted arrows in the cartoons in the top and bottom rows indicate motions of the CD and within the NBD.

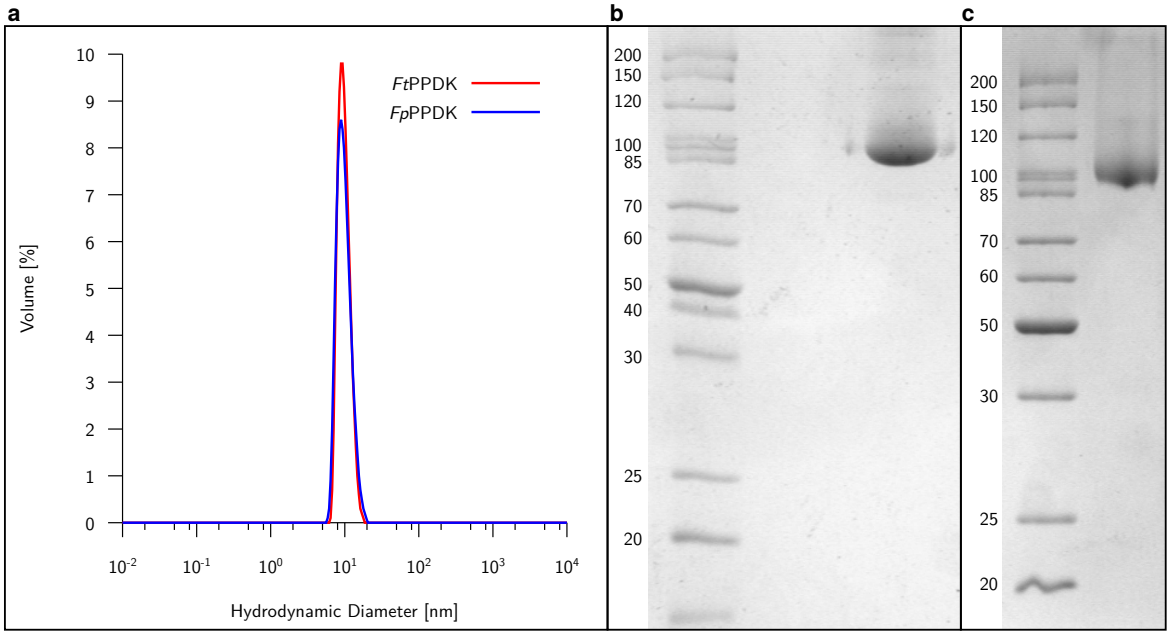


Figure 2.8.: Quality assessment of PPDK purification (A) Size distribution analysis of triplicate dynamic light scattering (DLS) measurements of *Ft*PPDK and *Fp*PPDK prior to crystallization. In both cases, DLS confirms the monodispersity of the sample. The mean hydrodynamic diameter of *Ft*PPDK (red) is 10.72±2.17 nm corresponding to an estimated molecular weight of 171.0±35.8 kDa. For *Fp*PPDK (blue), the mean hydrodynamic diameter was determined to be 10.72±2.79 nm with a corresponding molecular weight of 171.0±49.3 kDa. (B) Colloidal Coomassie-stained SDS PAGE of purified PPDK. *Fp*PPDK (B) and *Ft*PPDK (C) are visible as prominent bands at approx. 100 kDa.

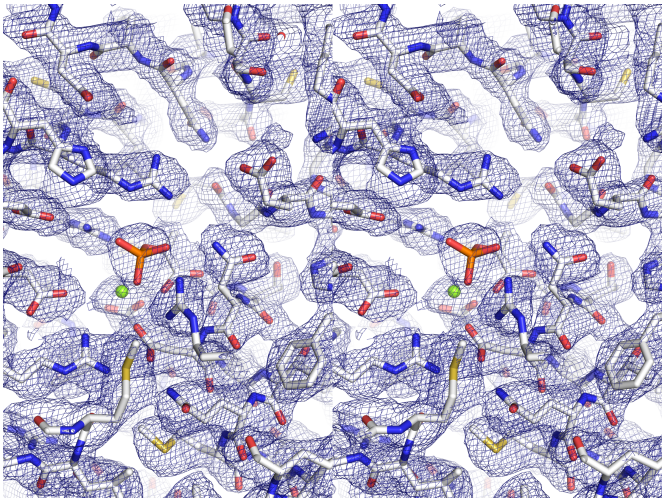


Figure 2.9.: Electron density of PEP binding site in *Ft*PPDK. Stereo image illustrating the quality of electron density around bound PEP in 5JVL/A. Maps shown are feature-enhanced maps (FEM) (Afonine 2015) contoured at the equivalent of 1.0 σ.

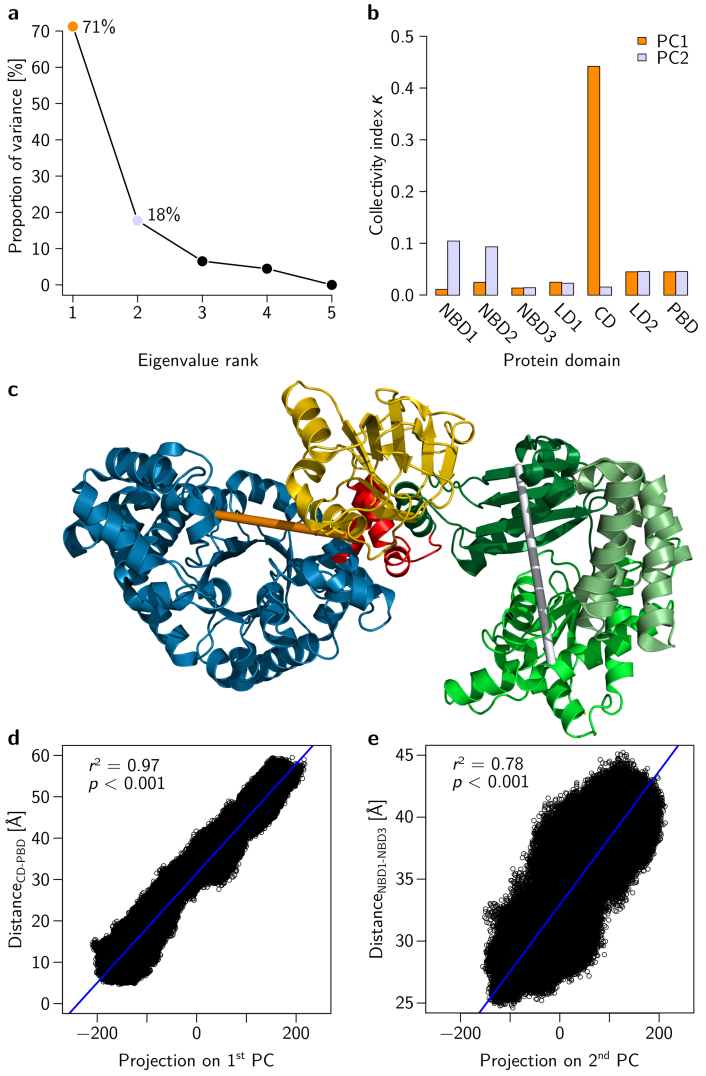


Figure 2.10.: Principal component analysis on PPDK and reaction coordinates for PMF calculation (A) The proportion of explained variance by each principal component ranked by its eigenvalue. The first (gold) and second (silver) principal component (PC) relate to Fig. 4B. 89% of the variance can be explained by the first two PCs. (B) Domain-wise collectivity index κ of the first and second PC, calculated according to (Ahmed et al. 2011). (C) The distance$_{\text{CD-PBD}}$ (depicted as gold line) and distance$_{\text{NBD1-NBD3}}$ (depicted as silver line) between H456$_{C_\alpha}$ – H565$_{C_\alpha}$ and S215$_{C_\alpha}$ – E272$_{C_\alpha}$ (numbering according to *F. trinervia / pringlei*) are used as reaction coordinates for the swiveling motion of the CD and the opening-closing motion of the NBD, respectively. The depicted structure was taken from PDB ID 5JVN. The domain coloring is according to Fig. 2.7A. (D/E) Validation of the reaction coordinates to represent the swiveling motion of the CD and the opening-closing motion of the NBD. Scatter plots of the distances H456$_{C_\alpha}$ – H565$_{C_\alpha}$ (D) and S215$_{C_\alpha}$ – E272$_{C_\alpha}$ (E) versus projections onto the first (D) and second (E) principle component obtained from the PCA over the cluster representatives (Fig. 2.4B); each dot represents one conformation generated by MD simulations of ~10 µs length. The correlation line is shown in blue.

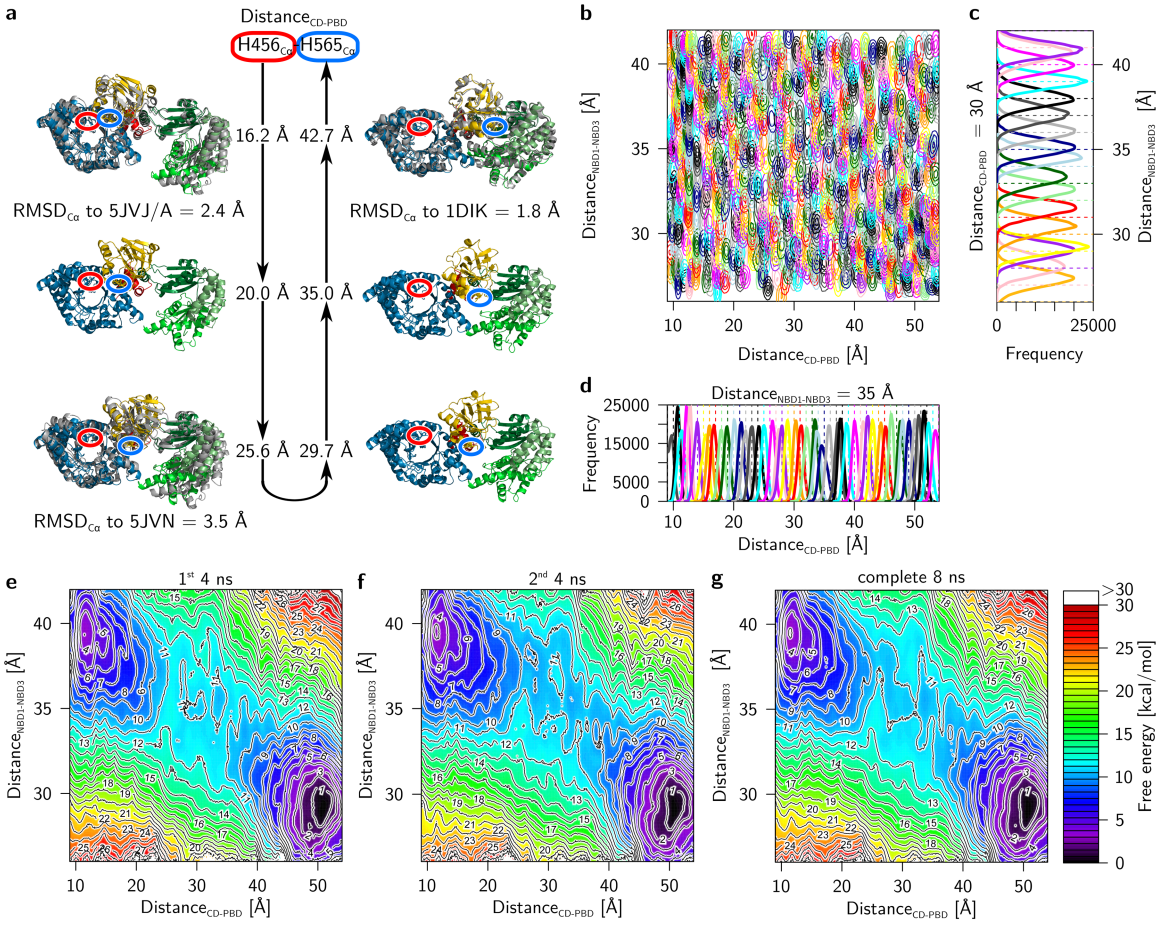


Figure 2.11.: Transition pathway for and validation of PMF calculations. Transition pathway between conformations III and I (Fig. 2.5B in the main text), created by targeted simulations with NMSim (Ahmed et al. 2011) starting from homology models with the template structure PDB ID 1KBL and 1KC7 towards homology models with the template structure PDB ID 1VBH and 1VBG. Intermediate conformations are shown at approximately 5 Å spacing along the reaction coordinate distance$_{CD-PBD}$ (Fig. 2.10C) (depicted next to the conformations). The generated conformations are overlaid with cluster representatives of PPDK crystal structures (depicted in gray), and the C_α-atom RMSD is given. (B-D) Overlap of umbrella sampling simulations of non-phosphroylated *Ft*PPDK. Frequency distributions of the sampled distances used as reaction coordinates (Fig. 2.10C) for umbrella sampling are shown (B) for the 782 MD simulations covering the 2D space spanned by both reaction coordinates (contour lines are plotted at frequencies of 5000, 10000, 15000, 20000, and 25000 conformations) and (C) for 17 MD simulations at a restrained distance$_{CD-PBD}$ = 30 Å as well as (D) for 45 MD simulations at a restrained distance$_{NBD1-NBD3}$ = 35 Å. Each color represents one MD simulation. (E-G) Convergence of the 2D PMF calculation of phosphorylated *Ft*PPDK. 2D PMFs computed using umbrella sampling along the two reaction coordinates (Fig. 2.10C) are shown for (E) only the 1st half of the sampling time, (F) the 2nd half, and (G) the complete sampling time of 8 ns per window.

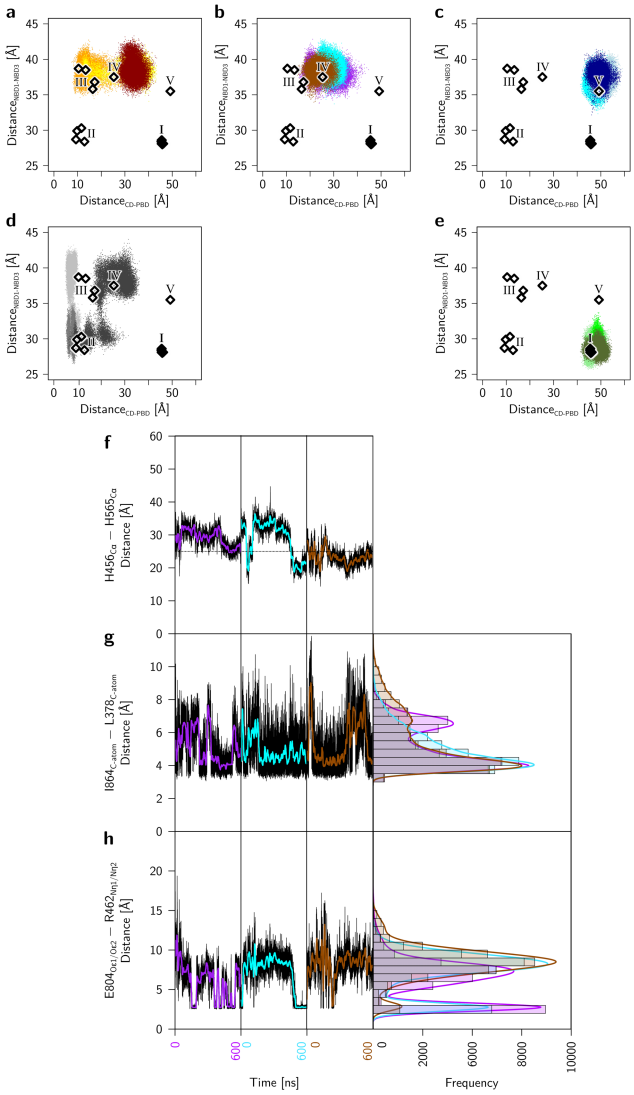


Figure 2.12.: Unrestrained MD simulations of PPDK. (A-E) Projection of conformations from MD simulations and crystal structures of PPDK (dots; each color represents one MD simulation of non-phosphorylated *Ft*PPDK, see Tab. 2.4) (using the corresponding residues for each organism (Tab. 2.2), with Roman numerals according to Fig. 2.4A) onto the reaction coordinates distance$_{CD\text{-}PBD}$ and distance$_{NBD1\text{-}NBD3}$ (Fig. 2.10C). (I: PDB ID 1DIK, 2DIK, 1GGO, 1JDE, 1KBL, 1KC7; II: 5JVJ/B, 5JVL/A, 5JVL/C, 5JVL/D; III: 2R82, 1VBG, 1VBH, 5JVJ/A; IV: 5JVN; V 2X0S). Three MD simulations of 600 ns length each were started from (A) conformation III, (B) conformation IV, (C) conformation V (D) conformation II, and (E) conformation I. (F-H) Interactions observed in three MD simulations of 600 ns length each started from conformation IV. (F) The swiveling motion of the CD is analzed by the distance$_{CD\text{-}PBD}$ between H456$_{C_\alpha}$ – H565$_{C_\alpha}$, (G) a non-polar interaction analyzed by the minimal distance between all C-atoms of I864 and L378, and (H) a salt bridge is analyzed by the minimal distance between atoms E804$_{O\varepsilon1/O\varepsilon2}$ and R462$_{N\eta1/N\eta2}$.

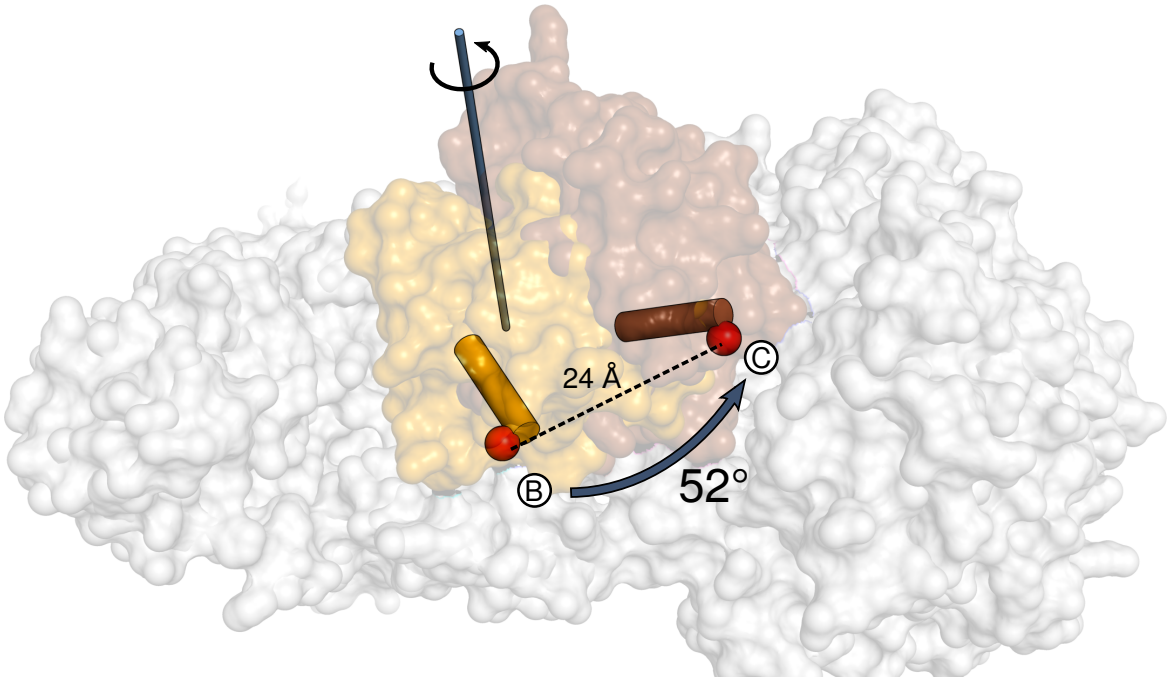


Figure 2.13.: Stepped movement of the CD. CDs of 5JVN (B, yellow) and 1KBL (C, brown). Helix 20 containing the catalytic H456 (H455 in 1KBL) is depicted as cylinder with the C_α atom of H456 shown as red sphere. The rotational axis for the transitions between states B and C is depicted as a blue arrow. The distance between the C_α atoms of the catalytic histidine is shown as a dashed line.

Table 2.2.: Overview of all currently known PPDK structures*

Cluster†	Organism	PDB ID	Comment	$Distance_{CD\text{-}PBD}$§ (Å)	$Distance_{NBD1\text{-}NBD3}$¶ (Å)	Reference
I	*C. symbiosum*	1DIK		45.5	28.1	(Herzberg et al. 1996)
I	*C. symbiosum*	2DIK	R337A	45.8	28.0	(McGuire et al. 1996)
I	*C. symbiosum*	1GGO	T453A	45.5	28.6	(Wei et al. 2000)
I	*C. symbiosum*	1JDE	K22A	46.2	28.1	(Ye et al. 2001)
I	*C. symbiosum*	1KBL		45.6	28.6	(Herzberg et al. 2002)
I	*C. symbiosum*	1KC7	PEP analogue bound	45.4	28.4	(Herzberg et al. 2002)
II	***F. trinervia***	**5JVJ**	**Chain B; PEP bound; CD and NBD incomplete**	**11.6**	**30.3**	**This paper**
II	***F. trinervia***	**5JVL**	**Chain A; PEP and ATP analogue bound**	**12.9**	**28.4**	**This paper**
II	***F. trinervia***	**5JVL**	**Chain C; PEP and ATP analogue bound**	**9.8**	**29.9**	**This paper**
II	***F. trinervia***	**5JVL**	**Chain D; PEP and ATP analogue bound**	**9.3**	**28.7**	**This paper**
III	*C. symbiosum*	2R82	R219E/E271R/S262D	10.4	38.7	(Herzberg et al. 2002)
III	*Z. mays*	1VBG		16.4	35.8	(Nakanishi et al. 2005)
III	*Z. mays*	1VBH	PEP bound	17.2	36.8	(Nakanishi et al. 2005)
III	***F. trinervia***	**5JVJ**	**Chain A; PEP bound**	**13.4**	**38.5**	**This paper**
IV	***F. pringlei***	**5JVN**	**PEP and ATP analogue bound**	**25.3**	**37.5**	**This paper**
V	*T. brucei*	2X0S		49.2	35.5	(Cosenza et al. 2002)
‡	***F. trinervia***	**5JVL**	**Chain B; PEP bound; NBD not resolved**	**15.5**	-	**This paper**
‡	*C. symbiosum*	2FM4	NMR-derived structure of the CD	-	-	(Lin et al. 2006)

*Crystal structures described in this work are shown in bold.

†The cluster number relates to Fig. 4A. Within each cluster, structures are sorted in chronological order.

‡Structure not used for analysis; due to missing domains.

§Measured between C_α atoms of residues 455-564 (*C. symbiosum*); 456-565 (*F. trinervia*); 456-565 (*F. pringlei*); 482-589 (*T. brucei*); 458-567 (*Z. mays*).

¶Measured between C_α atoms of residues 214-271 (*C. symbiosum*); 215-272 (*F. trinervia*); 215-272 (*F. pringlei*); 218-275 (*T. brucei*); 217-274 (*Z. mays*).

Table 2.3.: Structural comparison of PPDK crystal structures by 2D C_α-atom RMSD (Å)*

	Cluster I†						Cluster II†				Cluster III†				Cluster IV†	Cluster V†
	1DIK	2DIK	1GGO	1JDE	1KBL	1KC7	5JVJ/B	5JVL/A	5JVL/C	5JVL/D	2R82	1VBG	1VBH	5JVJ/A	5JVN	2X0S
1DIK‡	0	0.4	0.5	0.6	0.9	0.9	10.7	9.2	10.8	10.6	11	10	9.9	10.9	8.1	5.9
2DIK	0.4	0	0.5	0.6	1	1	10.7	9.2	10.8	10.6	11	10	9.9	10.9	8.1	5.8
1GGO	0.5	0.5	0	0.7	0.9	0.9	10.6	9.2	10.7	10.5	10.9	9.9	9.8	10.8	8	5.8
1JDE	0.6	0.6	0.7	0	1.1	1.1	10.7	9.2	10.8	10.6	11	10	9.9	10.9	8.1	5.9
1KBL	0.9	1	0.9	1.1	0	0.3	10.7	9.2	10.7	10.6	10.9	10	9.9	10.8	8	5.8
1KC7	0.9	1	0.9	1.1	0.3	0	10.7	9.2	10.7	10.5	11	10	9.9	10.9	8	5.9
5JVJ/B	10.7	10.7	10.6	10.7	10.7	10.7	0	3.2	1.5	2.7	5.1	4.5	5	4.6	6.1	11.4
5JVL/A	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2	9.2	3.2	0	2.6	2.2	5	4.4	4.7	5.2	5.6	10.8
5JVL/C‡	10.8	10.8	10.7	10.8	10.7	10.7	1.5	2.6	0	1.4	5.1	4.8	5.3	5	6.4	11.8
5JVL/D	10.6	10.6	10.5	10.6	10.6	10.5	2.7	2.2	1.4	0	5.3	5.3	5.7	5.7	6.7	12
2R82	11	11	10.9	11	10.9	11	5.1	5	5.1	5.3	0	3	3.1	2.9	5.5	10.8
1VBG‡	10	10	9.9	10	10	10	4.5	4.4	4.8	5.3	3	0	0.8	2.2	4.6	9.7
1VBH	9.9	9.9	9.8	9.9	9.9	9.9	5	4.7	5.3	5.7	3.1	0.8	0	2.4	4.5	9.5
5JVJ/A	10.9	10.9	10.8	10.9	10.8	10.9	4.6	5.2	5	5.7	2.9	2.2	2.4	0	4.5	10.3
5JVN‡	8.1	8.1	8	8.1	8	8	6.1	5.6	6.4	6.7	5.5	4.6	4.5	4.5	0	7.5
2X0S‡	5.9	5.8	5.8	5.9	5.8	5.9	11.4	10.8	11.8	12	10.8	9.7	9.5	10.3	7.5	0

*The 2D C_α atom RMSD was computed over all C_α atoms common and resolved in all PPDK structures with all domain resolved. Small RMSD are highlighted by blue, high RMSD by orange.

†The clusters relate to Fig. 2.4A and are characterized by a closed NBD combined with the CD facing the NBD (cluster I), a closed NBD with the CD-facing the PBD (cluster II), an open NBD with the CD facing the PBD (cluster III), an open NBD with the CD in between the PBD and NBD (cluster IV), and an open NBD with the CD facing the NBD (cluster V).

‡Cluster representatives

Table 2.4.: Unrestrained MD simulations of non-phosphorylated *Ft*PPDK*

Starting conformation	Repetition	Simulation length (ns)	Color in figures
I	I.1	600	Light green
I	I.2	600	Green
I	I.3	600	Dark olivegreen
II	II.1	600	Light gray
II	II.2	600	Gray
II	II.3	600	Dark gray
III	III.1	600	Yellow
III	III.2	600	Orange
III	III.3	1500	Dark red
Started from III.3 at 800 ns	III.4	700	Dark orange
IV	IV.1	600	Cyan
IV	IV.2	600	Purple
IV	IV.3	600	Brown
V	V.1	600	Light blue
V	V.2	600	Dark cyan
V	V.3	600	Dark blue

*Three replicate simulations were started from each cluster, using crystal structures of *Ft*PPDK, if available at the beginning of this project, or homology models (see Supplemental Methods).

References

Adachi, K., K. Oiwa, T. Nishizaka, S. Furuike, H. Noji, H. Itoh, M. Yoshida, and K. Kinosita (2007). "Coupling of Rotation and Catalysis in F1-ATPase Revealed by Single-Molecule Imaging and Manipulation". In: *Cell* 130.2, pp. 309–321.

Adams, P. D., P. V. Afonine, G. Bunkóczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L.-W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, and et al. (2010). "PHENIX : a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution". In: *Acta Crystallogr. D.* 66.2, pp. 213–221.

Afonine, P. (2015). "FEM: Feature Enhanced Map". In: *Acta Crystallogr. D.* 71.3, pp. 646–666.

Ahmed, A., F. Rippmann, G. Barnickel, and H. Gohlke (2011). "A Normal Mode-Based Geometric Simulation Approach for Exploring Biologically Relevant Conformational Transitions in Proteins". In: *J. Chem. Inf. Model.* 51.7, pp. 1604–1622.

Ahmed, A., S. Villinger, and H. Gohlke (2010). "Large-scale comparison of protein essential dynamics from molecular dynamics simulations and coarse-grained normal mode analyses". In: *Proteins* 78.16, pp. 3341–3352.

Berendsen, H. J. C., J. P. M. Postma, W. F. van Gunsteren, A. DiNola, and J. R. Haak (1984). "Molecular dynamics with coupling to an external bath". In: *J. Chem. Phys.* 81.8, p. 3684.

Bernstein, F. C., T. F. Koetzle, G. J. Williams, E. F. Meyer, M. D. Brice, J. R. Rodgers, O. Kennard, T. Shimanouchi, and M. Tasumi (1977). "The protein data bank: A computer-based archival file for macromolecular structures". In: *J. Mol. Biol.* 112.3, pp. 535–542.

Case, D. A., T. E. Cheatham, T. Darden, H. Gohlke, R. Luo, K. M. Merz, A. Onufriev, C. Simmerling, B. Wang, and R. J. Woods (2005). "The Amber biomolecular simulation programs". In: *J. Comput. Chem.* 26.16, pp. 1668–1688.

Chastain, C. J. and R. Chollet (2003). "Regulation of pyruvate, orthophosphate dikinase by ADP-/P_i-dependent reversible phosphorylation in C_3 and C_4 plants". In: *Plant Physiol. Bioch.* 41.6-7, pp. 523–532.

Chastain, C. J., C. J. Failing, L. Manandhar, M. A. Zimmerman, M. M. Lakner, and T. H. T. Nguyen (2011). "Functional evolution of C_4 pyruvate, orthophosphate dikinase". In: *J. Exp. Bot.* 62.9, pp. 3083–3091.

Chastain, C. J., J. W. Heck, T. A. Colquhoun, D. G. Voge, and X.-Y. Gu (2006). "Posttranslational regulation of pyruvate, orthophosphate dikinase in developing rice (Oryza sativa) seeds". In: *Planta* 224.4, pp. 924–934.

Cheatham, T. E. I., J. L. Miller, T. Fox, T. A. Darden, and P. A. Kollman (1995). "Molecular Dynamics Simulations on Solvated Biomolecular Systems: The Particle Mesh Ewald Method Leads to Stable Trajectories of DNA, RNA, and Proteins". In: *J. Am. Chem. Soc.* 117.14, pp. 4193–4194.

Chen, V. B., W. B. Arendall, J. J. Headd, D. A. Keedy, R. M. Immormino, G. J. Kapral, L. W. Murray, J. S. Richardson, and D. C. Richardson (2010). "MolProbity : all-atom structure validation for macromolecular crystallography". In: *Acta Crystallogr. D.* 66.1, pp. 12–21.

Collaborative, Computational Project and others (1994). "The CCP4 suite: programs for protein crystallography". In: *Acta Crystallogr. D.* 50.5, p. 760.

Cosenza, L. W., F. Bringaud, T. Baltz, and F. M. Vellieux (2002). "The 3.0Å Resolution Crystal Structure of Glycosomal Pyruvate Phosphate Dikinase from *Trypanosoma brucei*". In: *J. Mol. Biol.* 318.5, pp. 1417–1432.

Cowtan, K. (2006). "The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains". In: *Acta Crystallogr. D.* 62.9, pp. 1002–1011.

Doncheva, N. T., K. Klein, F. S. Domingues, and M. Albrecht (2011). "Analyzing and visualizing residue networks of protein structures". In: *Trends In Biochemical Sciences (Cambridge* 36.4, pp. 179–182.

Edwards, G. E., H. Nakamoto, J. N. Burnell, and M. D. Hatch (1985). "Pyruvate,P_i Dikinase and NADP-Malate Dehydrogenase in C_4 Photosynthesis: Properties and Mechanism of Light/Dark Regulation". In: *Ann. Rev. Plant Physio.* 36.1, pp. 255–286.

Eisenberg, E. and T. L. Hill (1979). "A cross-bridge model of muscle contraction". In: *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 33, pp. 55–82.

Emsley, P., B. Lohkamp, W. G. Scott, and K. Cowtan (2010). "Features and development of Coot". In: *Acta Crystallogr. D.* 66.4, pp. 486–501.

Esser, L. (1998). "Synapsin I is structurally similar to ATP-utilizing enzymes". In: *EMBO J.* 17.4, pp. 977–984.

Evans, P. R. and G. N. Murshudov (2013). "How good are my data and what is the resolution?" In: *Acta Crystallogr. D.* 69.7, pp. 1204–1214.

Feynman, R., R. Leighton, M. Sands, and E. Hafner (1965). *The Feynman Lectures on Physics; Vol. I.* Vol. 33. AAPT, p. 750.

Galindo-Murillo, R., D. R. Roe, and T. E. Cheatham (2015). "Convergence and reproducibility in molecular dynamics simulations of the DNA duplex d(GCACGAACGAACGAACGC)". In: *Biochim. Biophys. Acta* 1850.5, pp. 1041–1058.

Glaser, F., T. Pupko, I. Paz, R. E. Bell, D. Bechor-Shental, E. Martz, and N. Ben-Tal (2003). "ConSurf: Identification of Functional Regions in Proteins by Surface-Mapping of Phylogenetic Information". In: *Method. Biochem. Anal.* 19.1, pp. 163–164.

Hatch, M. D. (1979). "Regulation of C_4 Photosynthesis: Factors Affecting Cold-Mediated Inactivation and Reactivation of Pyruvate, P I Dikinase". In: *Aust. J. Plant Physiol.* 6.6, p. 607.

Hayward, S. and B. L. Groot (2008). "Normal Modes and Essential Dynamics". In: *Molecular Modeling of Proteins* 443, pp. 89–106.

Herzberg, O., C. C. Chen, G. Kapadia, M. McGuire, L. J. Carroll, S. J. Noh, and D. Dunaway-Mariano (1996). "Swiveling-domain mechanism for enzymatic phosphotransfer between remote reaction sites." In: *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 93.7, pp. 2652–2657.

Herzberg, O., C. C. H. Chen, S. Liu, A. Tempczyk, A. Howard, M. Wei, D. Ye, and D. Dunaway-Mariano (2002). "Pyruvate site of pyruvate phosphate dikinase: crystal structure of the enzyme-phosphonopyruvate complex, and mutant analysis". In: *Biochemistry* 41.3, pp. 780–787.

Homeyer, N., A. H. C. Horn, H. Lanig, and H. Sticht (2005). "AMBER force-field parameters for phosphorylated amino acids in different protonation states: phosphoserine, phosphothreonine, phosphotyrosine, and phosphohistidine". In: *J. Mol. Model.* 12.3, pp. 281–289.

Hornak, V., R. Abel, A. Okur, B. Strockbine, A. Roitberg, and C. Simmerling (2006). "Comparison of multiple Amber force fields and development of improved protein backbone parameters". In: *Proteins* 65.3, pp. 712–725.

Howard, J. (2010). "Motor Proteins as Nanomachines: The Roles of Thermal Fluctuations in Generating Force and Motion". In: *J. Biol. Phys.* Pp. 47–59.

Howlin, B., S. A. Butler, D. S. Moss, G. W. Harris, and H. P. C. Driessen (1993). "TLSANL: TLS parameter-analysis program for segmented anisotropic refinement of macromolecular structures". In: *J. Appl. Crystallogr.* 26.4, pp. 622–624.

Huxley, A. F. (1957). "A hypothesis for the mechanism of contraction of muscle". In: *Prog Biophys Biophys Chem* 7, pp. 255–318.

Jacobs, D. J., A. J. Rader, L. A. Kuhn, and M. F. Thorpe (2001). "Protein flexibility predictions using graph theory". In: *Proteins* 44.2, pp. 150–165.

Jorgensen, W. L., J. Chandrasekhar, J. D. Madura, R. W. Impey, and M. L. Klein (1983). "Comparison of simple potential functions for simulating liquid water". In: *J. Chem. Phys.* 79.2, p. 926.

Kabaleeswaran, V., N. Puri, J. E. Walker, A. G. W. Leslie, and D. M. Mueller (2006). "Novel features of the rotary catalytic mechanism revealed in the structure of yeast F1 ATPase". In: *EMBO J.* 25.22, pp. 5433–5442.

Kabsch, W. (2010). "XDS". In: *Acta Crystallogr. D.* 66.2, pp. 125–132.

Kabsch, W. and C. Sander (1983). "Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen-bonded and geometrical features". In: *Biopolymers* 22.12, pp. 2577–2637.

Katoh, K. (2002). "MAFFT: a novel method for rapid multiple sequence alignment based on fast Fourier transform". In: *Nucleic Acids Res.* 30.14, pp. 3059–3066.

Knowles, J. R. (1980). "Enzyme-Catalyzed Phosphoryl Transfer Reactions". In: *Annu. Rev. Biochem.* 49.1, pp. 877–919.

Korolev, S., J. Hsieh, G. H. Gauss, T. M. Lohman, and G. Waksman (1997). "Major Domain Swiveling Revealed by the Crystal Structures of Complexes of *E. coli* Rep Helicase Bound to Single-Stranded DNA and ADP". In: *Cell* 90.4, pp. 635–647.

Kumar, S., J. M. Rosenberg, D. Bouzida, R. H. Swendsen, and P. A. Kollman (1992). "THE weighted histogram analysis method for free-energy calculations on biomolecules. I. The method". In: *J. Comput. Chem.* 13.8, pp. 1011–1021.

Lim, K., R. J. Read, C. C. H. Chen, A. Tempczyk, M. Wei, D. Ye, C. Wu, D. Dunaway-Mariano, and O. Herzberg (2007). "Swiveling Domain Mechanism in Pyruvate Phosphate Dikinase". In: *Biochemistry* 46.51, pp. 14845–14853.

Lin, Y., J. D. Lusin, D. Ye, D. Dunaway-Mariano, and J. B. Ames (2006). "Examination of the Structure, Stability, and Catalytic Potential in the Engineered Phosphoryl Carrier Domain of Pyruvate Phosphate Dikinase". In: *Biochemistry* 45.6, pp. 1702–1711.

McCoy, A. J., R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, and R. J. Read (2007). "Phaser crystallographic software". In: *J. Appl. Crystallogr.* 40.4, pp. 658–674.

McGuire, M., L. J. Carroll, L. Yankie, S. H. Thrall, D. Dunaway-Mariano, O. Herzberg, B. Jayaram, and B. H. Haley (1996). "Determination of the Nucleotide Binding Site within Clostridium symbiosum Pyruvate Phosphate Dikinase by Photoaffinity Labeling, Site-Directed Mutagenesis, and Structural Analysis". In: *Biochemistry* 35.26, pp. 8544–8552.

Mildvan, A. S. and R. K. Gupta (1978). "Nuclear relaxation measurements of the geometry of enzyme-bound substrates and analogs". In: *Methods Enzymol.* 49, pp. 322–359.

Murshudov, G. N., P. Skubák, A. A. Lebedev, N. S. Pannu, R. A. Steiner, R. A. Nicholls, M. D. Winn, F. Long, and A. A. Vagin (2011). "REFMAC 5 for the refinement of macromolecular crystal structures". In: *Acta Crystallogr. D.* 67.4, pp. 355–367.

Nakanishi, T., T. Nakatsu, M. Matsuoka, K. Sakata, and H. Kato (2005). "Crystal Structures of Pyruvate Phosphate Dikinase from Maize Revealed an Alternative Conformation in the Swiveling-Domain Motion". In: *Biochemistry* 44.4, pp. 1136–1144.

Nguyen, K. and P. C. Whitford (2016). "Steric interactions lead to collective tilting motion in the ribosome during mRNA–tRNA translocation". In: *Nat. Commun.* 7, p. 10586.

Novak, B. R., D. Moldovan, G. L. Waldrop, and M. S. de Queiroz (2010). "Behavior of the ATP grasp domain of biotin carboxylase monomers and dimers studied using molecular dynamics simulations". In: *Proteins* 79.2, pp. 622–632.

Pei, J., B.-H. Kim, and N. V. Grishin (2008). "PROMALS3D: a tool for multiple protein sequence and structure alignments". In: *Nucleic Acids Res.* 36.7, pp. 2295–2300.

Qi, X., W. Lin, M. Ma, C. Wang, Y. He, N. He, J. Gao, H. Zhou, Y. Xiao, Y. Wang, et al. (2016). "Structural basis of rifampin inactivation by rifampin phosphotransferase". In: *P. Natl. Acad. Sci. USA.* P. 201523614.

Roe, D. R., C. Bergonzo, and T. E. Cheatham (2014). "Evaluation of Enhanced Sampling Provided by Accelerated Molecular Dynamics with Hamiltonian Replica Exchange Methods". In: *J. Phys. Chem. B* 118.13, pp. 3543–3552.

Roe, D. R. and T. E. Cheatham (2013). "PTRAJ and CPPTRAJ: Software for Processing and Analysis of Molecular Dynamics Trajectory Data". In: *J. Chem. Theory Comput.* 9.7, pp. 3084–3095.

Rosche, E., M. Streubel, and P. Westhoff (1994). "Primary structure of the photosynthetic pyruvate orthophosphate dikinase of the C_3 plant *Flaveria pringlei* and expression analysis of pyruvate orthophosphate dikinase sequences in C_3, C_3/C_4 and C_4 *Flaveria* species". In: *Plant Mol. Biol.* 26.2, pp. 763–769.

Rosche, E. and P. Westhoff (1990). "Primary structure of pyruvate, orthophosphate dikinase in the dicotyledonous C_4 plant *Flaveria trinervia*". In: *Febs Lett.* 273.1-2, pp. 116–121.

Ryckaert, J.-P., G. Ciccotti, and H. J. Berendsen (1977). "Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: molecular dynamics of n-alkanes". In: *J. Comput. Phys.* 23.3, pp. 327–341.

Salahas, G., Y. Manetas, and N. Gavalas (1990). "Assaying for pyruvate, orthophosphate dikinase activity: necessary precautions with phosphoenolpyruvate carboxylase as coupling enzyme". In: *Photosynth. Res.* 24.2, pp. 183–188.

Schrödinger, LLC (2015). *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8.*

Schuwirth, B. S. (2005). "Structures of the Bacterial Ribosome at 3.5 A Resolution". In: *Science* 310.5749, pp. 827–834.

Shannon, P. (2003). "Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks". In: *Genome Res.* 13.11, pp. 2498–2504.

Shirahashi, K., S. Hayakawa, and T. Sugiyama (1978). "Cold Lability of Pyruvate, Orthophosphate Dikinase in the Maize Leaf". In: *Plant Physiol.* 62.5, pp. 826–830.

Sugiyama, T. (1973). "Purification, molecular, and catalytic properties of pyruvate phosphate dikinase from the maize leaf". In: *Biochemistry* 12.15, pp. 2862–2868.

Teplyakov, A., K. Lim, P.-P. Zhu, G. Kapadia, C. C. H. Chen, J. Schwartz, A. Howard, P. T. Reddy, A. Peterkofsky, and O. Herzberg (2006). "Structure of phosphorylated enzyme I, the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system sugar translocation signal protein". In: *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 103.44, pp. 16218–16223.

Torrie, G. and J. Valleau (1977). "Nonphysical sampling distributions in Monte Carlo free-energy estimation: Umbrella sampling". In: *J. Comput. Phys.* 23.2, pp. 187–199.

Wang, H. and G. Oster (2002). "Ratchets, power strokes, and molecular motors". In: *Appl. Phys. A* 75.2, pp. 315–323.

Webb, B. and A. Sali (2014). "Comparative Protein Structure Modeling Using MODELLER". In: *Current Protocols in Bioinformatics*, pp. 561–5632.

Wei, M., Z. Li, D. Ye, O. Herzberg, and D. Dunaway-Mariano (2000). "Identification of Domain-Domain Docking Sites within Clostridium symbiosum Pyruvate Phosphate Dikinase by Amino Acid Replacement". In: *J. Biol. Chem.* 275.52, pp. 41156–41165.

Weiße, R. H.-J., A. Faust, M. Schmidt, P. Schönheit, and A. J. Scheidig (2016). "Structure of NDP-forming Acetyl-CoA synthetase ACD1 reveals a large rearrangement for phosphoryl transfer". In: *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 113.5, pp. 519–528.

Wong, I. and T. M. Lohman (1997). "A Two-Site Mechanism for ATP Hydrolysis by the Asymmetric Rep Dimer P_2S As Revealed by Site-Specific Inhibition with ADP-AlF_4". In: *Biochemistry* 36.11, pp. 3115–3125.

Word, J., S. C. Lovell, J. S. Richardson, and D. C. Richardson (1999). “Asparagine and glutamine: using hydrogen atom contacts in the choice of side-chain amide orientation”. In: *J. Mol. Biol.* 285.4, pp. 1735–1747.

Yasuda, R., H. Noji, M. Yoshida, K. Kinosita, and H. Itoh (2001). “Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F1-ATPase”. In: *Nature* 410.6831, pp. 898–904.

Ye, D., M. Wei, M. McGuire, K. Huang, G. Kapadia, O. Herzberg, B. M. Martin, and D. Dunaway-Mariano (2001). “Investigation of the Catalytic Site within the ATP-Grasp Domain of Clostridium symbiosum Pyruvate Phosphate Dikinase”. In: *J. Biol. Chem.* 276.40, pp. 37630–37639.

Yoshida, M., E. Muneyuki, and T. Hisabori (2001). “ATP synthase — a marvellous rotary engine of the cell”. In: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2.9, pp. 669–677.

Zhang, Z., L. Huang, V. M. Shulmeister, Y.-I. Chi, K. K. Kim, L.-W. Hung, A. R. Crofts, E. A. Berry, and S.-H. Kim (1998). “Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1”. In: *Nature* 392.6677, pp. 677–684.

3. Identifizierung weiterer Teilschritte im katalytischen Mechanismus der Pyruvat-Phosphat Dikinase durch die vom Enzym nicht umsetzbare Nukleotidform ADP

Titel Trapped intermediate state of plant pyruvate phosphate dikinase indicates substeps in catalytic swiveling domain mechanism

Autoren Alexander Minges, Astrid Höppner, Georg Groth

Eigener Anteil 60 %

Schreiben des Manuskriptes, Expression und Reinigung rekombinanter Proteine, Strukturaufklärung, Datenanalyse

Veröffentlicht in *Protein Science* (DOI: 10.1002/pro.3184)

Originalartikel veröffentlich von Wiley-Blackwell © 2017 The Protein Society
Reproduktion mit freundlicher Genehmigung von Wiley-Blackwell

Impact-Faktor (2015) 3,039

Abstract

Pyruvate phosphate dikinase (PPDK) is an essential enzyme of both the C_4 photosynthetic pathway and cellular energy metabolism of some bacteria and unicellular protists. In C_4 plants, it catalyzes the ATP- and P_i-dependent formation of phosphoenolpyruvate (PEP) while in bacteria and protozoa the ATP-forming direction is used. PPDK is composed out of three distinct domains and exhibits one of the largest single domain movements known today during its catalytic cycle. However, little information about potential intermediate steps of this movement were available. A recent study resolved a discrete intermediate step of PPDK's swiveling movement, shedding light on the details of this intriguing mechanism. Here we present an additional structural intermediate that possibly represents another crucial step in the catalytic cycle of PPDK, providing means to get a more detailed understanding of PPDK's mode of function.

Introduction

Pyruvate phosphate dikinase (PPDK) is a highly versatile enzyme catalyzing the interconversion between phosphoenolpyruvate (PEP) and pyruvate in bacteria, plants and unicellular parasitic protists such as *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, or *Entamoeba histolytica*. While serving as a glycolytic enzyme in protists enhancing the energy efficiency in these organisms at energy-limiting conditions (Mertens 1993), PPDK works in the opposite direction in chloroplasts of C_4 plants where it catalyzes the ATP-driven regeneration of the primary carboxylation substrate of the C_4 pathway PEP (Chastain and Chollet 2003). The active biological assembly in bacteria consists of a homodimer, while plant PPDK can form homotetramers as functional complex. Each PPDK monomer consists of three distinct structural and functional domains (Fig. 3.1A): An N-terminal nucleotide binding domain (NBD), a central domain (CD) housing the catalytic histidine residue that shuttles the phosphoryl group from the high-energy phosphate substrates and a C-terminal PEP/pyruvate binding domain (PBD). The substrate binding sites of the NBD and PBD are spaced 45 Å apart. Hence, a so-called swiveling-domain mechanism was proposed based on crystal structures from *Clostridium symbiosum* (Herzberg et al., 1996), *Zea mays* (Nakanishi et al. 2005) and *Trypanosoma brucei* (Cosenza et al. 2002) to explain the transport of the phosphoryl group from the NBD to the PBD with the CD undergoing a large rotational

(~110°) and translational (~40 Å) movement. Recent findings based on structures from the C_4 and C_3 plants *Flaveria trinervia* and *Flaveria pringlei* suggest that the swiveling motion proceeds with at least one discrete sub-step and might employ an alternate-binding change mechanism (Minges et al. 2017). Here we present a novel crystal structure (PDB code 5LU4) of the C_4-PPDK from *F. trinervia* that has been crystallized in the presence of the glycolytic substrate pyruvate and the nucleotide inhibitor ADP. The structure represents a yet unknown potential conformational intermediate of the CD and further elucidates the sequential path of the swiveling motion in the PPDK catalytic cycle.

Results and Discussion

The pyruvate/ADP complex structure of FtPPDK (PDB code 5LU4) was solved using molecular replacement (MR) and was refined to a resolution of 2.90 Å with R/R_{free} values of 24.7%/28.6% (Tab. 3.1) with an estimated coordinate error of 0.52 Å. Coordinates of FtPPDK structure 5JVL chain D were used as a search model for MR. Crystals of 5LU4 belong to space group $P2_12_12_1$ with the asymmetric unit (ASU) consisting of two FtPPDK monomers (Fig. 3.1B). The inhibitory ADP molecule is bound to the NBD in the same manner as the ATP analogue 2'-Br-AppNHp in FtPPDK structures 5JVL and 5JVN (Fig. 3.2C) provoking a closed state of the NBD (Minges et al. 2017). Similar ADP-bound conformations have also been observed for other proteins containing an ATP grasp fold such as the human citrate lyase (PDB code 3PFF) or the bacterial glycinamide ribonucleotide synthetase (PDB code 2XD4). In 5LU4, hydrogen bonds are formed between residues Lys25, Gln336 and the β-phosphate of ADP as well as Thr108, Arg95, Lys25 and the α-phosphate of ADP. The adenine ring is bound by hydrogen bonds formed by side chains of residues Ser93, Ser242 and the backbone of Val244. Glu324 is forming a hydrogen bond to the 2'-OH group of the ribose moiety (Fig. 3.2C). Compared to the previously resolved intermediate position of the CD in 5JVN and its NBD-facing conformation in PPDK structures 2X0S (*T. brucei*) or 1KBL (*C. symbiosum*) (Herzberg et al. 2002), the position of the CD in the newly resolved structure suggests domain swiveling along disparate axes to properly align the catalytic His456 for phosphoryl group transfer from the ATP substrate in the NBD to the pyruvate bound in the PBD. To this end, 5LU4 seems to reflect a potential consecutive conformational state following the CD intermediate resolved in 5JVN. Rotation of the CD towards the NBD along an axis defined by the linker helices connecting CD, NBD and PBD in 5LU4 is similar

to the previously resolved motion in the 5JVN intermediate. However, on top of this the CD is rotated by ~104° around a second axis running almost perpendicular to the initial axis in the linker helices (Fig. 3.2B) in 5LU4 to further complete the catalytic cycle.

As for PPDK structures 5JVL and 5JVJ the ASU of 5LU4 contains two monomers. However, in contrast to the monomer arrangement in the ASU of previously published PPDK structures, where the functional homodimer is formed via their PBDs, monomers in the ASU of the swiveling domain intermediate 5LU4 interact directly via their NBDs or their CDs contacting the NBD in the other monomer, respectively (Fig. 3.1B). Naturally, the biological assembly previously described for bacterial, plant and protist PPDKs consisting of a PBD-mediated dimer can be constructed from the crystallographic symmetry for the 5LU4 assembly, too (Fig. 3.1C). Yet, the spatial arrangement of closely interacting NBDs in the ASU of 5LU4 preventing the CD from adopting its terminal NBD-facing conformation was certainly a crucial factor to resolve the new potential swiveling intermediate. In addition to steric restrictions from the NBDs, the 5LU4 intermediate conformation is stabilized by a small number of polar interactions between the CD of monomer B and the NBD of monomer A in the ASU. The side chain of Glu290/A interacts with the backbone of residues Met453/B and Thr454/B. Furthermore, Asn250/A forms a hydrogen bond with Glu431/B. However, taking into account the overall dimensions and the high intrinsic flexibility of the protein as reflected by high B-factors and the large domain movements in the catalytic cycle in CD and NBD, it is unlikely that these few interactions on their own have driven the CD in the intermediate conformation resolved in 5LU4. Therefore, the main reason for isolating this potential conformational intermediate of the CD swiveling motion in the crystal is probably related to the steric hindrance of the terminal CD transition path towards the NBD in the 5LU4 dimeric assembly. However, such a steric isolation of the swiveling intermediate does not preclude that the observed structural snapshot in fact represents a physiologically relevant though short-lived conformational intermediate.

Similar restriction of the CD movement by symmetry-related molecules has been observed in the PBD-facing structure 2R82 of mutant *C. symbiosum* PPDK (Lim et al. 2007). Nonetheless, 2R82 clearly constitutes a plausible and well-approved conformational state in the PPDK's swiveling domain mechanism. The potential physiological relevance of our trapped 5LU4 intermediate is further supported by the free energy landscape profile computed for non-phosphorylated FtPPDK (Minges et al. 2017). The transition path connecting the two extreme conformations of the CD in the swiveling motion, which are located them-

selves in local minima of the free energy landscape, follows alow energy valley. The previously resolved CD intermediate 5JVN is located near a shallow energy minimum along this path, while both, the extreme conformation of the CD resolved in PPDK of *T. brucei* (PDB code 2X0S) (Cosenza et al. 2002) and the trapped 5LU4 intermediate of *F. trinervia* PPDK, are located on the edge of the proposed transition path at similar free energies (~12 kcal mol^{-1}) making both of them energetically feasible intermediates.

The combination of currently known crystal structures, including the conformational intermediate described here, allows to sketch a plausible path of the conformational shifts in the CD taking place in the proposed PPDK swiveling mechanism (Fig. 3.2A): First, the CD is positioned with its catalytic His456 mediating phosphoryl group transfer between NBD and PDB in close proximity to the pyruvate binding site. At this initial state, the NBD is empty and in an open conformation (PDB code 5JVJ chain A). Subsequent nucleotide binding then triggers movement and closure of the NBD (PDB code 5JVL; Fig. 3.2A, state 1). In consequence, the CD is rotated towards the NBD by ~45° around an axis located at the center of the CD running parallel to the linker helices that connect CD to NBD and PBD. The related swiveling motion places the CD in an intermediate conformation between both substrate binding domains as observed in 5JVN (Fig. 3.2A, state 2). To further align the catalytic His456 with the bound nucleotide substrate in the nucleotide binding cleft of the NBD, the CD then is rotated by ~104° along an axis that is oriented perpendicular to the previous swiveling movement (Fig. 3.2A, state 3). Eventually the CD is tilted towards the nucleotide binding site, resulting in the NBD-facing conformation, known from the 2X0S and 1KBL crystal structures of *T. brucei* and *C. symbiosum*.

Similar discrete sub-steps of rotary domain movements deduced form the ensemble of different PPDK conformational states have been described for other proteins exhibiting large rotational domain movements such as the F_1-ATPase (Yasuda et al. 2001), the bacterial flagellar motor (Sowa et al. 2005) or the *E. coli* 5'-nucleotidase (Schultz-Heienbrok et al. 2004). In these systems, the discovery of discrete sub-steps of a rotational movement — initially thought to be of rather continuous nature — has eventually led to deeper understanding of the underlying catalytic mechanism and a strong correlation between structure and molecular function. In the past, the CD swiveling motion of PPDK was well recognized as one of the largest single domain movements observed in enzyme catalysis, but has always been described as a smooth transition between two extreme conformational states (Herzberg et al. 1996; Lim et al. 2007). Here we demonstrate, that this event involves two sub-steps

at leat. Noteworthy, a similar two-stepped swiveling mechanism has been proposed for Enzyme I (EI) of the bacterial phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system (PTS). The PBD and CD of EI are structurally and functionally similar to their counterparts in PPDK and likewise catalyze a phosphoryl group transfer between distant substrate binding sites. Despite these similarities, the inter-domain linker in EI adopts a different conformation as in PPDK. Remarkably, structural data on EI suggest a swiveling mechanism, where the CD is detached from the PBD by swiveling around an α-helical linker as a first step, followed by the alignment of the catalytic histidine with its substrate histidine carrier proteine (HPr), implemented by a motion around a second linker segment (Teplyakov et al. 2006). This mechanism is highly similar to the two-stepped swiveling mechanism outlined in our study for PPDK as both proceed via a second step that is likely involved in the correct alignment of the catalytic histidine residue and the phosphoryl-accepting substrate.

In summary, recent advances in our knowledge on discrete conformational intermediates of the CD swiveling motion found in crystal structures of PPDK from the C_4 plant *F. trinervia*, now enable us to get a more detailed view on the conformational transitions of the protein in the catalytic cycle breaking with the paradigm that the proposed swiveling motion of the CD takes place as smooth transition between only two extreme conformations. But, on the contrary, the newly resolved intermediate conformations and related sub-steps provide a more detailed mechanistic understanding of a key enzyme of cellular energy metabolism in bacteria, protists and plants.

Material and Methods

Expression and purification of recombinant FtPPDK

Codon-optimized coding regions of PPDK from *Flaveria trinervia* stripped of the chloroplast transport sequence were cloned into the multiple cloning site of a pET-16b vector (Novagen) containing a histidine$_{10}$ tag and coding for a Tobacco Etch Virus (TEV) protease cleavage site. *E. coli* BL21 (DE3) cells (Agilent Technologies) transformed with this plasmid were grown in 2YT medium (5 g L^{-1} NaCl, 10 g L^{-1} yeast extract, 16 g L^{-1} peptone) at 30 °C to an OD_{600} of 0.8. Protein expression was induced by the addition of 0.1 mM isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG). Cells were harvested 18 h after induction by centrifugation. Harvested cells were suspended in lysis buffer (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 300 mM NaCl,

10 mM imidazole, 10 mM $MgSO_4$, 10% (w/v) glycerol, 5 mM DTT, 0,002% phenylmethanesulfonylfluoride) and disrupted using a cell disruptor (Constant Systems). PPDK was purified from the lysate using a nickel affinity chromatography column (GE Healthcare). Purification buffer (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 mM $MgSO_4$, 10% (w/v) glycerol, 5 mM DTT) and elution buffer (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 500 mM imidazole, 10 mM $MgSO_4$, 10% (w/v) glycerol, 5 mM DTT) were applied for purification. The loaded PPDK was washed with 50 mM, 150 mM and 200 mM imidazol, before elution with 500 mM imidazole. Protein containing fractions were pooled and concentrated by ultrafiltration (30 kDa cutoff, Millipore). The buffer was exchanged to purification buffer using a PD-10 column (GE Healthcare) before cleavage of the histidine tag by TEV protease was initiated at room temperature over night. Cleaved PPDK was separated from the affinity tag by reverse IMAC, the flow-through was pooled, concentrated by ultafiltration and the buffer changed for crystallization buffer (10 mM Tris/HCl pH 7.5, 5 mM $MgSO_4$).

Crystallization

Initial crystals of the FtPPDK-pyruvate-ADP complex were obtained using the sitting drop vapor diffusion method. FtPPDK in crystallization buffer at a concentration of 10 mg mL^{-1} was incubated at room temperature for 20 min with 5 mM $MgSO_4$, 5 mM pyruvate and 5 mM ADP. The protein solution was mixed with precipitant at a 1:1 ratio resulting in a final volume of 200 nL and was equilibrated against 50 µL reservoir solution at 21 °C. For crystal optimization the drop size was increased to 2 µL. The optimized precipitant contained 0.3 M $MgCl_2$, 0.1 M MES pH 6.5 and 10% (w/v) PEG 4000. Crystals grew within two days to a size of 300×20×10 μm^3. For cryoprotection ethylene glycol was added to the drop (final concentration 15%) before the crystals were flash-frozen in liquid nitrogen.

X-ray data collection and processing

X-ray diffraction data was obtained at EMBL/DESY (Hamburg, Germany) beamline P13 using a wavelength of 0.9686 Å. The data set spans a total range of 270° with an oscillation range of 0.1° per image. The data set was processed with XDS (Kabsch 2010), initial phases were determined by MR with Phaser (McCoy et al. 2007) using the coordinates of 5JVL chain D as starting model. The resulting structure was rebuilt using Bucaneer (Cowtan 2006) from the CCP4 (Collaborative, Computational Project and others 1994) suite, followed

by several rounds of manual and iterative rebuilding using Coot (Emsley and Cowtan 2004) and refinement with phenix.refine (Adams et al. 2010). Ligands were not modeled until near-final refinement stages to reduce model bias. The atomic displacement parameters were refined individually and were partly described as groups of translation, libration and screw-motion (TLS) (Howlin et al. 1993). Feature-enhanced maps (FEM) were used to enhance sensitivity for weak side chains (Afonine 2015). The structure was validated using tools provided by Coot and PHENIX, particularly MolProbity (Chen et al. 2010). Figures were generated using PyMOL (Schrödinger, LLC 2015) and PoseView (Stierand and Rarey 2010).

Protein Data Bank Accession Code

Structure factors and coordinates of the pyruvate/ADP complex of FtPPDK have been deposited in the Protein Data Bank in Europe (PDBe) with the accession code 5LU4.

Acknowledgments

We thank the staff at EMBL/DESY (Hamburg) for their kind support, especially Isabel Bento for her support at beamline P13 during data collection. No conflict of interest declared. This work has been supported by Heinrich Heine University Düsseldorf (scholarships within the iGRASP$_{seed}$-Graduate Cluster for A.M).

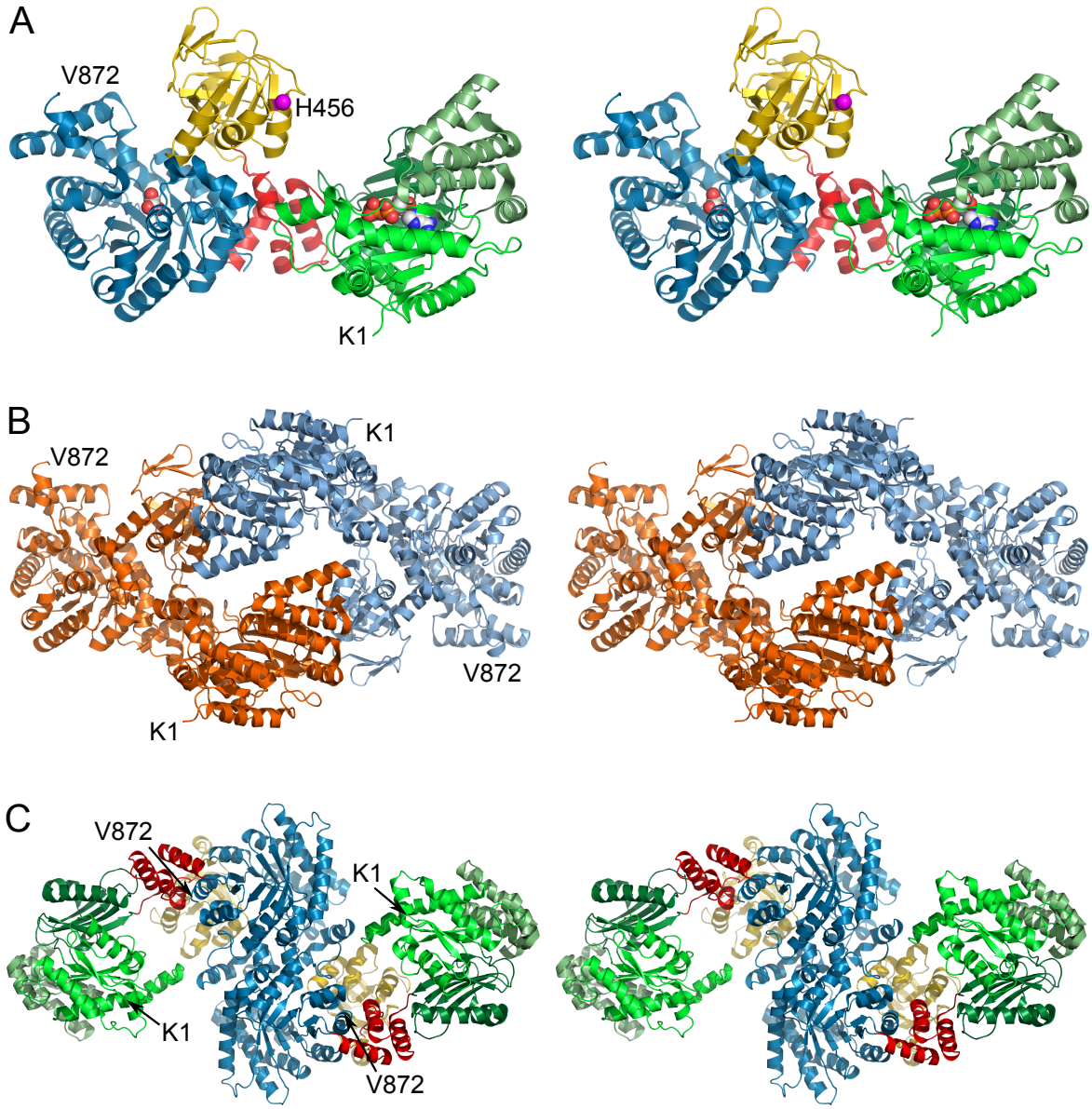


Figure 3.1.: (A) Stereo cartoon representation of 5LU4 chain A illustrating the overall domain organization. The nucleotide binding domain (NBD, aa 1-340) and its three subdomains are colored in different greens. The PEP/pyruvate binding domain (PBD) is colored in blue (aa 534-872). The central domain (CD, yellow, aa 381-516) with the catalytic His456 (magenta, C_α shown as sphere) is attached to both substrate binding domains via two short linker helices (red, aa 341-380 and 517-533). Pyruvate and ADP bound to the PBD and NBD respectively are depicted as spheres. (B) Dimeric assembly within the asymmetric unit (ASU). The dimer is formed by contacts between the NBDs and CDs of chains A and B, colored orange and blue respectively. (C) Biological assembly as identified by the program EPPIC (Duarte et al. 2012) and reconstructed from crystal symmetry. The dimerization interface is formed by both PBDs as previously described (Herzberg et al. 1996). Individual domains are colored according to (A).

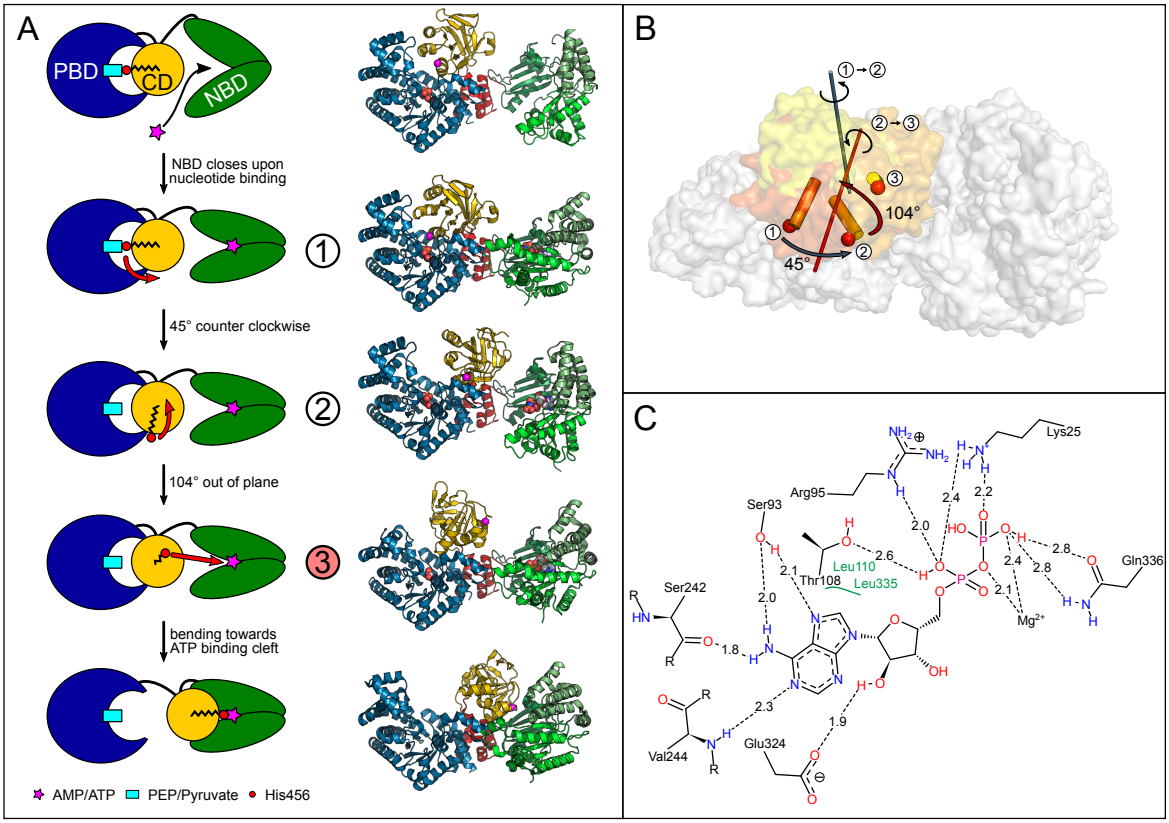


Figure 3.2.: (A) Schematic model of the CD movement in the catalytic cycle taking into account currently known conformational intermediates. Helix 20 containing the catalytic His456 (red circle) at its N-terminal end is drawn as black zig-zag structure. The different CD conformations are numbered according to (B) with the newly solved intermediate structure highlighted in red. Corresponding crystal structures are shown on the right from top to bottom: 5JVJ chain A, 5JVL chain D, 5JVN, 5LU4 chain A (Minges et al. 2017), 1KBL (Herzberg et al. 2002) (B) Illustration of PPDK-CD structural intermediates. CDs of published structures 5JVL chain C (1, dark-orange), 5JVN (2, orange), and of newly resolved structure 5LU4 (3, yellow) as well as the corresponding rotational axes for transformation between the different intermediate states are shown. (C) Schematic representation of the nucleotide binding site in 5LU4 chain A containing tightly bound ADP. The distances between the bound nucleotide and interacting amino acids of the binding pocket are given in Å.

Table 3.1.: Data collection and refinement statistics

	5LU4
Data collection	
Wavelength (Å)	0.9686
Space group	$P2_12_12_1$
Cell dimensions	
a, *b*, *c* (Å)	74.16 126.52 219.00
α, β, γ (°)	90, 90, 90
Resolution (Å)	219.00–2.90 (3.00–2.90)
R_{merge}	0.047 (0.499)
R_{meas}	0.053 (0.564)
R_{pim}	0.024 (0.242)
I/σ_I	20.1 (3.19)
Completeness (%)	99.8 (99.7)
Multiplicity	4.9 (5.2)
Wilson B (Å^2)	83.0
Model and refinement	
Resolution (Å)	109.79–2.90 (2.98–2.90)
Reflections (unique/test)	46418/2229
$R_{\text{work}}/R_{\text{free}}$ (%)	24.7/28.6
No. of atoms	
Protein	11954
Ligand/ion	64
Water	2
B-factors (Å^2)	
Protein	99.25
Ligands	64.61
Water	66.81
RMSD	
Bonds lengths (Å)	0.017
Bond angles (°)	1.52
Ramachandran analysis	
Favored regions (%)	97.34
Allowed regions (%)	2.43
Outliers (%)	0.24

Highest resolution shell is shown in parentheses.

References

Adams, P. D., P. V. Afonine, G. Bunkóczi, V. B. Chen, I. W. Davis, N. Echols, J. J. Headd, L.-W. Hung, G. J. Kapral, R. W. Grosse-Kunstleve, and et al. (2010). "PHENIX : a comprehensive Python-based system for macromolecular structure solution". In: *Acta Crystallogr. D.* 66.2, pp. 213–221.

Afonine, P. (2015). "FEM: Feature Enhanced Map". In: *Acta Crystallogr. D.* 71.3, pp. 646–666.

Chastain, C. J. and R. Chollet (2003). "Regulation of pyruvate, orthophosphate dikinase by ADP-/P_i-dependent reversible phosphorylation in C_3 and C_4 plants". In: *Plant Physiol. Bioch.* 41.6-7, pp. 523–532.

Chen, V. B., W. B. Arendall, J. J. Headd, D. A. Keedy, R. M. Immormino, G. J. Kapral, L. W. Murray, J. S. Richardson, and D. C. Richardson (2010). "MolProbity : all-atom structure validation for macromolecular crystallography". In: *Acta Crystallogr. D.* 66.1, pp. 12–21.

Collaborative, Computational Project and others (1994). "The CCP4 suite: programs for protein crystallography". In: *Acta Crystallogr. D.* 50.5, p. 760.

Cosenza, L. W., F. Bringaud, T. Baltz, and F. M. Vellieux (2002). "The 3.0Å Resolution Crystal Structure of Glycosomal Pyruvate Phosphate Dikinase from *Trypanosoma brucei*". In: *J. Mol. Biol.* 318.5, pp. 1417–1432.

Cowtan, K. (2006). "The Buccaneer software for automated model building. 1. Tracing protein chains". In: *Acta Crystallogr. D.* 62.9, pp. 1002–1011.

Duarte, J. M., A. Srebniak, M. A. Schärer, and G. Capitani (2012). "Protein interface classification by evolutionary analysis". In: *BMC Bioinf.* 13.1, p. 334.

Emsley, P. and K. Cowtan (2004). "Coot : model-building tools for molecular graphics". In: *Acta Crystallogr. D.* 60.12, pp. 2126–2132.

Herzberg, O., C. C. Chen, G. Kapadia, M. McGuire, L. J. Carroll, S. J. Noh, and D. Dunaway-Mariano (1996). "Swiveling-domain mechanism for enzymatic phosphotransfer between remote reaction sites." In: *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 93.7, pp. 2652–2657.

Herzberg, O., C. C. H. Chen, S. Liu, A. Tempczyk, A. Howard, M. Wei, D. Ye, and D. Dunaway-Mariano (2002). "Pyruvate site of pyruvate phosphate dikinase: crystal structure of the enzyme-phosphonopyruvate complex, and mutant analysis". In: *Biochemistry* 41.3, pp. 780–787.

Howlin, B., S. A. Butler, D. S. Moss, G. W. Harris, and H. P. C. Driessen (1993). "TLSANL: TLS parameter-analysis program for segmented anisotropic refinement of macromolecular structures". In: *J. Appl. Crystallogr.* 26.4, pp. 622–624.

Kabsch, W. (2010). "XDS". In: *Acta Crystallogr. D.* 66.2, pp. 125–132.

Lim, K., R. J. Read, C. C. H. Chen, A. Tempczyk, M. Wei, D. Ye, C. Wu, D. Dunaway-Mariano, and O. Herzberg (2007). "Swiveling Domain Mechanism in Pyruvate Phosphate Dikinase". In: *Biochemistry* 46.51, pp. 14845–14853.

McCoy, A. J., R. W. Grosse-Kunstleve, P. D. Adams, M. D. Winn, L. C. Storoni, and R. J. Read (2007). "Phaser crystallographic software". In: *J. Appl. Crystallogr.* 40.4, pp. 658–674.

Mertens, E. (1993). "ATP versus pyrophosphate: glycolysis revisited in parasitic protists". In: *Parasitol. Today* 9.4, pp. 122–126.

Minges, A., D. Ciupka, C. Winkler, A. Höppner, H. Gohlke, and G. Groth (2017). "Structural intermediates and directionality of the swiveling motion of Pyruvate Phosphate Dikinase". In: *Sci. Rep.* 7, p. 45389.

Nakanishi, T., T. Nakatsu, M. Matsuoka, K. Sakata, and H. Kato (2005). "Crystal Structures of Pyruvate Phosphate Dikinase from Maize Revealed an Alternative Conformation in the Swiveling-Domain Motion". In: *Biochemistry* 44.4, pp. 1136–1144.

Schrödinger, LLC (2015). *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8.*

Schultz-Heienbrok, R., T. Maier, and N. Sträter (2004). "Trapping a 96 degrees domain rotation in two distinct conformations by engineered disulfide bridges". In: *Protein Sci.* 13.7, pp. 1811–1822.

Sowa, Y., A. D. Rowe, M. C. Leake, T. Yakushi, M. Homma, A. Ishijima, and R. M. Berry (2005). "Direct observation of steps in rotation of the bacterial flagellar motor". In: *Nature* 437.7060, pp. 916–919.

Stierand, K. and M. Rarey (2010). "Drawing the PDB: Protein-Ligand Complexes in Two Dimensions". In: *ACS Med. Chem. Lett.* 1.9, pp. 540–545.

Teplyakov, A., K. Lim, P.-P. Zhu, G. Kapadia, C. C. H. Chen, J. Schwartz, A. Howard, P. T. Reddy, A. Peterkofsky, and O. Herzberg (2006). "Structure of phosphorylated enzyme I, the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system sugar translocation signal protein". In: *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 103.44, pp. 16218–16223.

Yasuda, R., H. Noji, M. Yoshida, K. Kinosita, and H. Itoh (2001). "Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F1-ATPase". In: *Nature* 410.6831, pp. 898–904.

4. Kompetitive Hemmung der Pyruvat-Phosphat Dikinase durch Inhibitoren der Nukleotidbindestelle

Titel Small-molecule inhibition of PPDK targeting the nucleotide binding site

Autoren Alexander Minges, Georg Groth

Eigener Anteil 70 %

Schreiben des Manuskriptes, Expression und Reinigung rekombinanter Proteine, Experimentelle Durchführung, Datenanalyse

Veröffentlicht in *Plos One* (DOI: 10.1371/journal.pone.0181139)

Originalartikel veröffentlicht unter einer Creative Commons-Lizenz:
Namensnennung International 4.0 (CC BY 4.0)



Impact-Faktor (2015) 3,057

Abstract

Pyruvate phosphate dikinase (PPDK) is an essential enzyme of C_4 photosynthesis in plants, catalyzing the ATP-driven conversion of pyruvate to phosphoenolpyruvate (PEP). It is further used by some bacteria and unicellular protists in the reverse, ATP-forming direction. Many weed species use C_4 photosynthesis in contrast to world's major crops, which are C_3 plants. Hence inhibitors of PPDK may be used as C_4-specific herbicides. By screening a library of 80 commercially available kinase inhibitors, we identified compounds derived from bisindolylmaleimide (bisindolylmaleimide IV, IC_{50} = 0.76 ± 0.13 µM) and indirubin (indirubin-3'-monoxime, IC_{50} = 4.2 ± 0.9 µM) that showed high inhibitory potency towards PPDK and are among the most effective PPDK inhibitors described today. Physiological studies on leaf tissues of a C_4 model plant confirmed *in vivo* inhibition of C_4-driven photosynthesis by these substances. Moreover, comparative docking studies of non-inhibitory bisindolylmaleimide derivatives suggest that the selectivity towards PPDK may be increased by addition of functional groups to the core structure.

The main characteristic of C_4 plants is their ability to thrive in warm and dry environmental conditions by efficient usage of nitrogen, water and CO_2 (Moore and Black 1979; Kopriva 2011; Ghannoum et al. 2011). This is ensured by spatial separation of the primary carbon fixation in mesophyll cells from CO_2 release to the Calvin-Benson Cycle in the bundle sheet cell chloroplasts, leading to a much more efficient carbon fixation compared to C_3 plants, where primary carbon fixation takes place directly in the Calvin-Benson Cycle (Hatch 2002).

Many of today's crops, such as wheat or rice, use the C_3 pathway, while most of the world's worst weeds (e.g. *Cyperus rotundus* or *Echinochloa crus-galli*) are C_4 plants (Holm et al. 1977). Hence, an herbicide that specifically targets C_4 plants would be of highest interest to ensure high crop yields in the context of increasing resistances against conventional herbicides. A potential target of the C_4 photosynthetic pathway is pyruvate phosphate dikinase (PPDK) which is one of the rate limiting enzymes of C_4 photosynthesis (Lawyer et al. 1987). It catalyzes the ATP-driven interconversion of pyruvate to phosphoenolpyruvate (PEP) and hereby regenerates PEP that is used as the primary CO_2 acceptor in C_4 plants. PPDK is composed of three distinct domains with well-defined functionalities (all residue numbers according to *Flaveria trinervia* notation): An N-terminal nucleotide binding domain (NBD, aa 1-340), a central domain (CD, aa 381-516) and a C-terminal PEP/pyruvate binding domain (PBD, aa 534-874). The CD is linked to both substrate binding domains via two

flexible linker regions (aa 341-380 and aa 517-533) and includes the catalytic His456 residue which is used in the transfer of a phosphoryl group from the nucleotide substrate ATP bound to the NBD to pyruvate at the PBD and vice versa. This phospho-transfer has to bridge a distance of approx. 40 Å from one substrate binding site to the other. Hence a swiveling domain mechanism was proposed to explain the large rotational and translational movement of the CD required for phosphoryl group transfer between the two catalytic centers (Herzberg et al. 1996; Lim et al. 2007). This swiveling mechanism has been supported by X-ray crystallographic data of PPDKs from *Clostridium symbiosum*, *Trypanosoma brucei* and *Zea mays*, which have resolved two extreme conformations of the CD – one facing the NBD, the other one facing the PBD (Herzberg et al. 1996; Cosenza et al. 2002; Nakanishi et al. 2005). A recently resolved structure of PPDK from the C_4 plant *F. trinervia*, representing a conformational intermediate of the catalytic cycle, illustrates that the proposed CD swiveling motion proceeds via at least one discrete sub-step (Minges et al. 2017). Thus, similar to other proteins employing large domain movements such as the F_1-ATPase or the bacterial flagellar motor, PPDK also seems to operate discrete sub-steps in the movement of the CD associated with the catalytic cycle.

Catalytic activity of PPDK is regulated by phosphorylation of a threonine residue (aa 454 in *Flaveria*), located in close proximity to the catalytic histidine (aa 456 in *Flaveria*). Remarkably, both phosphorylation and dephosphorylation of the regulatory threonine are catalyzed by a bifunctional enzyme, the PPDK regulatory protein (PPDK-RP) (Chapman and Hatch 1981; Ashton et al. 1984; Chastain and Chollet 2003; Astley et al. 2011). In plants, activation and inactivation of PPDK by PPDK-RP are light-mediated and depend on ADP and AMP levels at dark and light periods. High levels of stromal ADP stimulate phosphorylation in the dark and at the same time inhibit dephosphorylation of the regulatory threonine (Chastain and Chollet 2003; Chen et al. 2014). The three-dimensional structure of PPDK-RP from *Zea mays* has been recently solved, providing insights into the unusual bifunctionality of this protein (Jiang et al. 2016).

While PPDK is essential for all C_4 plants, it is not crucial for C_3 plants: PPDK knockout mutants of *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana* grown under normal environmental conditions do not exhibit any obvious phenotypical anomalies (Kang et al. 2005; Chastain et al. 2011). Moreover, although PPDK is used by some bacteria and unicellular parasitic protists such as *Giardia lamblia*, *Trichomonas vaginalis*, or *Entamoeba histolytica*, no homologue of PPDK is known in insects or vertebrates. This absence in higher animals makes PPDK an

interesting target for antimicrobial and antiparasitic drugs as well as C_4-specific herbicides.

Past studies have identified several substances originating from marine organisms with inhibitory effects on PPDK (Doyle et al. 2005; Haines et al. 2005; Motti et al. 2007a; Motti et al. 2007b). Among these, hydroxyquinones, ilimaquinone, ethylsmenoquinone and smenoquinone showed inhibitory constants in the higher micromolar range. The mode of action of these compounds is still not fully understood. In some cases, a mixed-type inhibition with regard to ATP was reported, which may hint at a binding at or near the nucleotide binding side. In a more recent study by Wu et al. (2013), the nucleotide binding site was targeted directly by tight binding, space-filling flavone derivatives, resulting in a number of hits with high inhibitory potency and specificity towards PPDK.

Building on these results, the search of novel inhibitors of PPDK may not only focus on the ATP binding site as a primary – but often neglected as "generic" – target, but may also include known kinase inhibitors. In a similar attempt, Armstrong et al. (2000) successfully identified inhibitors of carbohydrate sulfotransferase using a library of known kinase inhibitors. Here we report on the identification of novel high-potency inhibitors of PPDK targeting the nucleotide binding site from a set of commercially available kinase inhibitors by using PPDK from the C_4 plant *Flaveria trinervia* in an *in vitro* assay. Further studies on leaf tissues of the C_4 model plant maize demonstrate that these compounds inhibit C_4-driven photosynthesis *in vivo* and confirm that these substances inhibit PPDK at naturally occuring enzyme and substrate concentrations.

Material and Methods

Heterologous expression and protein purification

Heterologous gene expression and purification of the recombinant PPDK were performed as described in (Minges et al. 2017). A modified pET-16b vector (Merck, Darmstadt, GER) which contained an N-terminal histidine$_{10}$ tag, followed by a TEV cleavage site and the sequence encoding for PPDK from *Flaveria trinervia* (EMBL X75516) was used for heterologous expression in *E. coli* strain BL21 (DE3). Transformed cells were grown to an OD_{600} of 0.6–0.8 in 2YT medium at 30 °C before expression was induced by the addition of 0.1 mM isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranoside. Cells were harvested after over night incubation at 30 °C and 180 rpm. Preceding purification, cells were resuspended in lysis buffer (50 mM

Tris/HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 mM imidazole, 10 mM $MgSO_4$, 10% (w/v) glycerol, 5 mM DTT, 0.002% (w/v) phenylmethanesulfonylfluoride) and disrupted using a cell disruptor (Constant Systems). PPDK was purified using a nickel affinity chromatography column (GE Healthcare, Munich, GER). Purification (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 10 mM $MgSO_4$, 10% (w/v) glycerol, 5 mM DTT) and elution buffer (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 300 mM NaCl, 500 mM imidazole, 10 mM $MgSO_4$, 10% (w/v) glycerol, 5 mM DTT) were used for further purification steps. PPDK bound to the column was washed in steps of 50 mM, 150 mM and 200 mM imidazole, before final elution with 500 mM imidazole. Protein-rich fractions were pooled and a PD-10 desalting column (GE Healthcare) was used to change the elution buffer for assay buffer (100 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM $MgCl_2$, 2.5 mM KH_2PO_4, 6 mM glucose-6-phosphate, 5 mM $NaHCO_3$, 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT). The buffer-exchanged sample was eventually concentrated by ultrafiltration (30 kDa cutoff, Millipore).

PPDK activity assay and inhibitor screening

A set of 80 compounds from a commercially available kinase inhibitor library (#10505; Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA) was screened for its effects on *F. trinervia* PPDK. Activity of purified PPDK was measured according to Salahas et al. (1990) and Doyle et al. (2005) in a 96 well microtiter plate layout by a coupled spectrophotometrical assay. In this assay, the carboxylation of PEP by PEPC is linked to the oxidation of NADH by NADH-malate dehydrogenase (NADH-MDH). PEP is formed by PPDK via ATP-driven phosphorylation of pyruvate. Eventually, the consumption of one molecule NADH is equivalent to the formation of one molecule of PEP by PPDK. The assay was performed in a sample volume of 100 µL at 30 °C in a M200 plate reader (Tecan, Crailsheim, GER). 0.2 µM PPDK were mixed with 0.2 mM NADH, 2.5 mM sodium pyruvate, 0.8 U bacterial PEPC (Sigma-Aldrich, Darmstadt, GER) and 2 U NADH-MDH (Sigma-Aldrich). The reaction mixture was filled up to a total volume of 100 µL per sample with assay buffer (100 mM Tris/HCl pH 8.0, 10 mM $MgCl_2$, 2.5 mM KH_2PO_4, 6 mM glucose-6-phosphate, 5 mM $NaHCO_3$, 0.1 mM EDTA, 5 mM DTT). PPDK was pre-incubated for 20 min at 30 °C to ensure full activity. Inhibitors were dissolved in water free dimethyl sulfoxide (DMSO) with a final concentration of 10 mM and were added prior to adjusting the final sample volume. To account for possible effects of DMSO on PPDK activity, the solvent was added to the controls in an amount equal to the largest DMSO concentration used in the experiments. Incubation time of the final sample

mixture including inhibitors and PPDK was 15 min. Initial comparative screening was perfomed using 100 µM of each compound. The absorbance at 340 nm was recorded for 30 s with an interval of 300 ms. The reaction was started by automated injection of 1.25 mM ATP. The activity was then deduced from the initial slope, discarding the first 10 s due to noise caused by mixing effects and normalized to the DMSO-treated controls. Six compounds with the highest potency were chosen for further analysis of their inhibitory potential. Since compounds of the bisindolylmaleimide class showed similar effects on PPDK activity, only two of them (BIM IV and Go6983) were chosen as representatives of this class. The half maximal (50%) inhibitory concentration IC_{50} of the selected compounds was calculated by measuring the activity as described before for at least ten data points in the concentration range of 0 µM to 200 µM of the inhibitory compound in at least triplicates. A four-parameter log-logistic dose-response curve was then globally fitted to the individual replicates using the R software collection (R Core Team 2016) and the R package "drc" (Ritz et al. 2015) as proposed by assessment of Akaike's information criterion (AIC) (Akaike 1974; Aho et al. 2014). PPDK was incubated for 10 min with the inhibitors before each measurement. To exclude PEPC or NADH-MDH inhibition by the selected compounds, the initial screening assay was repeated in triplicates for those compounds without adding PPDK and starting the reaction by injection of PEP instead of ATP. Determined activities were compared to the control and statistically analyzed using a paired t-test.

Inhibition of oxygen evolution during C_4 photosynthesis

Oxygen (O_2) evolution, driven by the C_4 acid cycle, was measured according to Burnell and Hatch (1988), Haines et al. (2005), and Motti et al. (2007a). The reaction chamber of a Clark-type O_2 electrode (Hansatech, Norfolk, UK) was filled with 1 mL of degassed buffer containing 0.33 M sorbitol, 2.5 mM NaH_2PO_4, 2.5 mM $MgCl_2$, 25 mM HEPES/KOH pH 7.5, 50 µM $MnCl_2$ and 2.5 mM dithiothreitol (DTT). An area sized approx. 1 cm^2 was cut from a mature leaf of the C_4 model plant *Zea mays* and processed into slices of ~1 mm width. The leaf slices were added to the electrode chamber and the recording of O_2 evolution was started while keeping the chamber in the dark. The O_2 evolution rate recorded in this period was later substracted from the subsequently recorded rates to account for the electrode drift. Once the system had stabilized, the chamber was illuminated using a Schott KL 1500 electronic light source. Again, the system was given time to stabilize

before the C_4-driven O_2 evolution was initiated by the addition of first $NaHCO_3$ and then pyruvate in final concentrations of 4 mM each. In agreement with (Haines et al. 2005), the $NaHCO_3$-dependent O_2 evolution rate was negligible. The O_2 evolution rate after adding pyruvate was recorded for at least 3 min after it had stabilized and was used as the control rate. Then a total amount of 20 µg and 40 µg (if possible due to solubility limit) of the test substance dissolved in DMSO was added to the reaction chamber and the O_2 evolution rate was again recorded for at least 3 min. All measurements were done in triplicates.

Directly following the measurement, leaf slices were removed from the chamber and transferred to 1 mL of 80% acetone (v/v) for chlorophyll extraction. The samples were kept at 4 °C in the dark for 48 h. The total chlorophyll amount was determined using a DU800 (Beckman Coulter, USA) spectrophotometer and calculated using Eq 4.1 (Arnon 1949).

$$\text{total chl } [\mu\text{g mL}^{-1}] = (20.2 \times OD_{645}) + (8.02 \times OD_{663}) \tag{4.1}$$

The O_2 evolution rates in the presence of the inhibitors were compared to the respective controls and statistically analyzed using a two-sided t-test. Relative inhibition of O_2 evolution was expressed in percent and calculated as stated in Eq 4.2.

$$\text{inhibition } [\%] = 100 - \frac{\text{O}_2 \text{ evolution treated} \times 100}{\text{O}_2 \text{ evolution control}} \tag{4.2}$$

Docking of compounds into the nucleotide binding site

Since all of the most-inhibiting compounds are described as inhibitors for nucleotides or nucleic acids in their original targets, virtual docking of these molecules was performed into the ATP binding cleft of PDB 5JVL chain D. The bounding box was sized 20 Å in each dimension and centered at the position of the 4'-carbon atom of the nucleotide analogue 2'-Br-dAppNHp bound to this structure. 2'-Br-dAppNHp was removed after filling missing sidechains using a rotamer library (Shapovalov and Dunbrack 2011) and protonation with tools from UCSF Chimera (Pettersen et al. 2004). A maximum of 200 conformers of each compound was generated using RDKit (*RDKit: Open-source cheminformatics* 2016). Conformers with RMSDs below 0.1 Å to other conformers in the same set were discarded. Those sets of conformers were docked with the AutoDock Vina-derived program smina (Trott and Olson 2009; Koes et al. 2013). The docked results were then ranked according to their

predicted binding energy. Images were prepared using PyMOL (Schrödinger, LLC 2015)

Results and Discussion

To search for inhibitory compounds blocking the nucleotide binding site, a set of 80 commercially available kinase inhibitors was screened for effects on PPDK from the C_4 plant *Flaveria trinervia*. Analysis of the initial test set by plotting the residual PPDK activity after inhibitor treatment revealed several promising candidates. Of the 80 tested compounds, 22 led to 50% inhibition of PPDK activity at a concentration of 100 µM. Eleven of the tested compounds reduced the activity even to levels below 30%. Seven of the top scoring compounds belong to the chemical class of bisindolylmaleimides which are characterized by an indol-substituted maleimide structure and varying other structural elements. Six of the bisindolylmaleimide compounds caused an almost complete loss of PPDK activity when applied at concentrations of 100 µM. Residual activity measured was in the range of 1–3% of the DMSO-treated controls except for bisindolylmaleimide V showing a residual activity of 15% (Fig 4.1). Compounds of the bisindolylmaleimide class have been previously identified as high-pontency inhibitors of human protein kinase C (PKC) with IC_{50} values in the nanomolar range (Toullec et al. 1991; Davis et al. 1992; Martiny-Baron et al. 1993; Tanaka et al. 2004). A second class of PPDK inhibitors is formed by indirubin-3'-monoxime (IO) and its bromized derivative 6-bromoindirubin-3'-monoxime (BIO), which are described as ATP-competitive inhibitors of cyclin-dependent kinases (CDK, IC_{50}: 50–100 nM) and glycogen synthase kinase 3β (GSK3β, IC_{50}: 5–50 nM) (Leclerc et al. 2000; Meijer et al. 2003). However, residual activities observed after treatment with this chemical class were up to two-fold higher than with the bisindolylmaleimides. The other remaining compounds identified in our screening reducing PPDK activity below 30% (Fig 4.1) – ABT-869 and PP242 – are not structurally related to each other or to the two other groups. Both are ATP-competitive inhibitors, targeting receptor tyrosine kinases (RYK, ABT-869) and mammalian target of rapamycin (mTOR, PP242) with IC_{50} values of 4 nM and 8 nM, respectively (Albert et al. 2006; García-Echeverría 2010).

To exclude the possibility of a putative inhibition of PEPC or NADH-MDH by those compounds that might bias the coupled enzymatic assay, the screening assay was repeated without PPDK and ATP, instead starting the reaction by the addition of PEP. Hence, only inhibitory effects on either PEPC or NADH-MDH will be observable in this experimental

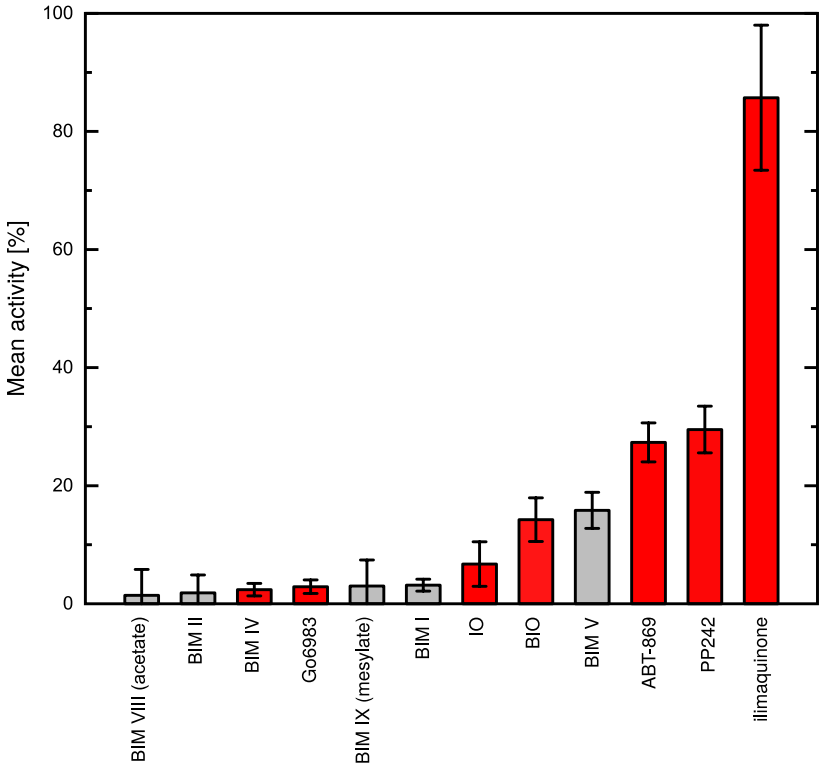


Figure 4.1.: Mean activity of PPDK at inhibitor concentrations of 100 µM. Depicted from left to right are the most potent inhibitors identified in the initial screening assay with the known PPDK inhibitor ilimaquinone. Inhibitors colored red were further analyzed for their IC_{50} values. Errors shown are standard deviations (SD).

setup. The results were compared with those of the controls and statistically analyzed. Only in case of 6-bromoindirubin-3-monoxime a significant inhibition of PEPC or NADH-MDH was apparent. The remaining activity was still well above 60% of the control. Therefore it is unlikely that the drop of PPDK activity observed for 6-bromoindirubin-3-monoxime to about 15% is caused by PEPC or NADH-MDH inhibition alone, but is mainly accounted for by inhibition of PPDK. For all other compounds, no significant inhibition of PEPC or NADH-MDH was detected.

The IC_{50} of the two indirubines, ABT-869, PP242, bisindolylmaleimide IV (BIM IV) and Go6983 were experimentally determined (Tab 4.1). For comparison, the PPDK specific inhibitor ilimaquinone (Haines et al. 2005) was added to the test set. In accordance to the measured activities from the initial screening, the two bisindolylmaleimides, BIM IV and Go6983, performed best with IC_{50} values (mean ± standard error) of 0.76 ± 0.13 µM and 1.5 ± 0.6 µM, respectively. An about tenfold lower inhibitory potency was shown by

the two indirubines. The IC_{50} of IO was determined at 4.2 ± 0.9 µM. The bromized form showed an even higher value of 11.3 ± 0.8 µM. The IC_{50} of ABT-869 and PP242 were more than 10-fold higher than those of the two bisindolylmaleimides with 11.20 ± 0.24 µM and 16.20 ± 0.32 µM. The PPDK-specific inhibitor ilimaquinone was the least potent inhibitor in this series with an IC_{50} of 740 ± 566 µM (Fig 4.2). In total, the inhibitory potency of the bisindolylmaleimides identified in this study is comparable and in case of BIM IV even higher than for the alkyl-substituted flavonoids previously described by Wu et al. (2013).

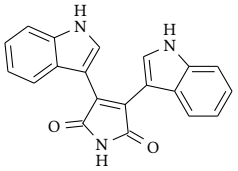
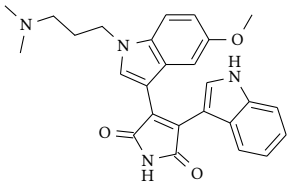
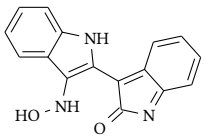
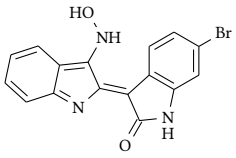
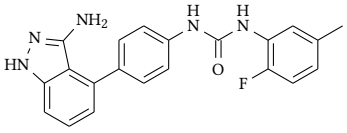
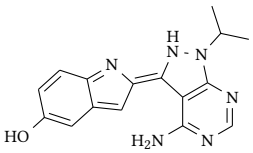
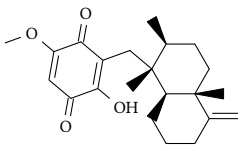
A primary obstacle for postemergent herbicides clearly is their uptake into the plant, particularly penetration of the leaf cuticle (Tice 2001). Consequently, the exact formulation of adjuvants to promote leaf penetration is one of the major issues in herbicide research and development. However, once inside the leaf, the extensive network of plasmodesmata in the bundle sheet cells of C_4 plants faciliates further spreading of the applied chemical. In leaf slice assays, the cuticular barrier is bypassed by direct exposure of parts of the plasmodesmata to the surrounding buffer while keeping the integrity of the intra- and intercellular C_4 photosynthetic apparatus intact. This allows to study the effect of inhibitors in a native cellular milieu. To substantiate the results of our *in vitro* assay and to elaborate the effect of the compounds identified in this assay under *in vivo* conditions, we thus applied oxgen measurements on isolated leaf slices of the C_4 model plant maize.

Of the six putative PPDK inhibitors characterized in the *in vitro* assay, five led to a significant decrease in C_4-dependent O_2 evolution rate (Fig 4.3). Two of them (IO and BIO) even show negative rates, representing a dramatic net O_2 consumption. However, both compounds include an oxime group structure, known to scavange molecular oxygen from aqeous solutions (Greaves et al. 1996). Thus, the O_2 consumption observed with IO and BIO is probably related to a chemical rather than a biological effect.

For the remaining three inhibitors with significant effects on the O_2 evolution rate, BIM IV inhibits O_2 evolution by 20% when applied at a final concentration of 20 µg mL^{-1} and 36% at 40 µg mL^{-1}. Similarly, the inhibition observed for Go6983 is 19% at 20 µg mL^{-1} and 29% at 40 µg mL^{-1}. Due to its solubility limit, PP242 was only applied at 20 µg mL^{-1}. However, already at this concentration, 73% inhibition of photosynthetic oxygen evolution was observed (Fig 4.3).

Remarkably, although the bisindolylmaleimides seem to represent the best inhibitors tested in this study, one representative of this family (bisindolylmaleimide XI, BIM XI) did not show any effect on PPDK activity at all. In contrast to other bisindolylmaleimides, this

Table 4.1.: Structures and IC_{50} values of PPDK inhibitors. [a]IC_{50} of ilimaquinone measured for *Zea mays* PPDK from leaf extracts according to Haines et al. (2005). Errors shown are standard errors (SE).

Compound	Structure	IC_{50} [µM]
bisindolylmaleimide IV		1.1 ± 0.2
Go6983		1.5 ± 0.6
indirubin-3'-monoxime		7.0 ± 0.7
6-bromoindirubin-3'-monoxime		11.5 ± 1.8
ABT-869		13.6 ± 3.3
PP242		20.6 ± 7.1
ilimaquinone		740 ± 566 292 ± 23[a]

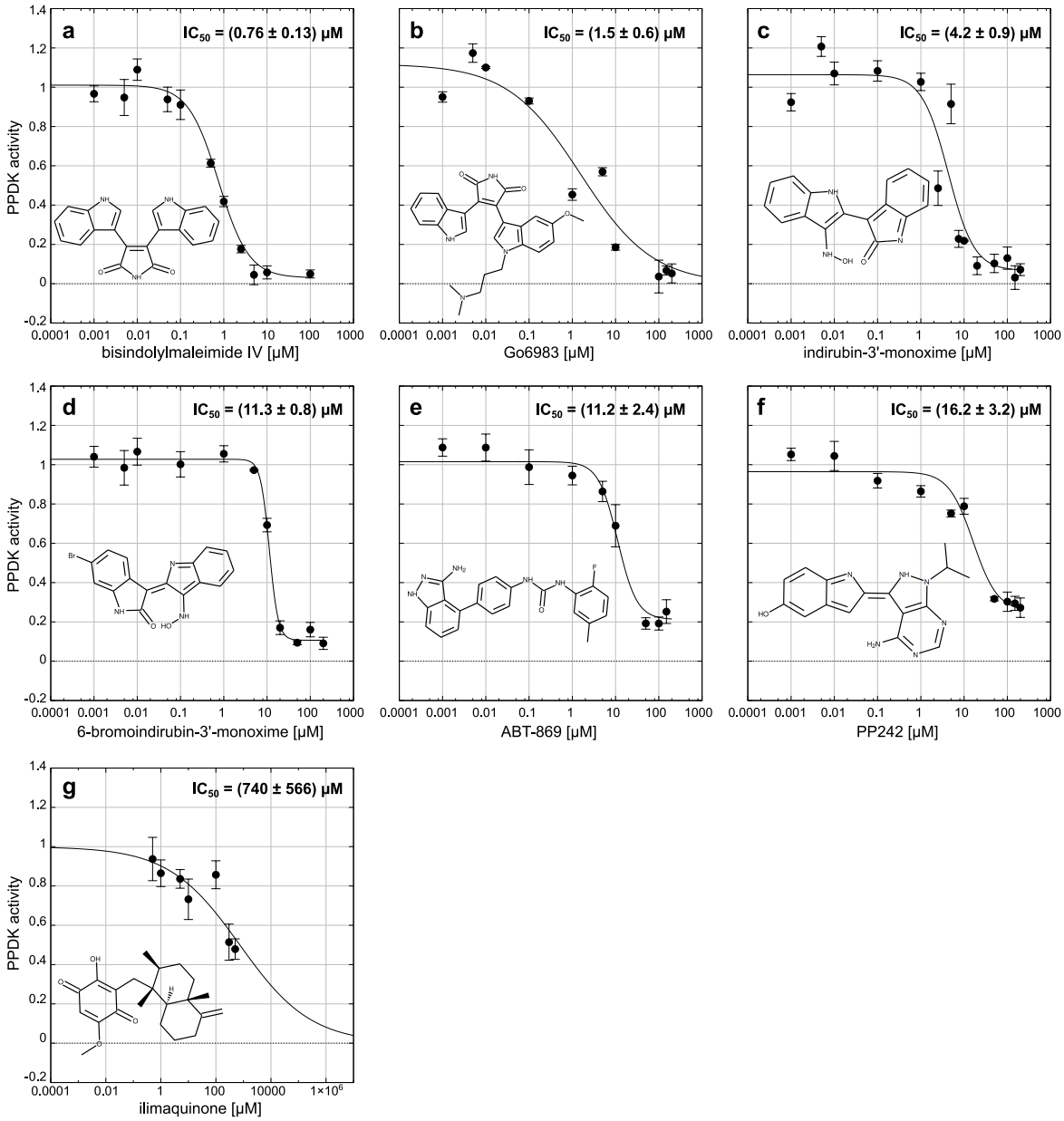


Figure 4.2.: Dose response curves of selected inhibitors. The PPDK concentration is kept constant at 0.2 µM, while the inhibitor concentrations are varied between 0 µM and 200 µM. The mean activity from three experiments relative to the control is plotted for bisindolylmaleimide IV (a), Go6983 (b), indirubin-3'-monoxime (c), 6-bromoindirubin-3'-monoxime (d), ABT-869 (e), PP242 (f) and the PPDK specific inhibitor ilimaquinone (g). The IC_{50} values were calculated from these data by non-linear regression using log-logistic dose-response functions. Errors shown are standard errors of the mean (SEM).

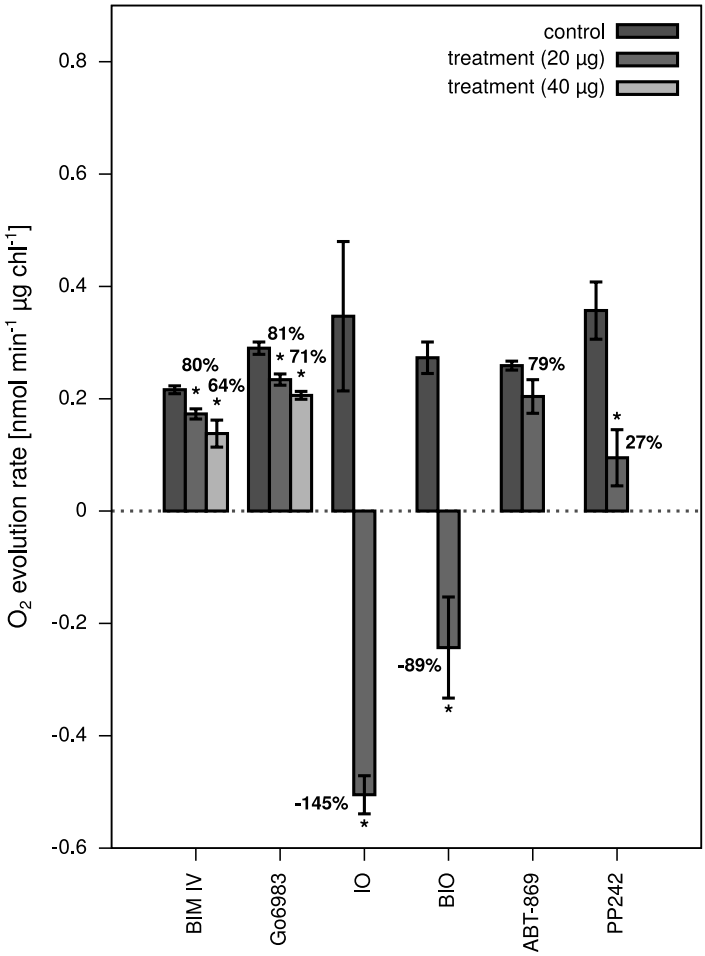


Figure 4.3.: Oxygen evolution *in vivo* in the presence of putative PPDK inhibitors. The rate of O_2 evolution of *Zea mays* leaf slices was measured in solution with a Clark-type electrode. PPDK inhibitors identified in the *in vitro* screening assay were added to the leaf slices in a final concentration of 20 µg mL^{-1}. A significant decrease ($p \leq 0.05$) was observed for BIM IV, IO, BIO and PP242. Rates were normalized to the total amount of chlorophyll in the leaf samples and corrected for electrode drift. O_2 evolution rates relative to the respective controls are given in percent. Noteworthy, the O_2 evolution rate in the presence of IO and BIO was negative, hence representing a consumption of O_2. Errors shown are SEM.

compound contains a rather bulky cyclo-hexyl structure attached at one of its indole groups. This bulky extention may lead to steric clashes between the compound and the amino acid residues forming the nucleotide binding pocket. To test this hypothesis, an *in silico* docking approach was taken, and the eleven initial top scoring compounds, including the seven most effective bisindolylmaleimides, were docked into the nucleotide binding site of the high resolution PPDK structure of *F. trinervia* (PDB 5JVL chain D) (Minges et al. 2017). Predicted binding energies for the bisindolylmaleimides were in the range of $-10.5\,\mathrm{kcal\,mol^{-1}}$ to $-8.0\,\mathrm{kcal\,mol^{-1}}$ thus reflecting a relatively tight binding which is in accordance with our activity assays. In addition, similar docking poses of all bisindolylmaleimides in regard to their core structural features were identified among the top-rated docking poses. Superimposition of BIM XI with those consensus poses revealed severe clashes with the surrounding protein structure at the highly-conserved residues Arg95 and Glu324 (Fig 4.4a), confirming our hypothesis that clashes resulting in unfavorable interactions with the surrounding binding pocket prevent inhibition of PPDK in case of BIM XI. Analysis of the influence of Arg95 and Glu324 on BIM XI binding by substitution mutagenesis is hampered as both residues are directly involved in ATP substrate binding. Hence, a mutation of these residues is likely to abolish PPDK activity. Additional structural information on the exact binding mode of bisindolylmaleimides by means of crystal structures in the presence of these compounds are probably needed to answer this question. In their original target PKC, bisindolylmaleimides are known to bind at the same position as the natural substrate ATP (Grodsky et al. 2006; Takimura et al. 2010). Similarly, our docking results suggest that the binding mode of bisindolylmaleimides in PPDK largely overlaps with the bound nucleotide analogue in PPDK structure 5JVL (Minges et al. 2017) (Fig 4.4b).

In summary, we were able to identify novel high-potency inhibitors of PPDK by screening a kinase inhibitor library. The novel inhibitors, which belong to the chemical classes of bisindolylmaleimides and indirubins, are among the most effective inhibitors of PPDK, with BIM IV as the single most potent PPDK inhibitor identified today. The compounds have been previously described as specific inhibitors of protein kinase C (PKC) and other kinases involved in cancer development. The herbicidal potential of the novel PPDK inhibitors is substantiated by *in vivo* plant studies, which show significant inhibition of C_4-dependent O_2 evolution by BIM IV, Go6983 and PP242. Their relatively high potency with IC_{50} values in the higher nanomolar to lower micromolar range suggests that these compounds are interesting lead structures for further adaption to the PPDK nucleotide binding pocket. The fact that

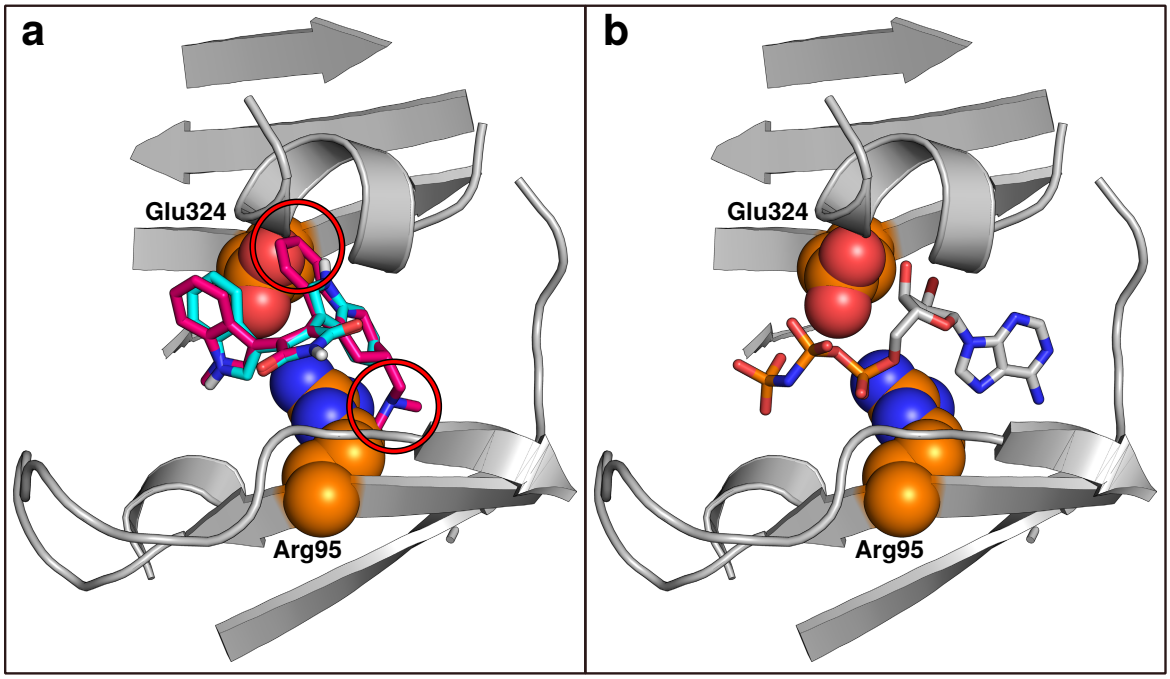


Figure 4.4.: (a) Bisindolylmaleimide IV (cyan) docked to the nucleotide binding domain of PPDK (PDB 5JVL chain D). Only parts of the whole structure are shown for clarity. Almost identical binding poses are among the top-rated docking results of all bisindolylmaleimides tested and proven to be effective in this study. The structure of the related but non-inhibitory compound bisindolylmaleimide XI is shown in magenta. Severe clashes of this compound occur with residues Arg95 and Glu324 and are highlighted by red circles. (b) Bound nucleotide analogue 2'-Br-dAppNHp in 5JVL chain D.

the extent and selectivity of PPDK inhibition indeed can be adapted by substitutions at the bisindolylmaleimide core is reflected by the observation that BIM XI shows no effect on PPDK activity due to potential steric clashes with amino acid side chains in the nucleotide binding pocket of PPDK. Because the newly identified PPDK inhibitors were originally designed for other kinases such as the PKC, they do not exclusively target PPDK in their current structure and chemical composition. However, this may be addressed in further studies by evolving bisindolylmaleimides towards tighter and more specific interaction with the PPDK's nucleotide binding pocket while preserving their unprecedented inhibitory potential. Similar strategies have been successfully pursued in the past in the development of selective protein kinase inhibitors such as AMG706 for vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), PF-562271 for focal adhesion kinase (FAK) or GSK461364A for Polo-like kinase (PLK1) (Zhang et al. 2009).

References

Aho, K., D. Derryberry, and T. Peterson (2014). "Model selection for ecologists: the worldviews of AIC and BIC". In: *Ecology* 95.3, pp. 631–636.

Akaike, H. (1974). "A new look at the statistical model identification". In: *IEEE T. Automat. Contr.* 19.6, pp. 716–723.

Albert, D. H., P. Tapang, T. J. Magoc, L. J. Pease, D. R. Reuter, R.-Q. Wei, J. Li, J. Guo, P. F. Bousquet, N. S. Ghoreishi-Haack, et al. (2006). "Preclinical activity of ABT-869, a multitargeted receptor tyrosine kinase inhibitor". In: *Mol. Cancer Ther.* 5.4, pp. 995–1006.

Armstrong, J. I., A. R. Portley, Y.-T. Chang, D. M. Nierengarten, B. N. Cook, K. G. Bowman, A. Bishop, N. S. Gray, K. M. Shokat, P. G. Schultz, et al. (2000). "Discovery of carbohydrate sulfotransferase inhibitors from a kinase-directed library". In: *Angew. Chem. Int. Ed.* 39.7, pp. 1303–1306.

Arnon, D. I. (1949). "Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxydase in *Beta vulgaris*". In: *Plant Physiol.* 24.1, pp. 1–15.

Ashton, A., J. Burnell, and M. Hatch (1984). "Regulation of C_4 photosynthesis: Inactivation of pyruvate, P_i dikinase by ADP-dependent phosphorylation and activation by phosphorolysis". In: *Arch. Biochem. Biophys.* 230.2, pp. 492–503.

Astley, H. M., K. Parsley, S. Aubry, C. J. Chastain, J. N. Burnell, M. E. Webb, and J. M. Hibberd (2011). "The pyruvate, orthophosphate dikinase regulatory proteins of Arabidopsis are both bifunctional and interact with the catalytic and nucleotide-binding domains of pyruvate, orthophosphate dikinase." In: *The Plant Journal* 68.6, pp. 1070–80.

Burnell, J. and M. Hatch (1988). "Photosynthesis in phosphoenolpyruvate carboxykinase-type C_4 plants: Photosynthetic activities of isolated bundle sheath cells from *Urochloa panicoides*". In: *Arch. Biochem. Biophys.* 260 (1), pp. 177–186.

Chapman, K. and M. Hatch (1981). "Regulation of C_4 photosynthesis: Mechanism of activation and inactivation of extracted pyruvate, inorganic phosphate dikinase in relation to dark/light regulation". In: *Arch. Biochem. Biophys.* 210.1, pp. 82–89.

Chastain, C. J. and R. Chollet (2003). "Regulation of pyruvate, orthophosphate dikinase by ADP-/P_i-dependent reversible phosphorylation in C_3 and C_4 plants". In: *Plant Physiol. Bioch.* 41.6-7, pp. 523–532.

Chastain, C. J., C. J. Failing, L. Manandhar, M. A. Zimmerman, M. M. Lakner, and T. H. T. Nguyen (2011). "Functional evolution of C_4 pyruvate, orthophosphate dikinase". In: *J. Exp. Bot.* 62.9, pp. 3083–3091.

Chen, Y.-B., T.-C. Lu, H.-X. Wang, J. Shen, T.-T. Bu, Q. Chao, Z.-F. Gao, X.-G. Zhu, Y.-F. Wang, and B.-C. Wang (2014). "Posttranslational Modification of Maize Chloroplast Pyruvate Orthophosphate Dikinase Reveals the Precise Regulatory Mechanism of Its Enzymatic Activity". In: *Plant Physiol.* 165.2, pp. 534–549.

Cosenza, L. W., F. Bringaud, T. Baltz, and F. M. Vellieux (2002). "The 3.0Å Resolution Crystal Structure of Glycosomal Pyruvate Phosphate Dikinase from *Trypanosoma brucei*". In: *J. Mol. Biol.* 318.5, pp. 1417–1432.

Davis, P. D., C. H. Hill, G. Lawton, J. S. Nixon, S. E. Wilkinson, S. A. Hurst, E. Keech, and S. E. Turner (1992). "Inhibitors of protein kinase C. 1. 2, 3-Bisarylmaleimides". In: *J. Med. Chem.* 35.1, pp. 177–184.

Doyle, J. R., J. N. Burnell, D. S. Haines, L. E. Llewellyn, C. A. Motti, and D. M. Tapiolas (2005). "A Rapid Screening Method to Detect Specific Inhibitors of Pyruvate Orthophosphate Dikinase as Leads for C_4 Plant-Selective Herbicides". In: *J. Biomol. Screen.* 10.1, pp. 67–75.

García-Echeverría, C. (2010). "Allosteric and ATP-competitive kinase inhibitors of mTOR for cancer treatment". In: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 20.15, pp. 4308–4312.

Ghannoum, O., J. R. Evans, and S. von Caemmerer (2011). "Nitrogen and Water Use Efficiency of C_4 Plants". In: *C_4 Photosynthesis and Related CO_2 Concentrating Mechanisms*. Ed. by A. S. Raghavendra and R. F. Sage. Springer Netherlands. Chap. 6, pp. 129–146.

Greaves, B., S. C. Poole, C. M. Hwa, and J. C. Fan (1996). "Method for inhibition of oxygen corrosion in aqueous systems by the use of a tannin activated oxygen scavenger". US5587109 A.

Grodsky, N., Y. Li, D. Bouzida, R. Love, J. Jensen, B. Nodes, J. Nonomiya, and S. Grant (2006). "Structure of the Catalytic Domain of Human Protein Kinase C β II Complexed with a Bisindolylmaleimide Inhibitor". In: *Biochemistry* 45.47, pp. 13970–13981.

Haines, D. S., J. N. Burnell, J. R. Doyle, L. E. Llewellyn, C. A. Motti, and D. M. Tapiolas (2005). "Translation of in Vitro Inhibition by Marine Natural Products of the C_4 Acid Cycle Enzyme Pyruvate P_i Dikinase to in Vivo C_4 Plant Tissue Death". In: *J. Agr. Food Chem.* 53.10, pp. 3856–3862.

Hatch, M. D. (2002). "C_4 photosynthesis: discovery and resolution". In: *Photosynth. Res.* 73.1/3, pp. 251–256.

Herzberg, O., C. C. Chen, G. Kapadia, M. McGuire, L. J. Carroll, S. J. Noh, and D. Dunaway-Mariano (1996). "Swiveling-domain mechanism for enzymatic phosphotransfer between remote reaction sites." In: *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 93.7, pp. 2652–2657.

Holm, L. G., D. L. Plucknett, J. V. Pancho, J. P. Herberger, et al. (1977). *The world's worst weeds.* University of Hawaii Press.

Jiang, L., Y.-b. Chen, J. Zheng, Z. Chen, Y. Liu, Y. Tao, W. Wu, Z. Chen, and B.-c. Wang (2016). "Structural Basis of Reversible Phosphorylation by Maize Pyruvate Orthophosphate Dikinase Regulatory Protein". In: *Plant Physiol.* 170.2, pp. 732–741.

Kang, H.-G., S. Park, M. Matsuoka, and G. An (2005). "White-core endosperm *floury endosperm-4* in rice is generated by knockout mutations in the C_4-type pyruvate orthophosphate dikinase gene (*OsPPDKB*)". In: *The Plant Journal* 42.6, pp. 901–911.

Koes, D. R., M. P. Baumgartner, and C. J. Camacho (2013). "Lessons Learned in Empirical Scoring with smina from the CSAR 2011 Benchmarking Exercise". In: *J. Chem. Inf. Model.* 53.8, pp. 1893–1904.

Kopriva, S. (2011). "Nitrogen and Sulfur Metabolism in C_4 Plants". In: *C_4 Photosynthesis and Related CO_2 Concentrating Mechanisms.* Ed. by A. S. Raghavendra and R. F. Sage. Springer Netherlands. Chap. 7, pp. 109–123.

Lawyer, A. L., S. R. Kelley, and J. I. Allen (1987). "Use of pyruvate-phosphate dikinase as a target for herbicide design: analysis of inhibitor specificity". In: *Zeitschrift für Naturforschung C* 42.7-8, pp. 834–836.

Leclerc, S., M. Garnier, R. Hoessel, D. Marko, J. A. Bibb, G. L. Snyder, P. Greengard, J. Biernat, Y.-Z. Wu, E.-M. Mandelkow, G. Eisenbrand, and L. Meijer (2000). "Indirubins inhibit glycogen synthase kinase-3beta and cdk5/p25, two protein kinases involved in abnormal tau phosphorylation in Alzheimer's disease. A property common to most cyclin-dependent kinase inhibitors?" In: *J. Biol. Chem.* 276.1, pp. 251–260.

Lim, K., R. J. Read, C. C. H. Chen, A. Tempczyk, M. Wei, D. Ye, C. Wu, D. Dunaway-Mariano, and O. Herzberg (2007). "Swiveling Domain Mechanism in Pyruvate Phosphate Dikinase". In: *Biochemistry* 46.51, pp. 14845–14853.

Martiny-Baron, G., M. G. Kazanietz, H. Mischak, P. M. Blumberg, G. Kochs, H. Hug, D. Marme, and C. Schächtele (1993). "Selective inhibition of protein kinase C isozymes by the indolocarbazole Gö 6976." In: *J. Biol. Chem.* 268.13, pp. 9194–9197.

Meijer, L., A.-L. Skaltsounis, P. Magiatis, P. Polychronopoulos, M. Knockaert, M. Leost, X. P. Ryan, C. AlinVonica, A. B. R. Dajani, et al. (2003). "GSK-3-selective inhibitors derived from Tyrian purple indirubins". In: *Chem. Biol.* 10.12, pp. 1255–1266.

Minges, A., D. Ciupka, C. Winkler, A. Höppner, H. Gohlke, and G. Groth (2017). "Structural intermediates and directionality of the swiveling motion of Pyruvate Phosphate Dikinase". In: *Sci. Rep.* 7, p. 45389.

Moore, R. and C. C. Black (1979). "Nitrogen Assimilation Pathways in Leaf Mesophyll and Bundle Sheath Cells of C_4 Photosynthesis Plants Formulated from Comparative Studies with *Digitaria sanguinalis* (L.) Scop." In: *Plant Physiol.* 64.2, pp. 309–313.

Motti, C. A., D. G. Bourne, J. N. Burnell, J. R. Doyle, D. S. Haines, C. H. Liptrot, L. E. Llewellyn, S. Ludke, A. Muirhead, and D. M. Tapiolas (2007a). "Screening Marine Fungi for Inhibitors of the C_4 Plant Enzyme Pyruvate Phosphate Dikinase: Unguinol as a Potential Novel Herbicide Candidate". In: *Appl. Environ. Microb.* 73.6, pp. 1921–1927.

Motti, C. A., M.-L. Bourguet-Kondracki, A. Longeon, J. R. Doyle, L. E. Llewellyn, D. M. Tapiolas, and P. Yin (2007b). "Comparison of the Biological Properties of Several Marine Sponge-Derived Sesquiterpenoid Quinones". In: *Molecules* 12.7, pp. 1376–1388.

Nakanishi, T., T. Nakatsu, M. Matsuoka, K. Sakata, and H. Kato (2005). "Crystal Structures of Pyruvate Phosphate Dikinase from Maize Revealed an Alternative Conformation in the Swiveling-Domain Motion". In: *Biochemistry* 44.4, pp. 1136–1144.

Pettersen, E. F., T. D. Goddard, C. C. Huang, G. S. Couch, D. M. Greenblatt, E. C. Meng, and T. E. Ferrin (2004). "UCSF Chimera – A visualization system for exploratory research and analysis". In: *J. Comput. Chem.* 25.13, pp. 1605–1612.

R Core Team (2016). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.

Raghavendra, A. S. and R. F. Sage, eds. (2011). *C_4 Photosynthesis and Related CO_2 Concentrating Mechanisms*. Springer Netherlands.

RDKit: Open-source cheminformatics (2016). http://www.rdkit.org. Version 2016.09.1.

Ritz, C., F. Baty, J. C. Streibig, and D. Gerhard (2015). "Dose-Response Analysis Using R". In: *PLOS ONE* 10.e0146021 (12).

Salahas, G., Y. Manetas, and N. Gavalas (1990). "Assaying for pyruvate, orthophosphate dikinase activity: necessary precautions with phosphoenolpyruvate carboxylase as coupling enzyme". In: *Photosynth. Res.* 24.2, pp. 183–188.

Schrödinger, LLC (2015). *The PyMOL Molecular Graphics System, Version 1.8.*

Shapovalov, M. V. and R. L. Dunbrack (2011). "A Smoothed Backbone-Dependent Rotamer Library for Proteins Derived from Adaptive Kernel Density Estimates and Regressions". In: *Structure* 19.6, pp. 844–858.

Takimura, T., K. Kamata, K. Fukasawa, H. Ohsawa, H. Komatani, T. Yoshizumi, I. Takahashi, H. Kotani, and Y. Iwasawa (2010). "Structures of the PKC-ι kinase domain in its ATP-bound and apo forms reveal defined structures of residues 533textendash551 in the C-terminal tail and their roles in ATP binding". In: *Acta Crystallogr. D.* 66.5, pp. 577–583.

Tanaka, M., S. Sagawa, J.-i. Hoshi, F. Shimoma, I. Matsuda, K. Sakoda, T. Sasase, M. Shindo, and T. Inaba (2004). "Synthesis of anilino-monoindolylmaleimides as potent and selective PKCβ inhibitors". In: *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 14.20, pp. 5171–5174.

Tice, C. M. (2001). "Selecting the right compounds for screening: does Lipinskiś Rule of 5 for pharmaceuticals apply to agrochemicals?" In: *Pest Manag. Sci.* 57.1, pp. 3–16.

Toullec, D., P. Pianetti, H. Coste, P. Bellevergue, T. Grand-Perret, M. Ajakane, V. Baudet, P. Boissin, E. Boursier, and F. Loriolle (1991). "The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C." In: *J. Biol. Chem.* 266.24, pp. 15771–15781.

Trott, O. and A. J. Olson (2009). "AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading". In: *J. Comput. Chem.* 31.2, pp. 455–461.

Wu, C., D. Dunaway-Mariano, and P. S. Mariano (2013). "Design, Synthesis, and Evaluation of Inhibitors of Pyruvate Phosphate Dikinase". In: *J. Org. Chem.* 78.5, pp. 1910–1922.

Zhang, J., P. L. Yang, and N. S. Gray (2009). "Targeting cancer with small molecule kinase inhibitors". In: *Nat. Rev. Cancer* 9 (1), pp. 28–39.

5. Diskussion

Die PPDK wurde seit Ende der 1960er Jahre bereits umfassend biochemisch charakterisiert. In den letzten 20 Jahren wurden diese Erkenntnisse durch dreidimensionale Strukturdaten ergänzt und vervollständigt. Zusätzlich zur Domänenorganisation wurde das mechanistische Modell des *Swiveling-Domain*-Mechanismus etabliert, welcher einen Meilenstein im Verständnis der grundlegenden Funktionsweise der PPDK darstellt und bis heute zu den größten in Proteinen beschriebenen Domänenbewegungen zählt. Weiterhin ungeklärt blieb aber der genaue Ablauf dieses Mechanismus, sowie das Zusammenspiel der PPDK-Monomere im physiologisch funktionellen Homodi- bzw. Homotetramer.

5.1. Strukturelle Intermediate der Nukleotid-Bindedomäne und Teilschritte des *Swiveling-Domain*-Mechanismus

Die PPDKs aus der C_4-Pflanze *F. trinervia* und der C_3-Pflanze *F. pringlei* wurden heterolog in *Escherichia coli* exprimiert, gereinigt und anschließend in Gegenwart des Substrates PEP, sowie des Substratanalogons 2'-Br-dAppNHp kristallisiert. Für den Kristallisationserfolg kritisch hinsichtlich der Streufähigkeit der erhaltenen Proteinkristalle stellte sich neben der Sättigung beider Substratbindetaschen auch die enzymatische Entfernung des Histidin-Tags heraus. Daran zeigt sich die hohe intrinsische Flexibilität der PPDK und ihrer einzelnen Domänen. Insbesondere die CD weist naturgemäß vor dem Hintergrund der von ihr bewerkstelligten Übertragung einer Phosphorylgruppe über eine Distanz von mehr als 40 Å eine enorme Beweglichkeit auf. Zudem durchläuft auch die NBD im Zuge der Substratbindung und -freisetzung eine Öffnungs- bzw. Schließbewegung. Durch weitestgehende Absättigung der Nukleotidbindestelle wird zumindest die Anzahl der möglichen Freiheitsgrade in Bezug auf die NBD reduziert, was sich günstig auf die Fernordnung im Proteinkristall und somit auch auf die Streufähigkeit und zu erreichende Auflösung auswirkt (Hassell et al. 2006; Deller et al. 2016).

Zu Beginn dieser Arbeit ungeklärt war das Zusammenwirken der Domänen untereinander

und damit eingehend die Frage, ob die Bewegung des *Swiveling-Domain*-Mechanismus rein diffusionskontrolliert abläuft, oder ob distinkte Zustände oder Bindungsereignisse eine Konformationsänderung an anderer Stelle der PPDK hervorrufen. Zusätzlich blieb zu klären, ob und wenn ja, über welche Zwischenzustände der CD der *Swiveling-Domain*-Mechanismus abläuft.

5.1.1. Konformationen der Nukleotid-Bindedomäne

Die erste Kristallstruktur der C_4-PPDK (PDB 5JVJ), welche im Rahmen dieser Arbeit gelöst werden konnte, enthält zwei Monomere in der asymmetrischen Einheit ASU, welche das bereits aus bakteriellen PPDKs bekannte physiologisch relevante Dimer repräsentieren (vgl. Kap .2). Es zeigte sich jedoch ein bedeutsamer konformationeller Unterschied zwischen den beiden Monomeren im Bereich der NBD. Die Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung (*Root-mean-square deviation*, RMSD)[1] in diesem Bereich betrug 4,8 Å. Zudem war die Elektronendichte im Bereich der NBD nur bei einem Monomer gut definiert, während beim anderen Monomer die Dichte insbesondere im Bereich der β-Faltblätter ineinander verlief und so eine Rekonstruktion der Struktur nur in Analogie zum besser definierten zweiten Monomer möglich war. Nach Vervollständigung der Struktur zeigte sich, dass die NBD der besser definierten Kette in einer offenen Konformation vorlag und kein Substrat gebunden hatte. Die NBD der schlechter definierte Kette nahm hingegen eine geschlossene Konformation ein und zeigte im Bereich der Nukleotidbindestelle zusätzliche Elektronendichte, welche in Position und Form als indikativ für ein möglicherweise gebundenes Nukleotid interpretiert wurde. Das Schließen der NBD erfolgt durch Rotation der NBD1 (AS 1-111 und 197-243) von 40° um ein Scharnier herum, welches von den Resten 112-115 und 195-200 gebildet wird. Gleichzeitig wird die NBD2 verschoben, um Raum für die Bewegung der NBD1 zu schaffen. Beide Monomere zeigten eine deutliche zusätzliche Dichte im Bereich der PBD, welche als PEP identifiziert wurde. Somit konnten bereits in dieser Struktur zwei konformationell grundlegend unterschiedliche Zustände der PPDK festgehalten werden, wobei

[1] Die Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung (*Root-mean-square deviation*, RMSD) ist ein Maß für den mittleren Abstand zwischen den Atomen von Proteinstrukturen. Sie ist definiert als

$$RMSD = \sqrt{\frac{1}{n}\sum_{i=1}^{n} d_i^2}$$

wobei über n Paare äquivalenter Atome gemittelt wird. d_i ist hierbei der Abstand zwischen zwei Atomen des Paares i (Maiorov und Crippen 1994; Kufareva und Abagyan 2011).

hervorzuheben ist, dass dies im Kontext eines funktionellen Dimers geschehen ist. Dieser Umstand deutet erstmals in Richtung einer gegenseitigen Beeinflussung der Monomere. Eine mögliche Hypothese beinhaltet die Substratbindung- und Freisetzung in alternierenden Bindungsereignissen, wobei die Bindung z.B. von ATP in einem Monomer das Öffnen der NBD und die Freisetzung von Adenosinmonophosphat (AMP) im zweiten Monomer bedingt. Ähnliche Mechanismen mit alternierender Substratbindung und -freisetzung sind von anderen ATP bindenden Proteinen, wie der ATP-Synthase oder der DNA-Helikasen bekannt (Boyer 1993; Hingorani et al. 1997; Korolev et al. 1997).

Als aufschlussreich erwies sich auch eine zweite Kristallstruktur (PDB 5JVL) der C_4-PPDK, welche in Gegenwart der ATP-Analogons 2'-Br-dAppNHp kristallisiert wurde. Die ASU beinhaltete in diesem Fall zwei Dimere der PPDK, deren tetramere Anordnung allerdings nicht die physiologisch relevante Form darstellt. Auffällig auch bei dieser Struktur war die hohe Flexibilität innerhalb der NBD. Während drei Monomere gut definierte Elektronendichte für ihre jeweilige NBD aufwiesen, fehlte diese im Falle des vierten Monomers nahezu vollständig, oder ließ sich nicht zum Verfolgen des Proteinrückgrades nutzen. Die verbleibenden drei NBDs befanden sich alle in einer geschlossenen Konformation, allerdings war der Grad der Schließung geringfügig unterschiedlich. Dies unterstreicht einmal mehr die intrinsische Flexibilität, welche die PPDK ausmacht. Unterschiede zeigten sich ebenso in Bezug auf die CD. Die bislang postulierte und aus *Z. mays*, sowie *C. symbiosum* bekannte Extremkonformation der CD mit Orientierung hin zur PBD (Nakanishi et al. 2005; Lim et al. 2007) weist einen zu großen Abstand des katalytischen Histidinrestes zum in der PBD gebundenen Pyruvat/PEP auf. Zudem ist der Rest auch nicht in Richtung des Substrates orientiert, so dass eine Phosphorylgruppenübertragung nicht plausibel erscheint. Diese aus *Z. mays* und *C. symbiosum* bekannte Konformation findet sich in 5JVL bei einem Monomer (Kette A), während sich das katalytische His456 in zwei weiteren Monomeren (Ketten C und D) in korrektem Abstand und passender Orientierung zum gebundenen PEP innerhalb der PBD befindet, um einen Phosphorylgruppenübertrag zu ermöglichen (vgl. Abb. 2.2a/b). Der Abstand zwischen dem Stickstoffatom $N_{\varepsilon 2}$ des katalytischen Histidins zum angegriffenen Phosphoratom des Substrates PEP beträgt in den Monomeren C und D lediglich 3,3 Å bzw. 3 Å während die Distanz in Monomer A knapp 12,7 Å beträgt. Die notwendige Orientierung der CD, sowie Ausrichtung des katalytischen Histidins war nur in Analogie zum Enzym I des bakteriellen Phosphoenolpyruvat-Phosphotransfersystem (PTS) bekannt (Teplyakov et al. 2006) und konnte für die PPDK anhand der hier gezeigten

Kristallstruktur erstmalig nachgewiesen werden. Diese Struktur stellt zudem die erste veröffentlichte Kristallstruktur einer PPDK mit gebundenem Nukleotid dar. Der Bindungsmodus von Nukleotiden war bisher ausschließlich anhand von Analogien zu anderen Enzymen mit verwandter *ATP-grasp* vorhergesagt worden. Hierbei zeigte sich, dass diese Vorhersagen durchaus zutreffend waren, sich die Bindung von Nukleotiden innerhalb der NBD also nicht von anderen Protein mit *ATP-grasp* unterscheidet. Insgesamt liefern die Strukturen 5JVJ und 5JVL also erstmals ein nahezu vollständiges Bild des Öffnens und Schließens der NBD, sowie der Bindungsmodi der Substrate in beiden Substratbindedomänen.

5.1.2. Teilschritte des *Swiveling-Domain*-Mechanismus

Die dritte aufgeklärte Struktur (PDB 5JVN) stammt von der C_3-Form der PPDK aus *F. pringlei* (vgl. Kap. 3). Hier befindet sich nur ein Monomer in der ASU, allerdings lässt sich das funktionelle Dimer aus der Kristallsymmetrie rekonstruieren. Bereits in einer frühen Phase der Modellierung zeigte sich, dass im Bereich der CD drastische konformationelle Unterschiede zu den vorangehend beschriebenen Strukturen der C_4-PPDK bestehen müssen. Die Lösung des Phasenproblems gelang mittels Molekularen Ersatzes auf Basis der C_4-PPDK-Struktur 5JVL/D nur, wenn ausschließlich die beiden Substratbindedomänen als Vorlage genutzt wurden, nicht aber die CD. Letztere wurde dann im Zuge der weiteren Bearbeitung wiederhergestellt. Wie sich zeigte, befindet sich die CD hier in einer intermediären Position zwischen den beiden Substratbindedomänen. Für eine genauere Charakterisierung dieser Konformation wurde die Orientierung der Helix Nr. 20, an deren Lösungsmittel exponiertem aminoterminalen Ende sich das katalytische His456 befindet, ausgewertet. Hierbei ergab sich, dass die CD von ihrer aus 5JVL bekannten Extremkonformation mit Ausrichtung hin zur PBD, bis zur neu gefundenen intermediären Konformation in etwa die Hälfte der gesamten Rotations-, sowie Translationsbewegung durchläuft. Die CD ist im Vergleich zu ihrer Position nahe der PBD in 5JVL/D um gut 45° in Richtung der NBD rotiert und das katalytische His456 hat bereits eine Distanz von 17 Å zurückgelegt. Die Rotation verläuft entlang einer gedachten Drehachse, welche parallel zu zwei kurzen Linkerhelices verläuft, welche die CD mit der NBD und der PBD verbinden (Abb. 2.3 und 3.1B). Zudem wird diese Konformation der CD nicht durch Kristallkontakte zu symmetrieverwandten Molekülen stabilisiert, sondern ausschließlich durch Kontakte innerhalb derselben Kette. Hierbei erscheinen vor allem eine Salzbrücke zwischen Glu804 und Arg462, sowie hydro-

phobe Bereiche um die Reste Ile864 innerhalb der PBD und Leu378 (CD) von Bedeutung zu sein. Diese Interaktionen wurden über einen Netzwerk basierten Ansatz anhand der vorliegenden Strukturdaten identifiziert. Mit Hilfe der durchgeführten Moleküldynamiksimulationen konnte die beschriebene Salzbrücke ebenfalls verifiziert werden, wurde dort allerdings nicht stabil über längere Zeiträume ausgebildet, sondern wiederholt aufgebrochen und neu geformt. Trotzdem erscheint es denkbar, dass diese Interaktionen bei der zeitweiligen Stabilisierung der intermediären Konformation der CD eine Rolle spielen, indem sie die Rotationsfreiheitsgrade der CD einschränken und einen schrittweise ablaufenden *Swiveling-Domain*-Mechanismus begünstigen. Dieser Umstand unterstreicht die Bedeutung als tatsächliche Zwischenkonformation mit mutmaßlich physiologischer Relevanz im Kontext des *Swiveling-Domain*-Mechanismus. Weiterhin konnte anhand von Moleküldynamiksimulationen gezeigt werden, dass die beschriebene intermediäre Konformation der PPDK entlang eines Transitionspfades zwischen den bekannten Konformationen der PPDK in lokalen Energieminima zu finden ist. Die Bewegung der CD erscheint darüber hinaus mit dem Öffnen und Schließen der NBD gekoppelt zu sein. Der intermediäre Charakter dieser Struktur spiegelt sich außerdem in relativ hohen B-Faktoren im Bereich der CD wider, welche auf eine hohe Flexibilität dieser Domäne hinweisen. Zudem ist die Elektronendichte im Bereich der CD schlechter definiert, als in den übrigen Bereichen des Proteins, was möglicherweise auf multiple, leicht voneinander verschiedene Konformationen der CD hindeutet, welche im Kristall gemittelt zu dem genannten Effekt auf die Elektronendichte führen.

Vervollständigt wird das Bild von der Domänenbewegung der PPDK durch eine Struktur der C_4-Form aus *F. trinervia*, welche in Gegenwart von ADP und Pyruvat kristallisiert wurde (PDB 5LU4, Kap. 3). Die dimere Organisation in der ASU spiegelt nicht das biologisch relevante Dimer wider. Dieses kann allerdings wiederum aus der Kristallsymmetrie generiert werden. Auch hier stellte sich beim Erstellen des molekularen Modells heraus, dass sich die CD in einer Grundlegend anderen Orientierung befindet, als aus den zuvor aufgeklärten Strukturen bekannt. Letztlich zeigte sich, dass die CD im Vergleich zur zuvor diskutierten Struktur 5JVN zusätzlich um eine zweite Achse rotiert, welche die erste Drehachse entlang der Linkerhelices nahezu im rechten Winkel schneidet (Abb. 3.1B). Die CD rotiert somit um etwa 104° aus einer gedachten Ebene durch die Schwerpunkte der Substratbindestellen heraus. Dabei wird Helix 20 mit dem katalytischen His456 an ihrem Ende so positioniert, dass sie nach einer anschließend zu erfolgenden Beugebewegung der CD passgenau in der

Nukleotidbindestelle der NBD zu Liegen kommt, womit die aus CD und *T. brucei* bekannte zur NBD orientierte Konformation zu Stande kommt (PDB 1KBL bzw. 2X0S).

Kombiniert man die gewonnenen Erkenntnisse zur Bewegung der CD, so ergibt sich ein – über die einfache Interpolation zwischen zwei Endzuständen hinausgehendes – differenziertes und detailreiches Modell des *Swiveling-Domain*-Mechanismus (vgl. Abb. 3.1A). Dieser verläuft nicht linear zwischen seinen beiden Endpunkten, sondern ist durch distinkte und isolierbare Zwischenzustände gekennzeichnet, welche durchaus auch funktionelle Relevanz besitzen können. Er reiht sich somit ein in bekannte Bewegungen anderer prominenter Mechanoenzyme, wie der ATP-Synthase oder dem bakteriellen Flagellenmotor, bei welchen ursprünglich ebenfalls von einem nahtlosen, linearen Übergang, ohne isolierbare Zwischenstufen ausgegangen wurde (Sabbert und Junge 1997). In beiden Fällen zeigte sich später, dass diese postulierte Linearität nicht gegeben war sondern im Gegenteil die dann gefundenen Zwischenzustände von großer Relevanz für ein tiefer gehendes Verständnis des zu Grunde liegenden Mechanismus bedeutsam waren (Yasuda et al. 2001; Sowa et al. 2005).

5.2. Entwicklung spezifischer Inhibitoren der Pyruvat-Phosphat Dikinase

Die PPDK spielt, wie eingangs erwähnt, eine bedeutende Rolle im Rahmen der C_4-Photosynthese und wirkt dort als eines von insgesamt drei Enzymen – neben der PEPC und der RuBisCO – geschwindigkeitsbestimmend für den Reaktionsablauf (Furbank et al. 1997; Kubien et al. 2003). Für C_3-Pflanzen ist eine funktionelle PPDK hingegen – unter normalen Wachstums- und Umweltbedingungen – nach heutigem Kenntnisstand weitestgehend irrelevant. Viele bekannte und wirtschaftlich relevante Unkräuter hingegen wie beispielsweise *Amaranthus retroflexus* bedienen sich der C_4-Photosynthese. Gleichzeitig zeigen sich immer häufiger Resistenzen gegen am Markt etablierte Herbizide (Shaner 2014; Yu und Powles 2014). Gegen die PPDK gerichtete Wirkstoffe böten – zumindest im Kontext von Kulturpflanzen mit C_3-Photosynthese wie Weizen oder Reis – eine Möglichkeit, solche C_4-Unkräuter zielgerichtet zu bekämpfen. Eine Diskriminierung der Wirksamkeit zwischen C_3- und C_4-Form wäre hierbei aus den zuvor angeführten Gründen nicht zwingend notwendig. Da in Vertebraten und Insekten keine Homologe zur PPDK bekannt sind, wäre auch eine darüber hinausgehende Beeinflussung der umgebenden Fauna – bei vorausgesetzter hinreichend spezifischer Wirkung gegen die PPDK – weitestgehend ausgeschlossen. Gleichzeitig nutzen einige Protisten und Bakterien die PPDK als primäres oder sekundäres glykolyti-

sches Enzym (vgl. Kap. 1.5.3), was zusätzlich pharmakologische Anwendungsfelder eines PPDK-Inhibitors eröffnet.

Doyle et al. (2005) zeigten, dass Extrakte aus verschiedenen marinen Organismen einen inhibitorischen Effekt auf die PPDK haben. Später konnte von Haines et al. (2005) und Motti et al. (2007) die beobachtete Wirkung der Extrakte auf Substanzen aus der Klasse der Hydroxychinone wie beispielsweise das Benzohydroxychinon Ilimaquinon zurückgeführt werden. Der genaue Wirkmechanismus dieser Substanzen ist, ebenso wie ihre Bindestelle, unbekannt. Zumindest in einigen Fällen konnte ein gemischter Hemmtyp in Bezug auf ATP festgestellt werden, so dass eine Bindung möglicherweise auch in oder nahe der Nukleotidbindestelle der NBD erfolgt. Letztere ist aufgrund etlicher polarer Reste im Bereich des Eingangs zur Nukleotidbindestelle, sowie der sich anschließenden eher hydrophoben Kaverne gut geeignet, um spezifisch über geeignete Inhibitoren addressiert zu werden (Wu et al. 2013). Die Nukleotidbindestelle von *ATP-grasp*-Enzymen wie der PPDK wurde in der Vergangenheit allerdings eher selten bei der Suche nach spezifischen Inhibitoren herangezogen, da im Allgemeinen die Unterschiede zwischen den einzelnen Vertretern an Proteinen mit diesem Strukturmotiv als zu gering und ein möglicher inhibitorischer Effekt als dann nicht spezifisch genug angesehen wurde. Wu et al. (2013) konnten allerdings zeigen, dass die von ihnen identifizierten alkylsubstituierten Flavonderivate durchaus spezifisch auf die PPDK wirken.

Vor diesem Hintergrund erschien es vielversprechend, auch bereits bekannte Kinaseinhibitoren auf ihre Wirksamkeit gegenüber der PPDK hin zu untersuchen. Hierfür wurden insgesamt 80 Verbindungen aus einer kommerziell erhältlichen Bibliothek von Kinaseinhibitoren in einem spektrophotometrischen Aktivitätsassay auf ihre inhibitorischen Eigenschaften in Bezug auf die PPDK aus *F. trinervia* geprüft. Der Aktivitätsassay koppelt hierbei die Umsetzung von Pyruvat zu PEP durch die PPDK mit der Carboxylierung von PEP durch die PEPC zu Malat und dessen NADH-abhängige Reduktion durch eine Malat-Dehydrogenase. Ein Molekül NADH – dessen Verbrauch bei einer Wellenlänge von 340 nm verfolgt wird – entspricht hierbei einem Molekül Pyruvat das durch die PPDK zu PEP umgesetzt wird. Es zeigte sich, dass von den untersuchten 80 Substanzen 22 einen Rückgang der messbaren PPDK-Aktivität auf unter 50 % der Kontrollansätze verursachten, wenn sie in einer Konzentration von 100 µM eingesetzt wurden. Bei gleicher Konzentration lag die Restaktivität bei Einsatz des bereits aus der Literatur als spezifischer PPDK-Inhibitor bekannten Hydroxychinons Ilimaquinon bei mehr als 80 %. Elf der untersuchten Verbindungen führten

sogar zu einer Verminderung der Restaktivität der PPDK auf 30 % oder weniger. Bei sechs Substanzen aus der Gruppe der erstmalig aus *Myxomyceten* isolierten Bisindolylmaleimide (Steglich 1989) war lediglich eine Restaktivität von unter 5 % messbar. Zudem erwiesen sich zwei Indirubinderivate – Indirubin-3'-monoxim und 6-Bromoindirubin-3'-monoxim – als ebenfalls potente Inhibitoren der PPDK mit einer Restaktivität von unter 20 %. Zwei weitere Substanzen – ABT-869 und PP242 – führten zu einer Verringerung der PPDK-Aktivität auf rund ein Viertel der Ursprungsaktivität. Für eine genauere Charakterisierung wurden exemplarisch zwei Bisindolylmaleimide – Bisindolylmaleimid IV (BIM IV) und Go6983 – ausgewählt, zudem die beiden Indirubinderivate, sowie – aufgrund ihrer strukturellen Verschiedenheit – ABT-869 und PP242. Ilimaquinon diente auch hier als Referenz.

Zur Ermittlung der halbmaximalen inhibitorischen Konzentration IC_{50} wurden die genannten sieben Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen zwischen 0 µM und 300 µM vermessen. Die Ergebnisse dieser Konzentrationsreihe spiegelten den Trend aus dem initialen Screen wider, bei welchem die Bisindolylmaleimide den stärksten inhibitorischen Effekt zeigten, gefolgt von den beiden Indirubinderivaten. Tatsächlich handelt es sich bei BIM IV und Go6983 um zwei der bisher wirksamsten beschriebenen Inhibitoren der PPDK. Der IC_{50} von BIM IV beträgt (1,1 ± 0,2) µM, derjenige von Go6983 (1,5 ± 0,6) µM. Der inhibitorische Effekt von Indirubin-3'-monoxim und 6-Bromoindirubin-3'-monoxim war um etwa eine Größenordnung geringer, die IC_{50}-Werte liegen bei (7,0 ± 0,7) µM bzw. (11,5 ± 1,8) µM. Als nochmals weniger wirksam erwiesen sich ABT-869 und PP242 mit einem IC_{50} von (13,6 ± 3,3) µM und (20,6 ± 7,1) µM (vgl. Abb. 4.2). Der zu Vergleichszwecken herangezogene Inhibitor Ilimaquinon wurde von Haines et al. (2005) mit einem IC_{50} von (292 ± 23) µM für die PPDK aus *Z. mays* beschrieben. Er liegt damit in der Wirksamkeit somit um mehr als den Faktor 100 unterhalb der untersuchten Bisindolylmaleimide. Um auszuschließen, dass der beobachtete inhibitorische Effekt auf eine Beeinflussung der nachgeschalteten Enzyme PEPC und NADH-MDH und nicht durch eine Inhibierung der PPDK selbst hervorgerufen werden, wurde eine Kontrollreaktion ohne PPDK durchgeführt, bei der die Reaktion durch Zugabe von Pyruvat direkt auf der Stufe der PEPC gestartet wurde. Es zeigte sich allerdings mit Ausnahme des 6-Bromoindirubin-3'-monoxims kein signifikanter Effekt auf diese beiden Testbestandtteile und selbst dieser wäre zu gering, als dass er den zuvor beobachteten Aktivitätsrückgang hinreichend erklären könnte, ohne dass eine Beeinflussung der PPDK vorliegt.

Interessant war die Beobachtung, dass das Bisindolylmaleimid XI (BIM XI) keinen of-

fensichtlichen Effekt auf die PPDK-Aktivität im primären Screening zeigte, wohl aber alle anderen getesteten Bisindolylmaleimide. Um dies genauer zu untersuchen, wurden die verwendeten Substanzen in die Kristallstruktur der *F. trinervia* PPDK (PDB 5JVL/D) gedockt. Hierbei zeigte sich, dass für alle Bisindolylmaleimide mit experimentell festgestellter inhibitorischer Wirkung ähnliche Bindungsmodi vorhergesagt wurden. Die Bindestelle läge demnach am Eingang der Nukleotidbindetasche im Bereich der Reste Glu324 und Arg95. Wird die Struktur von BIM XI mit den Dockingergebnissen der anderen Bisindolylmaleimide in Deckung gebracht, zeigt sich, dass es aufgrund der an eine der Indolfunktionen kondensierten sperrigen Substituenten zu Kollisionen mit den Resten Glu324 und Arg95 kommt (vgl. Abb. 4.4). Diese würden das beobachtete Fehlen einer inhibitorischen Wirkung des Bisindolylmaleimids XI hinreichend erklären.

Die Bisindolylmaleimide sind bislang hauptsächlich als sehr wirksame Inhibitoren der Proteinkinase C (PKC) bekannt (Toullec et al. 1991; Davis et al. 1992; Hers et al. 1999), inhibieren aber auch in geringerem Maße einige andere Kinasen (Davies et al. 2000). Insofern ist festzuhalten, dass der guten Wirksamkeit der Bisindolylmaleimide in Bezug auf die PPDK eine eingeschränkte Selektivität gegenübersteht. Gleichzeitig zeigt aber das Beispiel des Bisindolylmaleimids XI, dass durch Veränderungen der Substituenten an einer oder beiden Indolgruppen die Interaktion mit der Nukleotidbindetasche beeinflusst werden kann, so dass eine Erhöhung der Spezifität gegenüber der PPDK prinzipiell möglich erscheint. Hieraus kann dann auch eine gesteigerte Selektivität gegenüber der PPDK resultieren, was letztlich bedeutet, dass durch spezifische Anpassung der Bisindolylmaleimide an die PPDK auch ihre Wirksamkeit auf andere Kinase, wie beispielsweise das bisherige Ziel PKC, verringert werden kann.

5.3. Ausblick

Im Verlauf dieser Arbeit konnte das Verständnis des Mechanismus, welcher der Funktionalität der PPDK zu Grunde liegt, mit Hilfe von neuen Kristallstrukturen detailliert erweitert werden. Unbeantwortet bleibt weiterhin die Frage nach der Anordnung der Monomere in dem für pflanzliche PPDKs postulierten Homotetramer. Keine der bislang durchgeführten röntgenkristallographischen Untersuchungen pflanzlicher PPDKs konnte einen Hinweis auf die tetramere Organisation liefern. Möglicherweise handelt es sich bei dem Homotetramer um einen von hoher Dynamik geprägten transienten Zustand, bei welchem sich

die deutlich stabilere Dimere zum Tetramer zusammenlagern. Da die Tetramerisierungsfläche anhand der Erkenntnisse zur Kältelabilität der PPDK und der darin involvierten Aminosäurereste am äußersten C-Terminus verortet wird, ist das Tetramer kristallographisch unter Umständen über die Verwendung einer kältestabilen PPDK – beispielsweise aus *F. brownii* – oder einer entsprechenden Mutante zugänglich. Gleichzeitig böten auch geeignete Quervernetzungsagenzien die Möglichkeit ein solches Tetramer zu stabilisieren und zu kristallisieren.

Nicht vollständig geklärt ist weiterhin die Regulation der PPDK auf mechanistischer Ebene. Zwar liefert die Hypothese einer elektrostatischen Abstoßung des phosphorylierten regulatorischen Threoninrestes von den gleichartig geladenen Substraten Pyruvat und PEP einen plausiblen Erklärungsansatz, allerdings ist dieser bislang nicht durch Strukturdaten validiert worden. Da Substitutionen des genannten Threoninrestes durch Aspartat oder Glutamat experimentell zu einem Effekt, vergleichbar dem der Phosphorylierung führten (vgl. Kap. 1.5.2), könnte der Einsatz dieser Phosphorylierungsmutanten in Kombination mit verschiedenen Substraten zur weiteren Aufklärung der Regulation der PPDK beitragen.

Eine Option zum besseren Verständnis der Dynamik der *Swiveling-Domain*-Mechanismus ist die Untersuchung mittels Förster-Resonanzenergietransfer (FRET) (Förster 1948). Hierbei werden an geeigneten Positionen im Protein zwei Farbstoffe als FRET-Sonden eingebracht. Das Emissionsspektrum des einen Farbstoffes (Donor) überlappt hierbei mit dem Anregungsspektrum des anderen Farbstoffes (Akzeptor), so dass bei räumlicher Nähe der beiden Sonden zueinander und Anregung des Donors eine Energieübertragung und letztlich Emission des Akzeptors beobachtet werden kann. Hieraus können dann Schlüsse auf den Abstand der beiden Sonden zueinander gezogen werden. Mit geeigneten Instrumenten können solche Messungen auch mit hinreichender Zeitauflösung durchgeführt werden, um die Bewegung der CD selbst zu verfolgen. Voraussetzung für ein solches System ist aber die gezielte Markierung der PPDK mit Farbstoffen an definierten Positionen. Eine Möglichkeit hierfür bietet die Nutzung einer tryptophanfreien Mutante, bei der gezielt ein Tryptophan wieder eingeführt wird, und dessen Fluoreszenz zur Anregung eines markierten oder autofluoreszenten Substrates wie beispielsweise Mant-ATP verwendet werden kann. Denkbar ist auch der Einsatz nicht-natürlicher Aminosäuren, wobei sich hierbei die Expressionseffizienz, sowie die ggf. erforderliche chemische Behandlung zur Ausbildung der funktionellen Farbstoffe als große Herausforderung herausstellen können.

Die beiden bislang unbekannten intermediären Konformationen der CD bieten vielfältige

Ansatzmöglichkeiten für weitergehende Untersuchungen. So kann in diesen Strukturen gezielt nach allosterischen Bindetaschen gesucht werden, welche sich ausschließlich in diesen Intermediaten zeigen. Kleine Moleküle, welche gezielt in diesen Taschen binden, könnten durch Blockade der weiteren Bewegung der CD als spezifische Inhibitoren der PPDK fungieren. Letztlich bieten auch die Bisindolylmaleimide und Indirubine, welche als potente PPDK-Inhibitoren erkannt wurden vielfältige Möglichkeiten, um diese optimal an die Nukleotidbindetasche der NBD anzupassen und somit eine erhöhte Spezifität gegenüber der PPDK bei gleichzeitiger Beibehaltung oder Verbesserung der inhibitorischen Effektivität zu erreichen.

Abkürzungen

2PG	2-Phosphoglycolat
3PGA	3-Phosphoglycerat
3PGAK	3-Phosphoglyceratkinase
ADP	Adenosindiphosphat
AK	Adenylatkinase
AMP	Adenosinmonophosphat
AS	Aminosäure
AspAT	Aspartat-Aminotransferase
ASU	Asymmetrische Einheit (*Asymmetric Unit*)
A. thaliana	*Arabidopsis thaliana*
ATP	Adenosintriphosphat
BIM XI	Bisindolylmaleimid XI
BIM IV	Bisindolylmaleimid IV
BS-Zelle	Bündelscheidenzelle
CA	Carboanhydrase
CAM	Crassulaceen-Säurestoffwechsel (*Crassulacean Acid Metabolism*)
CBB	Calvin-Benson-Bassham-Zyklus
CD	Zentraldomäne (*Central Domain*)
C. symbiosum	*Clostridium symbiosum*
E. coli	*Escherichia coli*
F. brownii	*Flaveria brownii*
F. pringlei	*Flaveria pringlei*
FRET	Förster-Resonanzenergietransfer
F. trinervia	*Flaveria trinervia*
GOE	Große Sauerstoffkatastrophe (*Great Oxygenation Event*)
MEM	M-regulatorisches Modul (*M Regulatory Module*)
NAD-ME	NAD-Malatenzym

NADP-MDH	NADP-abhängige Malatdehydrogenase
NADP-ME	NADP-Malatenzym
NBD	Nukleotid-Bindedomäne
O. sativa	*Oryza sativa*
PBD	PEP/Pyruvat-Bindedomäne
PEP	Phosphoenolpyruvat
PEPC	Phosphoenolpyruvat-Carboxylase
PEPCK	Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase
PFK	Phosphofructokinase
P_i	Orthophosphat
PKC	Proteinkinase C
PPDK	Pyruvat-Phosphat Dikinase
PP_i	Pyrophospat
PTS	Phosphoenolpyruvat-Phosphotransfersystem
RMSD	Wurzel der mittleren quadratischen Abweichung (*Root-mean-square deviation*)
PPDK-RP	PPDK regulierendes Protein
RuBisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-carboxylase/oxygenase
RuBP	Ribulose-1,5-bisphosphat
T. brucei	*Trypanosoma brucei*
Z. mays	*Zea mays*

Abbildungsverzeichnis

1.1. Reaktionen der RuBisCO . . . 12
1.2. Schema der C_4-Photosynthese des NADP-ME-Typs . . . 16
1.3. Blattstruktur und C_4-Entwicklung . . . 17
1.4. Modell der C_4-Evolution . . . 18
1.5. Katalysierte Reaktion der PPDK . . . 20
1.6. Domänenorganisation der PPDK . . . 22
1.7. Kältelabilität der PPDK . . . 23
1.8. Regulation der PPDK . . . 24
1.9. PPDK als glykolytisches Enzym . . . 27

2.1. Movement of the PPDK domains . . . 34
2.2. Substrate binding sites of *Ft*PPDK . . . 36
2.3. Stepped movement of the CD in 5JVL and 5JVN . . . 38
2.4. Motions of PPDK . . . 40
2.5. 1D Potential of mean force . . . 42
2.6. 2D Potential of mean force . . . 45
2.7. Topology diagram of PPDK and simplified model of the PPDK mechanism 56
2.8. Quality assessment of PPDK purification . . . 57
2.9. Electron density of PEP binding site in *Ft*PPDK . . . 57
2.10. Principal component analysis on PPDK and reaction coordinates for PMF calculation . . . 58
2.11. Transition pathway for and validation of PMF calculations . . . 59
2.12. Unrestrained MD simulations of PPDK . . . 60
2.13. Stepped movement of the CD in 5JVN and 1KBL . . . 61

3.1. Stereo cartoon representation of PPDK . . . 81
3.2. Schematic model of the CD movement . . . 82

4.1. Mean activity of PPDK at inhibitor concentrations. . . . 95
4.2. Dose response curves of selected inhibitors . . . 98
4.3. Oxygen evolution *in vivo* in the presence of putative PPDK inhibitors. . . . 99
4.4. Docking results of bisindolylmaleimides . . . 101

A.1. Sequenzalignment pETEV-16b-ftppdk und pETEV-16b-fpppdk . . . 139
A.2. Multiples Alignment der Primärstrukturen verschiedener PPDKs. . . . 144
A.3. Plasmidkarte des Vektors pETEV-16b-ftppdk . . . 145

A.4. Plasmidkarte des Vektors pETEV-16b-fpppdk 146

Tabellenverzeichnis

2.1. Data collection and refinement statistics of 5JVJ, 5JVL and 5JVN 37
2.2. Overview of all currently known PPDK structures 62
2.3. Structural comparison of PPDK crystal structures 63
2.4. Unrestrained MD simulations of non-phosphorylated *Ft*PPDK 64

3.1. Data collection and refinement statistics of 5LU4 83

4.1. Structures and IC_{50} values of PPDK inhibitors. 97

Literatur

Anderson, L. E. (1971). „Chloroplast and cytoplasmic enzymes II. Pea leaf triose phosphate isomerases". In: *Biochim. Biophys. Acta* 235.1, S. 237–244.

Ashton, A. R., J. N. Burnell, R. T. Furbank, C. L. Jenkins und M. D. Hatch (1990). „Enzymes of C_4 Photosynthesis". In: *Enzymes of Primary Metabolism*. Hrsg. von P. J. Lea. Bd. 3. Academic Press, S. 39.

Banner, D., A. Bloomer, G. Petsko, D. Phillips, C. Pogson, I. Wilson, P. Corran, A. Furth, J. Milman, R. Offord et al. (1975). „Structure of chicken muscle triose phosphate isomerase determined crystallographically at 2.5 Å resolution: using amino acid sequence data". In: *Nature* 255, S. 609–614.

Bassham, J. A. (2003). „Mapping the carbon reduction cycle: a personal retrospective". In: *Photosynth. Res.* 76.1/3, S. 35–52.

Bassham, J. A., A. A. Benson und M. Calvin (1950). „The Path of Carbon in Photosynthesis VIII. The Role of MalicAcid". In: *J. Biol. Chem.* 2 (185), S. 781–787.

Bauwe, H. (2011). „Photorespiration: The Bridge to C_4 Photosynthesis". In: *C_4 Photosynthesis and Related CO_2 Concentrating Mechanisms*. Hrsg. von A. S. Raghavendra und R. F. Sage. Springer Netherlands. Kap. 6, S. 81–103.

Benson, A. A. (2002). „Following the path of carbon in photosynthesis: a personal story". In: *Photosynth. Res.* 73.1/3, S. 29–49.

Berg, J. M., J. L. Tymoczko, J. Gregory, J. Gatto und L. Stryer (2015). *Biochemistry*. Macmillan Education.

Botha, C. (1992). „Plasmodesmatal distribution, structure and frequency in relation to assimilation in C_3 and C_4 grasses in southern Africa". In: *Planta* 187.3.

Bowes, G., W. Ogren und R. Hageman (1971). „Phosphoglycolate production catalyzed by ribulose diphosphate carboxylase". In: *Biochem. Bioph. Res. Co.* 45.3, S. 716–722.

Boyer, P. D. (1993). „The binding change mechanism for ATP synthase—some probabilities and possibilities". In: *Biochim. Biophys. Acta (BBA)-Bioenergetics* 1140.3, S. 215–250.

Bräutigam, A. und A. P. M. Weber (2011). „Transport Processes: Connecting the Reactions of C_4 Photosynthesis". In: *C_4 Photosynthesis and Related CO_2 Concentrating Mechanisms*. Hrsg. von A. S. Raghavendra und R. F. Sage. Springer Netherlands. Kap. 11, S. 199–215.

Buick, R. (2008). „When did oxygenic photosynthesis evolve?" In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 363 (1504), S. 2731–2743.

Burnell, J. N. (1990). „A comparative study of the cold-sensitivity of pyruvate, P_i dikinase in *Flaveria* species". In: *Plant Cell Physiol.* 31.2, S. 295–297.

Burnell, J. N. (2010). „Cloning and characterization of Escherichia coli DUF299: a bifunctional ADP-dependent kinase - P_i-dependent pyrophosphorylase from bacteria". In: *BMC Biochem.* 11.1, S. 1.

Burnell, J. N. und C. J. Chastain (2006). „Cloning and expression of maize-leaf pyruvate, Pi dikinase regulatory protein gene". In: *Biochem. Bioph. Res. Co.* 345.2, S. 675–680.

Burnell, J. N. und M. D. Hatch (1985). „Regulation of C_4 photosynthesis: Purification and properties of the protein catalyzing ADP-mediated inactivation and P_i-mediated activation of pyruvate, P_i dikinase". In: *Arch. Biochem. Biophys.* 237.2, S. 490–503.

Burnell, J. und M. Hatch (1983). „Dark-light regulation of pyruvate, Pi dikinase in C_4 plants: evidence that the same protein catalyses activation and inactivation". In: *Biochem. Bioph. Res. Co.* 111.1, S. 288–293.

Caemmerer, S. von (1989). „A model of photosynthetic CO_2 assimilation and carbon-isotope discrimination in leaves of certain C_3-C_4 intermediates". In: *Planta* 178.4, S. 463–474.

Canfield, D. (2005). „The early History of Atmospheric Oxygen: Homage to Robert M. Garrels". In: *Annu. Rev. Earth Pl. Sc.* 33.1, S. 1–36.

Cegelski, L. und J. Schaefer (2006). „NMR determination of photorespiration in intact leaves using in vivo $^{13}CO_2$ labeling". In: *J. Magn. Reson.* 178.1, S. 1–10.

Chastain, C. J. (2011). „Structure, Function, and Post-translational Regulation of C_4 Pyruvate Orthophosphate Dikinase". In: *C_4 Photosynthesis and Related CO_2 Concentrating Mechanisms*. Hrsg. von A. S. Raghavendra und R. F. Sage. Springer Netherlands. Kap. 15, S. 301–313.

Chastain, C. J., M. Botschner, G. E. Harrington, B. J. Thompson, S. E. Mills, G. Sarath und R. Chollet (2000). „Further Analysis of Maize C_4 Pyruvate,Orthophosphate Dikinase Phosphorylation by Its Bifunctional Regulatory Protein Using Selective Substitutions of the Regulatory Thr-456 and Catalytic His-458 Residues". In: *Arch. Biochem. Biophys.* 375.1, S. 165–170.

Chastain, C. J. und R. Chollet (2003). „Regulation of pyruvate, orthophosphate dikinase by ADP-/P_i-dependent reversible phosphorylation in C_3 and C_4 plants". In: *Plant Physiol. Bioch.* 41.6-7, S. 523–532.

Chastain, C. J., C. J. Failing, L. Manandhar, M. A. Zimmerman, M. M. Lakner und T. H. T. Nguyen (2011). „Functional evolution of C_4 pyruvate, orthophosphate dikinase". In: *J. Exp. Bot.* 62.9, S. 3083–3091.

Chastain, C. J., J. W. Heck, T. A. Colquhoun, D. G. Voge und X.-Y. Gu (2006). „Posttranslational regulation of pyruvate, orthophosphate dikinase in developing rice (Oryza sativa) seeds". In: *Planta* 224.4, S. 924–934.

Cosenza, L. W., F. Bringaud, T. Baltz und F. M. Vellieux (2002). „The 3.0Å Resolution Crystal Structure of Glycosomal Pyruvate Phosphate Dikinase from *Trypanosoma brucei*". In: *J. Mol. Biol.* 318.5, S. 1417–1432.

Crowe, S. A., L. N. Døssing, N. J. Beukes, M. Bau, S. J. Kruger, R. Frei und D. E. Canfield (2013). „Atmospheric oxygenation three billion years ago". In: *Nature* 501.7468, S. 535–538.

Davies, S. P., H. Reddy, M. Caivano und P. Cohen (2000). „Specificity and mechanism of action of some commonly used protein kinase inhibitors". In: *Biochem. J.* 351.1, S. 95–105.

Davis, P. D., C. H. Hill, G. Lawton, J. S. Nixon, S. E. Wilkinson, S. A. Hurst, E. Keech und S. E. Turner (1992). „Inhibitors of protein kinase C. 1. 2, 3-Bisarylmaleimides". In: *J. Med. Chem.* 35.1, S. 177–184.

Deller, M. C., L. Kong und B. Rupp (2016). „Protein stability: a crystallographertextquotesingles perspective". In: *Acta Crystallogr. F.* 72.2, S. 72–95.

Dennis, D. und S. Blakeley (2000). „Carbohydrate metabolism". In: *Biochemistry and molecular biology of plants*. Hrsg. von J. R. Buchanan BB Gruissem W. American Society of Plant Physiologists, Rockville, MD, S. 630–675.

Dong, X., P. Stothard, I. J. Forsythe und D. S. Wishart (2004). „PlasMapper: a web server for drawing and auto-annotating plasmid maps". In: *Nucleic Acids Res.* 32, W660–W664.

Doyle, J. R., J. N. Burnell, D. S. Haines, L. E. Llewellyn, C. A. Motti und D. M. Tapiolas (2005). „A Rapid Screening Method to Detect Specific Inhibitors of Pyruvate Orthophosphate Dikinase as Leads for C_4 Plant-Selective Herbicides". In: *J. Biomol. Screen.* 10.1, S. 67–75.

Edwards, G. E., H. Nakamoto, J. N. Burnell und M. D. Hatch (1985). „Pyruvate,P_i Dikinase and NADP-Malate Dehydrogenase in C_4 Photosynthesis: Properties and Mechanism of Light/Dark Regulation". In: *Ann. Rev. Plant Physio.* 36.1, S. 255–286.

Edwards, G. E. und E. V. Voznesenskaya (2011). „C_4 Photosynthesis: Kranz Forms and Single-Cell C_4 in Terrestrial Plants". In: *C_4 Photosynthesis and Related CO_2 Concentrating Mechanisms*. Hrsg. von A. S. Raghavendra und R. F. Sage. Springer Netherlands. Kap. 6, S. 29–61.

Efimov, A. V. (1995). „Structural Similarity between Two-layer α/β and β-Proteins". In: *J. Mol. Biol.* 245.4, S. 402–415.

Fawaz, M. V., M. E. Topper und S. M. Firestine (2011). „The ATP-grasp enzymes". In: *Bioorg. Chem.* 39.5-6, S. 185–191.

Förster, T. (1948). „Zwischenmolekulare Energiewanderung und Fluoreszenz". In: *Ann. Phys-Leipzig*. 437.1-2, S. 55–75.

Furbank, R. T., J. A. Chitty, C. L. Jenkins, W. C. Taylor, S. J. Trevanion, S. von Caemmerer und A. R. Ashton (1997). „Genetic Manipulation of Key Photosynthetic Enzymes in the C_4 Plant *Flaveria bidentis*". In: *Aust. J. Plant Physiol.* 24.4, S. 477.

Ghannoum, O., J. R. Evans und S. von Caemmerer (2011). „Nitrogen and Water Use Efficiency of C_4 Plants". In: *C_4 Photosynthesis and Related CO_2 Concentrating Mechanisms*. Hrsg. von A. S. Raghavendra und R. F. Sage. Springer Netherlands. Kap. 6, S. 129–146.

Gowik, U., A. Bräutigam, K. L. Weber, A. P. Weber und P. Westhoff (2011). „Evolution of C_4 Photosynthesis in the Genus *Flaveria*: How Many and Which Genes Does It Take to Make C_4?" In: *The Plant Cell* 23.6, S. 2087–2105.

Gowik, U., J. Burscheidt, M. Akyildiz, U. Schlue, M. Koczor, M. Streubel und P. Westhoff (2004). „cis-Regulatory Elements for Mesophyll-Specific Gene Expression in the C_4 Plant

Flaveria trinervia, the Promoter of the C_4 Phosphoenolpyruvate Carboxylase Gene". In: *The Plant Cell* 16.5, S. 1077–1090.

Gowik, U., S. Schulze, M. Saladié, V. Rolland, S. K. Tanz, P. Westhoff und M. Ludwig (2016). „A MEM1-like motif directs mesophyll cell-specific expression of the gene encoding the C_4 carbonic anhydrase in *Flaveria*". In: *J. Exp. Bot.*

Gowik, U. und P. Westhoff (2011). „C_4-Phosphoenolpyruvate Carboxylase". In: *C_4 Photosynthesis and Related CO_2 Concentrating Mechanisms*. Hrsg. von A. S. Raghavendra und R. F. Sage. Springer Netherlands. Kap. 6, S. 257–272.

Haberlandt, G. (1896). *Physiologische Pflanzenanatomie*. Leipzig: Wilhelm Engelmann.

Haines, D. S., J. N. Burnell, J. R. Doyle, L. E. Llewellyn, C. A. Motti und D. M. Tapiolas (2005). „Translation of in Vitro Inhibition by Marine Natural Products of the C_4 Acid Cycle Enzyme Pyruvate P_i Dikinase to in Vivo C_4 Plant Tissue Death". In: *J. Agr. Food Chem.* 53.10, S. 3856–3862.

Hardie, D. G. (1999). „PLANT PROTEIN SERINE/THREONINE KINASES: Classification and Functions". In: *Annu. Rev. Plant Phys.* 50.1, S. 97–131.

Hassell, A. M., G. An, R. K. Bledsoe, J. M. Bynum, H. L. Carter, S.-J. J. Deng, R. T. Gampe, T. E. Grisard, K. P. Madauss, R. T. Nolte, W. J. Rocque, L. Wang, K. L. Weaver, S. P. Williams, G. B. Wisely, R. Xu und L. M. Shewchuk (2006). „Crystallization of protein-ligand complexes". In: *Acta Crystallogr. Section D.* 63.1, S. 72–79.

Hatch, M. D. und C. R. Slack (1968). „A new enzyme for the interconversion of pyruvate and phosphopyruvate and its role in the C_4 dicarboxylic acid pathway of photosynthesis". In: *Biochem. J.* 106.1, S. 141–146.

Hennen-Bierwagen, T. A., Q. Lin, F. Grimaud, V. Planchot, P. L. Keeling, M. G. James und A. M. Myers (2009). „Proteins from Multiple Metabolic Pathways Associate with Starch Biosynthetic Enzymes in High Molecular Weight Complexes: A Model for Regulation of Carbon Allocation in Maize Amyloplasts". In: *Plant Physiol.* 149.3, S. 1541–1559.

Hers, I., J. M. Tavaré und R. M. Denton (1999). „The protein kinase C inhibitors bisindolylmaleimide I (GF 109203x) and IX (Ro 31-8220) are potent inhibitors of glycogen synthase kinase-3 activity". In: *FEBS Lett.* 460.3, S. 433–436.

Herzberg, O., C. C. Chen, G. Kapadia, M. McGuire, L. J. Carroll, S. J. Noh und D. Dunaway-Mariano (1996). „Swiveling-domain mechanism for enzymatic phosphotransfer between remote reaction sites." In: *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 93.7, S. 2652–2657.

Herzberg, O., C. C. H. Chen, S. Liu, A. Tempczyk, A. Howard, M. Wei, D. Ye und D. Dunaway-Mariano (2002). „Pyruvate site of pyruvate phosphate dikinase: crystal structure of the enzyme-phosphonopyruvate complex, and mutant analysis". In: *Biochemistry* 41.3, S. 780–787.

Hingorani, M. M., M. T. Washington, K. C. Moore und S. S. Patel (1997). „The dTTPase mechanism of T7 DNA helicase resembles the binding change mechanism of the F1-ATPase". In: *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 94.10, S. 5012–5017.

Holland, H. D. (2006). „The oxygenation of the atmosphere and oceans". In: *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361.1470, S. 903–915.

Huang, S., T. D. Colmer und A. H. Millar (2008). „Does anoxia tolerance involve altering the energy currency towards PPi?" In: *Trends Plant Sci.* 13.5, S. 221–227.

Jenkins, C. und M. Hatch (1985). „Properties and reaction mechanism of C_4 leaf pyruvate,P_i dikinase". In: *Arch. Biochem. Biophys.* 239.1, S. 53–62.

Jiang, L., Y.-b. Chen, J. Zheng, Z. Chen, Y. Liu, Y. Tao, W. Wu, Z. Chen und B.-c. Wang (2016). „Structural Basis of Reversible Phosphorylation by Maize Pyruvate Orthophosphate Dikinase Regulatory Protein". In: *Plant Physiol.* 170.2, S. 732–741.

Kang, H.-G., S. Park, M. Matsuoka und G. An (2005). „White-core endosperm *floury endosperm-4* in rice is generated by knockout mutations in the C_4-type pyruvate orthophosphate dikinase gene (*OsPPDKB*)". In: *The Plant Journal* 42.6, S. 901–911.

Korolev, S., J. Hsieh, G. H. Gauss, T. M. Lohman und G. Waksman (1997). „Major Domain Swiveling Revealed by the Crystal Structures of Complexes of *E. coli* Rep Helicase Bound to Single-Stranded DNA and ADP". In: *Cell* 90.4, S. 635–647.

Ku, M. S. B., J. Wu, Z. Dai, R. A. Scott, C. Chu und G. E. Edwards (1991). „Photosynthetic and Photorespiratory Characteristics of *Flaveria* Species". In: *Plant Physiol.* 96.2, S. 518–528.

Kubien, D. S., S. von Caemmerer, R. T. Furbank und R. F. Sage (2003). „C_4 photosynthesis at low temperature. A study using transgenic plants with reduced amounts of Rubisco". In: *Plant Physiol.* 132.3, S. 1577–1585.

Kufareva, I. und R. Abagyan (2011). „Methods of Protein Structure Comparison". In: *Methods in Molecular Biology*. Springer Nature, S. 231–257.

Lim, K., R. J. Read, C. C. H. Chen, A. Tempczyk, M. Wei, D. Ye, C. Wu, D. Dunaway-Mariano und O. Herzberg (2007). „Swiveling Domain Mechanism in Pyruvate Phosphate Dikinase". In: *Biochemistry* 46.51, S. 14845–14853.

Lundqvist, T. und G. Schneider (1991). „Crystal structure of activated ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase complexed with its substrate, ribulose-1,5-bisphosphate." In: *J. Biol. Chem.* 266.19, S. 12604–12611.

Luo, G., S. Ono, N. J. Beukes, D. T. Wang, S. Xie und R. E. Summons (2016). „Rapid oxygenation of Earths atmosphere 2.33 billion years ago". In: *Sci. Adv.* 2.5, e1600134–e1600134.

Maiorov, V. N. und G. M. Crippen (1994). „Significance of Root-Mean-Square Deviation in Comparing Three-dimensional Structures of Globular Proteins". In: *J. Mol. Biol.* 235.2, S. 625–634.

Mechin, V., C. Thevenot, M. L. Guilloux, J.-L. Prioul und C. Damerval (2007). „Developmental Analysis of Maize Endosperm Proteome Suggests a Pivotal Role for Pyruvate Orthophosphate Dikinase". In: *Plant Physiol.* 143.3, S. 1203–1219.

Mertens, E. (1993). „ATP versus pyrophosphate: glycolysis revisited in parasitic protists". In: *Parasitol. Today* 9.4, S. 122–126.

Miziorko, H. M. und G. H. Lorimer (1983). „Ribulose-1,5-Bisphosphate Carboxylase-Oxygenase". In: *Annu. Rev. Biochem.* 52.1, S. 507–535.

Monson, R. K., B. d. Moore, M. S. B. Ku und G. E. Edwards (1986). „Co-function of C_3-and C_4-photosynthetic pathways in C_3, C_4 and C_3-C_4 intermediate *Flaveria* species". In: *Planta* 168.4, S. 493–502.

Moons, A., R. Valcke, M. Van und Montagu (1998). „Low-oxygen stress and water deficit induce cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK) expression in roots of rice, a C_3 plant". In: *The Plant Journal* 15.1, S. 89–98.

Motti, C. A., D. G. Bourne, J. N. Burnell, J. R. Doyle, D. S. Haines, C. H. Liptrot, L. E. Llewellyn, S. Ludke, A. Muirhead und D. M. Tapiolas (2007). „Screening Marine Fungi for Inhibitors of the C_4 Plant Enzyme Pyruvate Phosphate Dikinase: Unguinol as a Potential Novel Herbicide Candidate". In: *Appl. Environ. Microb.* 73.6, S. 1921–1927.

Muhaidat, R., T. L. Sage, M. W. Frohlich, N. G. Dengler und R. F. Sage (2011). „Characterization of C_3-C_4 intermediate species in the genus *Heliotropium* L. (Boraginaceae): anatomy, ultrastructure and enzyme activity". In: *Plant, Cell & Environment* 34.10, S. 1723–1736.

Nakamoto, H. (1990). „Regulation of Pyruvate, Orthophosphate Dikinase From Maize Leaves. Magnesium-dependent Dimer-tetramer Interconversion". In: *Current Research in Photosynthesis*. Springer, S. 2977–2980.

Nakanishi, T., T. Nakatsu, M. Matsuoka, K. Sakata und H. Kato (2005). „Crystal Structures of Pyruvate Phosphate Dikinase from Maize Revealed an Alternative Conformation in the Swiveling-Domain Motion". In: *Biochemistry* 44.4, S. 1136–1144.

Needleman, S. B. und C. D. Wunsch (1970). „A general method applicable to the search for similarities in the amino acid sequence of two proteins". In: *J. Mol. Biol.* 48.3, S. 443–453.

Nguyen, G. T. T., G. Erlenkamp, O. Jäck, A. Küberl, M. Bott, F. Fiorani, H. Gohlke und G. Groth (2016). „Chalcone-based Selective Inhibitors of a C_4 Plant Key Enzyme as Novel Potential Herbicides". In: *Sci. Rep.* 6, S. 27333.

Notredame, C., D. G. Higgins und J. Heringa (2000). „T-Coffee: a novel method for fast and accurate multiple sequence alignment". In: *J. Mol. Biol.* 302.1, S. 205–217.

Ohta, S., S. Usami, J. Ueki, T. Kumashiro, T. Komari und J. N. Burnell (1996). „Identification of the amino acid residues responsible for cold tolerance in *Flaveria brownii* pyruvate,orthophosphate dikinase". In: *FEBS Lett.* 396.2-3, S. 152–156.

Paulus, J. K., D. Schlieper und G. Groth (2013). „Greater efficiency of photosynthetic carbon fixation due to single amino-acid substitution". In: *Nature Communications* 4, S. 1518.

Raghavendra, A. S. und R. F. Sage, Hrsg. (2011). *C_4 Photosynthesis and Related CO_2 Concentrating Mechanisms*. Springer Netherlands.

Rice, P., I. Longden und A. Bleasby (2000). *EMBOSS: the European molecular biology open software suite*.

Sabbert, D. und W. Junge (1997). „Stepped versus continuous rotatory motors at the molecular scale". In: *P. Natl. Acad. Sci. USA*. 94.6, S. 2312–2317.

Sage, R. F. (2004). „The evolution of C_4 photosynthesis". In: *New Phytol.* 161.2, S. 341–370.

Sage, R. F. (2016). „A portrait of the C_4 photosynthetic family on the 50^{th} anniversary of its discovery: species number, evolutionary lineages, and Hall of Fame". In: *J. Exp. Bot.* 67.14, S. 4039–4056.

Sage, R. F., T. L. Sage und F. Kocacinar (2012). „Photorespiration and the Evolution of C_4 Photosynthesis". In: *Annu. Rev. Plant Biol.* 63.1, S. 19–47.

Shaner, D. L. (2014). „Lessons Learned From the History of Herbicide Resistance". In: *Weed Sci.* 62.2, S. 427–431.

Sheen, J. (1991). „Molecular Mechanisms Underlying the Differential Expression of Maize Pyruvate, Orthophosphate Dikinase Genes". In: *The Plant Cell* 3.3, S. 225–245.

Shirahashi, K., S. Hayakawa und T. Sugiyama (1978). „Cold Lability of Pyruvate, Orthophosphate Dikinase in the Maize Leaf". In: *Plant Physiol.* 62.5, S. 826–830.

Smith, R. D. und J. C. Walker (1996). „Plant Protein Phosphatases". In: *Annu. Rev. Plant Phys.* 47.1, S. 101–125.

Sowa, Y., A. D. Rowe, M. C. Leake, T. Yakushi, M. Homma, A. Ishijima und R. M. Berry (2005). „Direct observation of steps in rotation of the bacterial flagellar motor". In: *Nature* 437.7060, S. 916–919.

Steglich, W. (1989). „Slime moulds (Myxomycetes) as a source of new biologically active metabolites". In: *Pure Appl. Chem.* 61.3.

Stitt, M. (1990). „Fructose-2,6-Bisphosphate as a Regulatory Molecule in Plants". In: *Annu. Rev. Plant Phys.* 41.1, S. 153–185.

Sugiyama, T. (1973). „Purification, molecular, and catalytic properties of pyruvate phosphate dikinase from the maize leaf". In: *Biochemistry* 12.15, S. 2862–2868.

Taylor, L., A. Nunes-Nesi, K. Parsley, A. Leiss, G. Leach, S. Coates, A. Wingler, A. R. Fernie und J. M. Hibberd (2010). „Cytosolic pyruvate,orthophosphate dikinase functions in nitrogen remobilization during leaf senescence and limits individual seed growth and nitrogen content". In: *The Plant Journal* 62.4, S. 641–652.

Teplyakov, A., K. Lim, P.-P. Zhu, G. Kapadia, C. C. H. Chen, J. Schwartz, A. Howard, P. T. Reddy, A. Peterkofsky und O. Herzberg (2006). „Structure of phosphorylated enzyme I, the phosphoenolpyruvate:sugar phosphotransferase system sugar translocation signal protein". In: *P. Natl. Acad. Sci. USA.* 103.44, S. 16218–16223.

Toullec, D., P. Pianetti, H. Coste, P. Bellevergue, T. Grand-Perret, M. Ajakane, V. Baudet, P. Boissin, E. Boursier und F. Loriolle (1991). „The bisindolylmaleimide GF 109203X is a potent and selective inhibitor of protein kinase C." In: *J. Biol. Chem.* 266.24, S. 15771–15781.

Usami, S., S. Ohta, T. Komari und J. N. Burnell (1995). „Cold stability of pyruvate, orthophosphate dikinase of *Flaveria brownii*". In: *Plant Mol. Biol.* 27.5, S. 969–980.

Vogan, P. J. und R. F. Sage (2011). „Effects of low atmospheric CO_2 and elevated temperature during growth on the gas exchange responses of C_3, C_3-C_4 intermediate, and C_4 species from three evolutionary lineages of C_4 photosynthesis". In: *Oecologia* 169.2, S. 341–352.

Voznesenskaya, E. V., V. R. Franceschi, O. Kiirats, E. G. Artyusheva, H. Freitag und G. E. Edwards (2002). „Proof of C_4 photosynthesis without Kranz anatomy in *Bienertia cycloptera* (Chenopodiaceae)“. In: *The Plant Journal* 31.5, S. 649–662.

Voznesenskaya, E. V., V. R. Franceschi, O. Kiirats, H. Freitag und G. E. Edwards (2001). „Kranz anatomy is not essential for terrestrial C_4 plant photosynthesis“. In: *Nature* 414.6863, S. 543–546.

Wang, H., J. R. Falck, T. M. T. Hall und S. B. Shears (2011). „Structural basis for an inositol pyrophosphate kinase surmounting phosphate crowding“. In: *Nat. Chem. Biol.* 8.1, S. 111–116.

Wedding, R. T., M. K. Black und C. R. Meyer (1990). „Inhibition of Phosphoenolpyruvate Carboxylase by Malate“. In: *Plant Physiol.* 92.2, S. 456–461.

Wu, C., D. Dunaway-Mariano und P. S. Mariano (2013). „Design, Synthesis, and Evaluation of Inhibitors of Pyruvate Phosphate Dikinase“. In: *J. Org. Chem.* 78.5, S. 1910–1922.

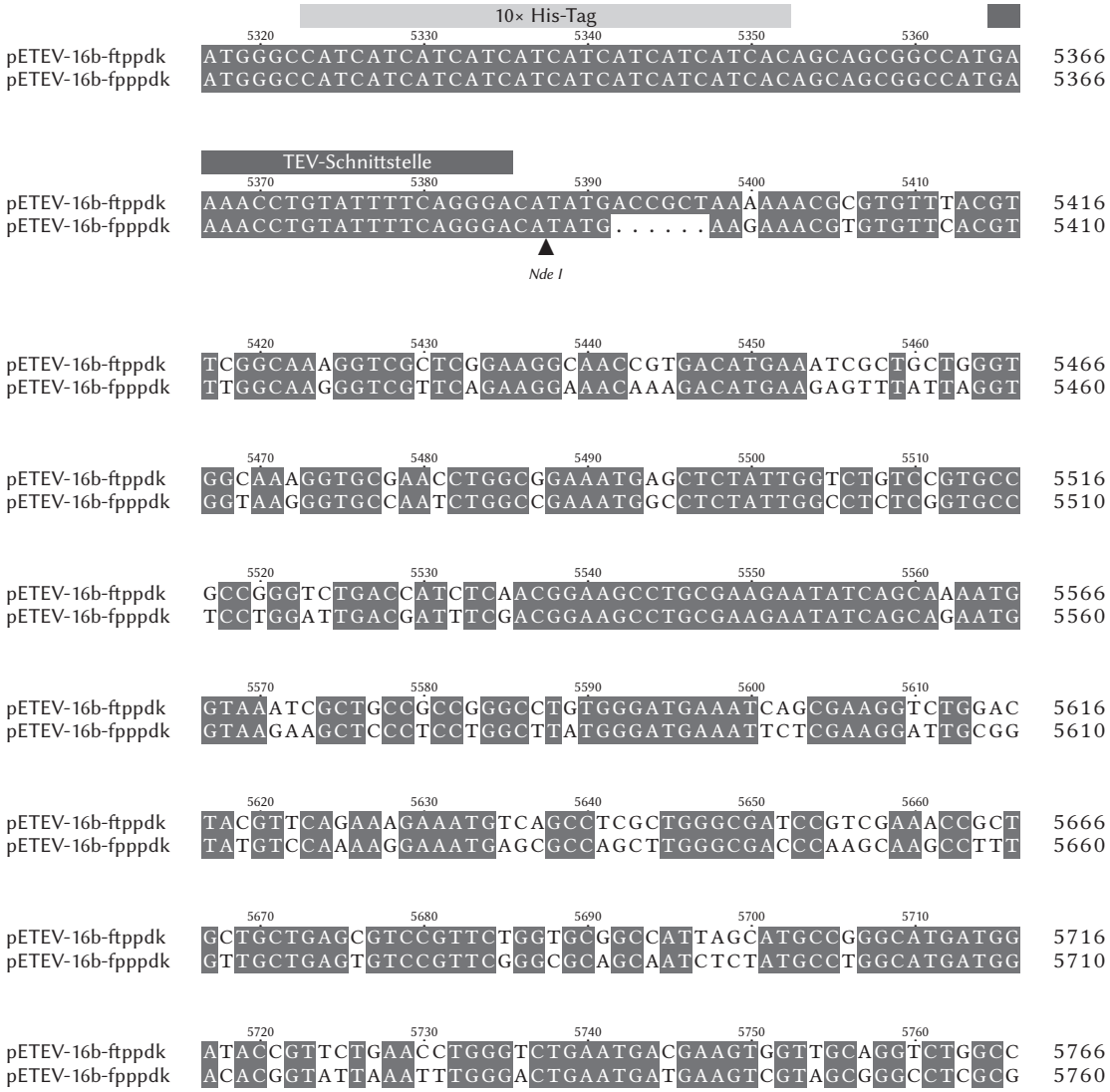
Yamaguchi, H., H. Kato, Y. Hata, T. Nishioka, A. Kimura, J. Oda und Y. Katsube (1993). „Three-dimensional Structure of the Glutathione Synthetase from Escherichia coli B at 2.0 Å Resolution“. In: *J. Mol. Biol.* 229.4, S. 1083–1100.

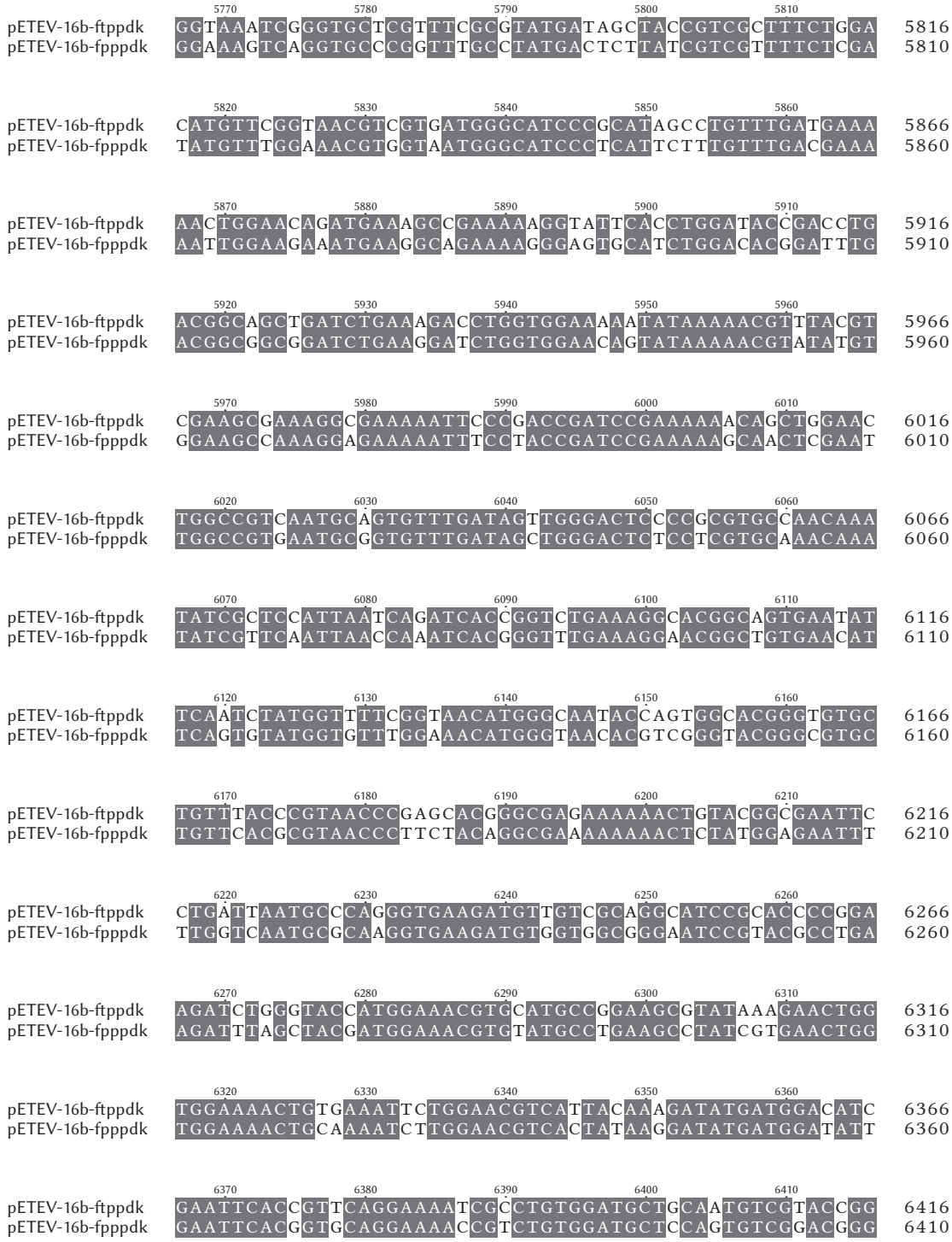
Yasuda, R., H. Noji, M. Yoshida, K. Kinosita und H. Itoh (2001). „Resolution of distinct rotational substeps by submillisecond kinetic analysis of F1-ATPase“. In: *Nature* 410.6831, S. 898–904.

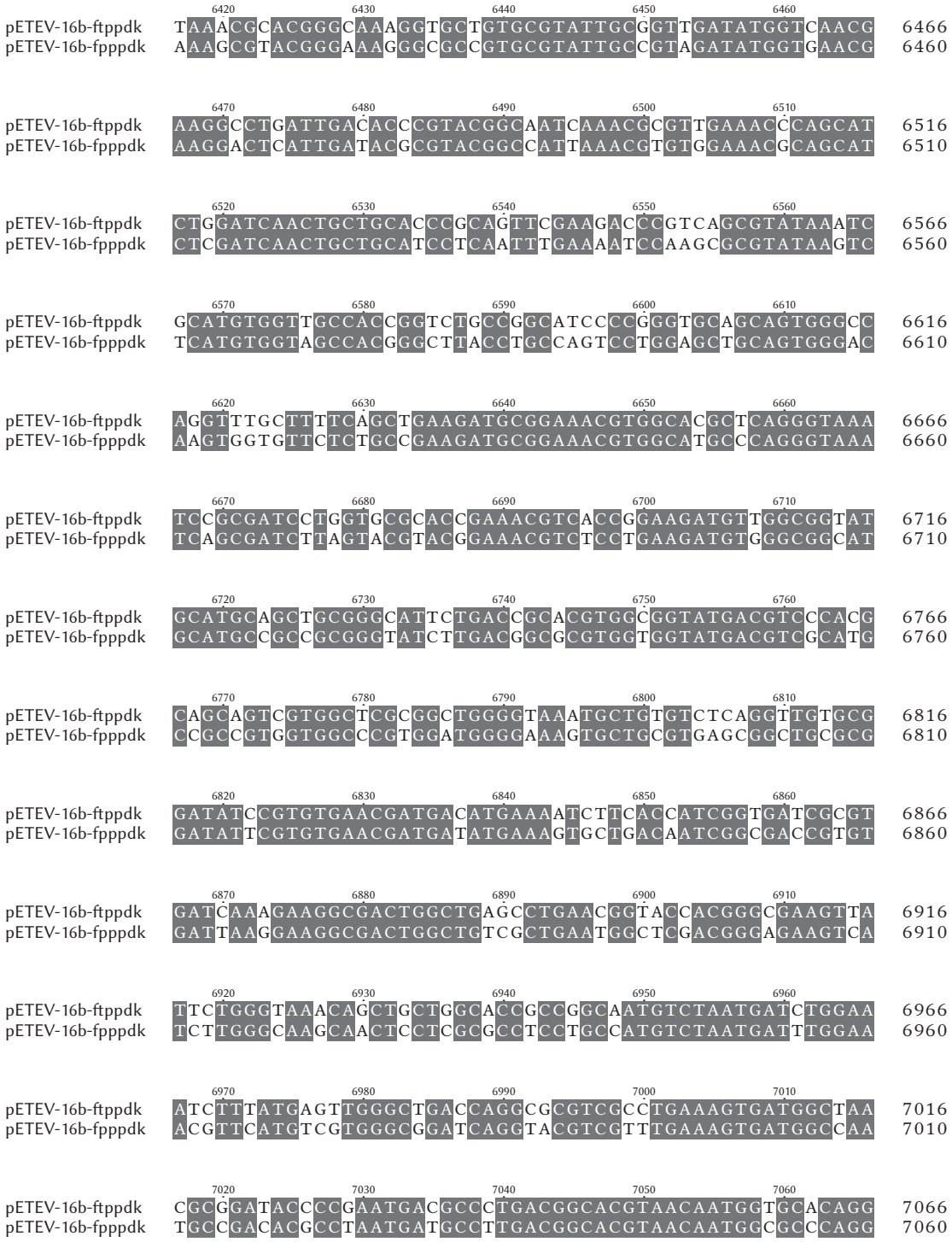
Yu, Q. und S. Powles (2014). „Metabolism-based herbicide resistance and cross-resistance in crop weeds: a threat to herbicide sustainability and global crop production“. In: *Plant Physiol.* 166.3, S. 1106–1118.

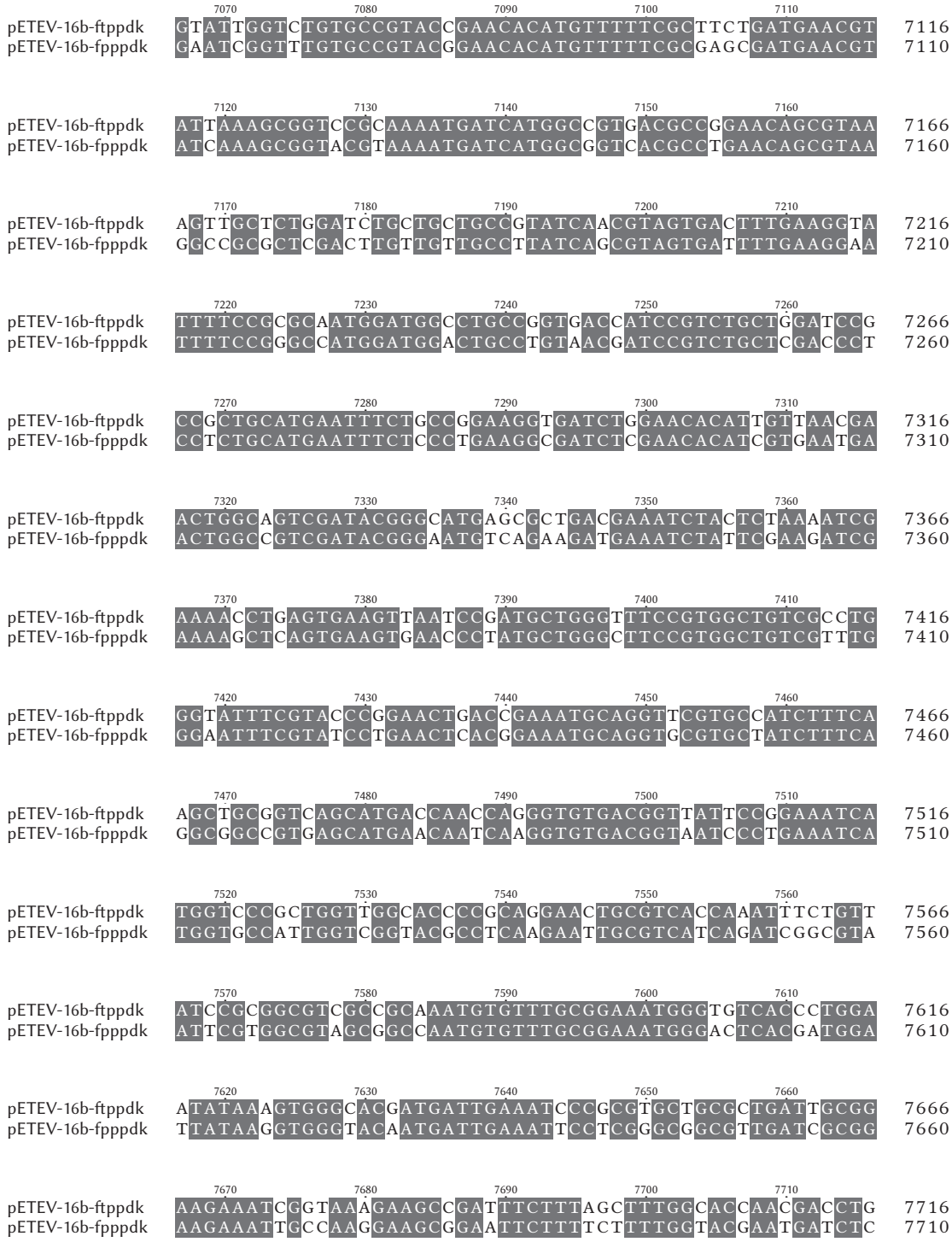
A. Anhang

A.1. Nuklein- und Aminosäuresequenzen




5770 5780 5790 5800 5810
pETEV-16b-ftppdk GGTAAATCGGGTGCTCGTTTCGCGTATGATAGCTACCGTCGCTTTCTGGA 5816
pETEV-16b-fpppdk GGAAAGTCAGGTGCCCGGTTTGCCTATGACTCTTATCGTCGTTTTCTCGA 5810
5820 5830 5840 5850 5860
pETEV-16b-ftppdk CATGTTCGGTAACGTCGTGATGGGCATCCCGCATAGCCTGTTTGATGAAA 5866
pETEV-16b-fpppdk TATGTTTGGAAACGTGGTAATGGGCATCCCTCATTCTTTGTTTGACGAAA 5860
5870 5880 5890 5900 5910
pETEV-16b-ftppdk AACTGGAACAGATGAAAGCCGAAAAAGGTATTCACCTGGATACCGACCTG 5916
pETEV-16b-fpppdk AATTGGAAGAAATGAAGGCAGAAAAGGGAGTGCATCTGGACACGGATTTG 5910
5920 5930 5940 5950 5960
pETEV-16b-ftppdk ACGGCAGCTGATCTGAAAGACCTGGTGGAAAAATATAAAAACGTTTACGT 5966
pETEV-16b-fpppdk ACGGCGGCGGATCTGAAGGATCTGGTGGAACAGTATAAAAACGTATATGT 5960
5970 5980 5990 6000 6010
pETEV-16b-ftppdk CGAAGCGAAAGGCGAAAAATTCCCGACCGATCCGAAAAAACAGCTGGAAC 6016
pETEV-16b-fpppdk GGAAGCCAAAGGAGAAAAATTTCCTACCGATCCGAAAAAGCAACTCGAAT 6010
6020 6030 6040 6050 6060
pETEV-16b-ftppdk TGGCCGTCAATGCAGTGTTTGATAGTTGGGACTCCCGCGTGCCAACAAA 6066
pETEV-16b-fpppdk TGGCCGTGAATGCGGTGTTTGATAGCTGGGACTCTCCTCGTGCAAACAAA 6060
6070 6080 6090 6100 6110
pETEV-16b-ftppdk TATCGCTCCATTAATCAGATCACCGGTCTGAAAGGCACGGCAGTGAATAT 6116
pETEV-16b-fpppdk TATCGTTCAATTAACCAAATCACGGGTTTGAAAGGAACGGCTGTGAACAT 6110
6120 6130 6140 6150 6160
pETEV-16b-ftppdk TCAATCTATGGTTTTCGGTAACATGGGCAATACCAGTGGCACGGGTGTGC 6166
pETEV-16b-fpppdk TCAGTGTATGGTGTTTGGAAACATGGGTAACACGTCGGGTACGGGCGTGC 6160
6170 6180 6190 6200 6210
pETEV-16b-ftppdk TGTTTACCCGTAACCCGAGCACGGGCGAGAAAAAACTGTACGGCGAATTC 6216
pETEV-16b-fpppdk TGTTCACGCGTAACCCTTCTACAGGCGAAAAAAAACTCTATGGAGAATTT 6210
6220 6230 6240 6250 6260
pETEV-16b-ftppdk CTGATTAATGCCCAGGGTGAAGATGTTGTCGCAGGCATCCGCACCCGGA 6266
pETEV-16b-fpppdk TTGGTCAATGGGCAAGGTGAAGATGTGGTGGCGGGAATCCGTACGCCTGA 6260
6270 6280 6290 6300 6310
pETEV-16b-ftppdk AGATCTGGGTACCATGGAAACGTGCATGCCGGAAGCGTATAAAGAACTGG 6316
pETEV-16b-fpppdk AGATTTAGCTACGATGGAAACGTGTATGCCTGAAGCCTATCGTGAACTGG 6310
6320 6330 6340 6350 6360
pETEV-16b-ftppdk TGGAAAACTGTGAAATTCTGGAACGTCATTACAAAGATATGATGGACATC 6366
pETEV-16b-fpppdk TGGAAAACTGCAAAATCTTGGAACGTCACTATAAGGATATGATGGATATT 6360
6370 6380 6390 6400 6410
pETEV-16b-ftppdk GAATTCACCGTTCAGGAAAATCGCCTGTGGATGCTGCAATGTCGTACCGG 6416
pETEV-16b-fpppdk GAATTCACGGTGCAGGAAAACCGTCTGTGGATGCTCCAGTGTCGGACGGG 6410


6420 6430 6440 6450 6460
pETEV-16b-ftppdk TAAACGCACGGGCAAAGGTGCTGTGCGTATTGCGGTTGATATGGTCAACG 6466
pETEV-16b-fpppdk AAAGCGTACGGGAAAGGGCGCCGTGCGTATTGCCGTAGATATGGTGAACG 6460
6470 6480 6490 6500 6510
pETEV-16b-ftppdk AAGGCCTGATTGACACCCGTACGGCAATCAAACGCGTTGAAACCCAGCAT 6516
pETEV-16b-fpppdk AAGGACTCATTGATACGCGTACGGCCATTAAACGTGTGGAAACGCAGCAT 6510
6520 6530 6540 6550 6560
pETEV-16b-ftppdk CTGGATCAACTGCTGCACCCGCAGTTCGAAGACCCGTCAGCGTATAAATC 6566
pETEV-16b-fpppdk CTCGATCAACTGCTGCATCCTCAATTTGAAAATCCAAGCGCGTATAAGTC 6560
6570 6580 6590 6600 6610
pETEV-16b-ftppdk GCATGTGGTTGCCACCGGTCTGCCGGCATCCCCGGGTGCAGCAGTGGGCC 6616
pETEV-16b-fpppdk TCATGTGGTAGCCACGGGCTTACCTGCCAGTCCTGGAGCTGCAGTGGGAC 6610
6620 6630 6640 6650 6660
pETEV-16b-ftppdk AGGTTTGCTTTTCAGCTGAAGATGCGGAAACGTGGCACGCTCAGGGTAAA 6666
pETEV-16b-fpppdk AAGTGGTGTTCTCTGCCGAAGATGCGGAAACGTGGCATGCCCAGGGTAAA 6660
6670 6680 6690 6700 6710
pETEV-16b-ftppdk TCCGCGATCCTGGTGCGCACCGAAACGTCACCGGAAGATGTTGGCGGTAT 6716
pETEV-16b-fpppdk TCAGCGATCTTAGTACGTACGGAAACGTCTCCTGAAGATGTGGGCGGCAT 6710
6720 6730 6740 6750 6760
pETEV-16b-ftppdk GCATGCAGCTGCGGGCATTCTGACCGCACGTGGCGGTATGACGTCCCACG 6766
pETEV-16b-fpppdk GCATGCCGCCGCGGGTATCTTGACGGCGCGTGGTGGTATGACGTCGCATG 6760
6770 6780 6790 6800 6810
pETEV-16b-ftppdk CAGCAGTCGTGGCTCGCGGCTGGGGTAAATGCTGTGTCTCAGGTTGTGCG 6816
pETEV-16b-fpppdk CCGCCGTGGTGGCCCGTGGATGGGGAAAGTGCTGCGTGAGCGGCTGCGCG 6810
6820 6830 6840 6850 6860
pETEV-16b-ftppdk GATATCCGTGTGAACGATGACATGAAAATCTTCACCATCGGTGATCGCGT 6866
pETEV-16b-fpppdk GATATTCGTGTGAACGATGATATGAAAGTGCTGACAATCGGCGACCGTGT 6860
6870 6880 6890 6900 6910
pETEV-16b-ftppdk GATCAAAGAAGGCGACTGGCTGAGCCTGAACGGTACCACGGGCGAAGTTA 6916
pETEV-16b-fpppdk GATTAAGGAAGGCGACTGGCTGTCGCTGAATGGCTCGACGGGAGAAGTCA 6910
6920 6930 6940 6950 6960
pETEV-16b-ftppdk TTCTGGGTAAACAGCTGCTGGCACCGCCGGCAATGTCTAATGATCTGGAA 6966
pETEV-16b-fpppdk TCTTGGGCAAGCAACTCCTCGCGCCTCCTGCCATGTCTAATGATTTGGAA 6960
6970 6980 6990 7000 7010
pETEV-16b-ftppdk ATCTTTATGAGTTGGGCTGACCAGGCGCGTCGCCTGAAAGTGATGGCTAA 7016
pETEV-16b-fpppdk ACGTTCATGTCGTGGGCGGATCAGGTACGTCGTTTGAAAGTGATGGCCAA 7010
7020 7030 7040 7050 7060
pETEV-16b-ftppdk CGCGGATACCCCGAATGACGCCCTGACGGCACGTAACAATGGTGCACAGG 7066
pETEV-16b-fpppdk TGCCGACACGCCTAATGATGCCTTGACGGCACGTAACAATGGCGCCCAGG 7060


7070 7080 7090 7100 7110
pETEV-16b-ftppdk GTATTGGTCTGTGCCGTACCGAACACATGTTTTTCGCTTCTGATGAACGT 7116
pETEV-16b-fpppdk GAATCGGTTTGTGCCGTACGGAACACATGTTTTTCGCGAGCGATGAACGT 7110
7120 7130 7140 7150 7160
pETEV-16b-ftppdk ATTAAAGCGGTCCGCAAAATGATCATGGCCGTGACGCCGGAACAGCGTAA 7166
pETEV-16b-fpppdk ATCAAAGCGGTACGTAAAATGATCATGGCGGTCACGCCTGAACAGCGTAA 7160
7170 7180 7190 7200 7210
pETEV-16b-ftppdk AGTTGCTCTGGATCTGCTGCTGCCGTATCAACGTAGTGACTTTGAAGGTA 7216
pETEV-16b-fpppdk GGCCGCGCTCGACTTGTTGTTGCCTTATCAGCGTAGTGATTTTGAAGGAA 7210
7220 7230 7240 7250 7260
pETEV-16b-ftppdk TTTTCCGCGCAATGGATGGCCTGCCGGTGACCATCCGTCTGCTGGATCCG 7266
pETEV-16b-fpppdk TTTTCCGGGCCATGGATGGACTGCCTGTAACGATCCGTCTGCTCGACCCT 7260
7270 7280 7290 7300 7310
pETEV-16b-ftppdk CCGCTGCATGAATTTCTGCCGGAAGGTGATCTGGAACACATTGTTAACGA 7316
pETEV-16b-fpppdk CCTCTGCATGAATTTCTCCCTGAAGGCGATCTCGAACACATCGTGAATGA 7310
7320 7330 7340 7350 7360
pETEV-16b-ftppdk ACTGGCAGTCGATACGGGCATGAGCGCTGACGAAATCTACTCTAAAATCG 7366
pETEV-16b-fpppdk ACTGGCCGTCGATACGGGAATGTCAGAAGATGAAATCTATTCGAAGATCG 7360
7370 7380 7390 7400 7410
pETEV-16b-ftppdk AAAACCTGAGTGAAGTTAATCCGATGCTGGGTTTCCGTGGCTGTCGCCTG 7416
pETEV-16b-fpppdk AAAAGCTCAGTGAAGTGAACCCTATGCTGGGCTTCCGTGGCTGTCGTTTG 7410
7420 7430 7440 7450 7460
pETEV-16b-ftppdk GGTATTTCGTACCCGGAACTGACCGAAATGCAGGTTCGTGCCATCTTTCA 7466
pETEV-16b-fpppdk GGAATTTCGTATCCTGAACTCACGGAAATGCAGGTGCGTGCTATCTTTCA 7460
7470 7480 7490 7500 7510
pETEV-16b-ftppdk AGCTGCGGTCAGCATGACCAACCAGGGTGTGACGGTTATTCCGGAAATCA 7516
pETEV-16b-fpppdk GGCGGCCGTGAGCATGAACAATCAAGGTGTGACGGTAATCCCTGAAATCA 7510
7520 7530 7540 7550 7560
pETEV-16b-ftppdk TGGTCCCGCTGGTTGGCACCCCGCAGGAACTGCGTCACCAAATTTCTGTT 7566
pETEV-16b-fpppdk TGGTGCCATTGGTCGGTACGCCTCAAGAATTGCGTCATCAGATCGGCGTA 7560
7570 7580 7590 7600 7610
pETEV-16b-ftppdk ATCCGCGGCGTCGCCGCAAATGTGTTTGCGGAAATGGGTGTCACCCTGGA 7616
pETEV-16b-fpppdk ATTCGTGGCGTAGCGGCCAATGTGTTTGCGGAAATGGGACTCACGATGGA 7610
7620 7630 7640 7650 7660
pETEV-16b-ftppdk ATATAAAGTGGGCACGATGATTGAAATCCCGCGTGCTGCGCTGATTGCGG 7666
pETEV-16b-fpppdk TTATAAGGTGGGTACAATGATTGAAATTCCTCGGGCGGCGTTGATCGCGG 7660
7670 7680 7690 7700 7710
pETEV-16b-ftppdk AAGAAATCGGTAAAGAAGCCGATTTCTTTAGCTTTGGCACCAACGACCTG 7716
pETEV-16b-fpppdk AAGAAATTGCCAAGGAAGCGGAATTCTTTTCTTTTGGTACGAATGATCTC 7710

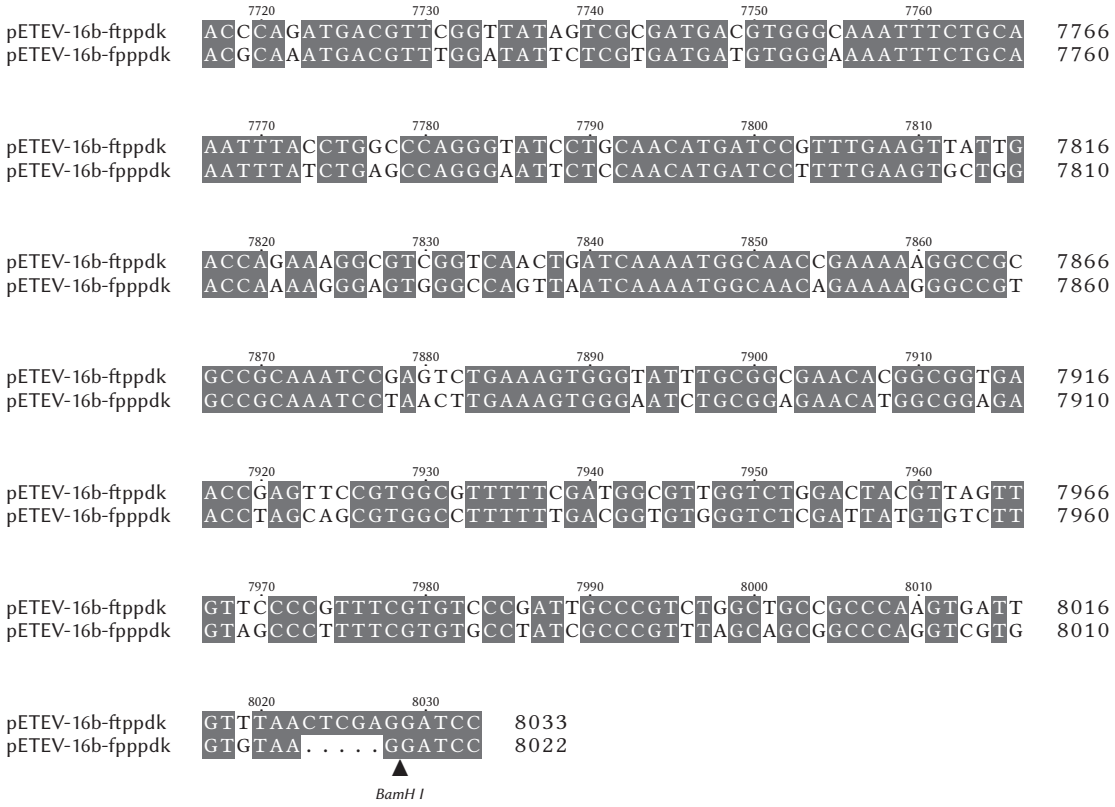
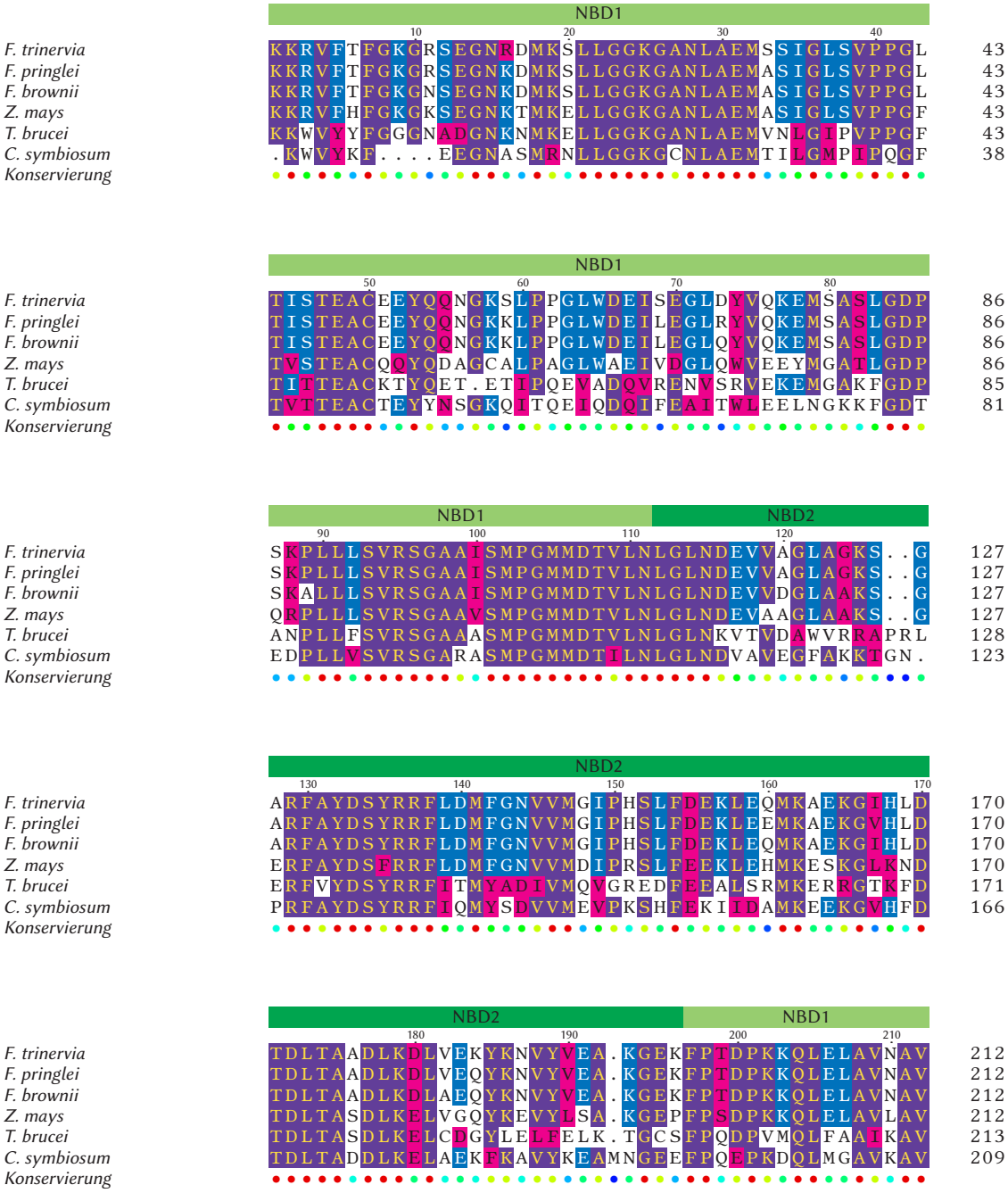
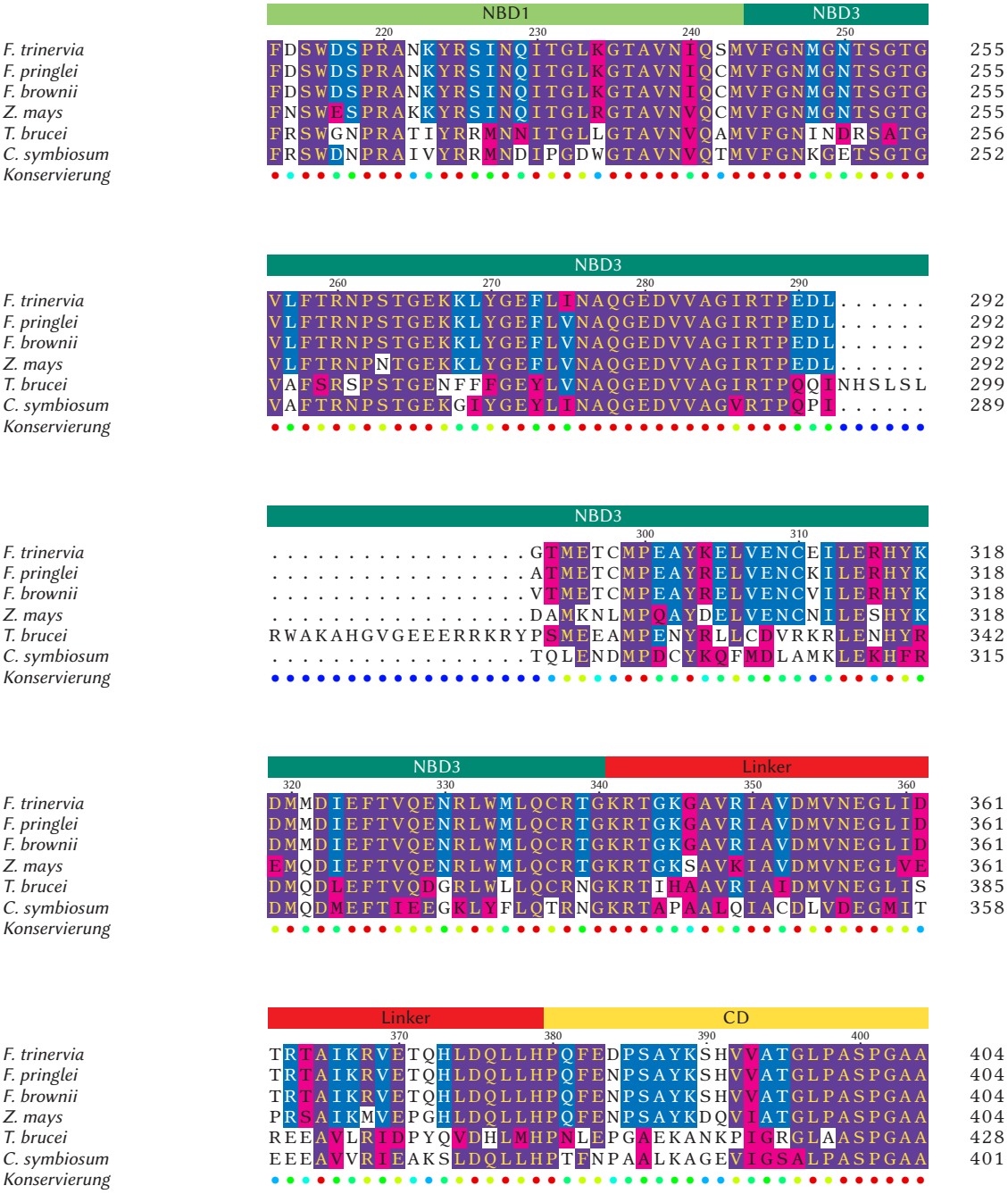
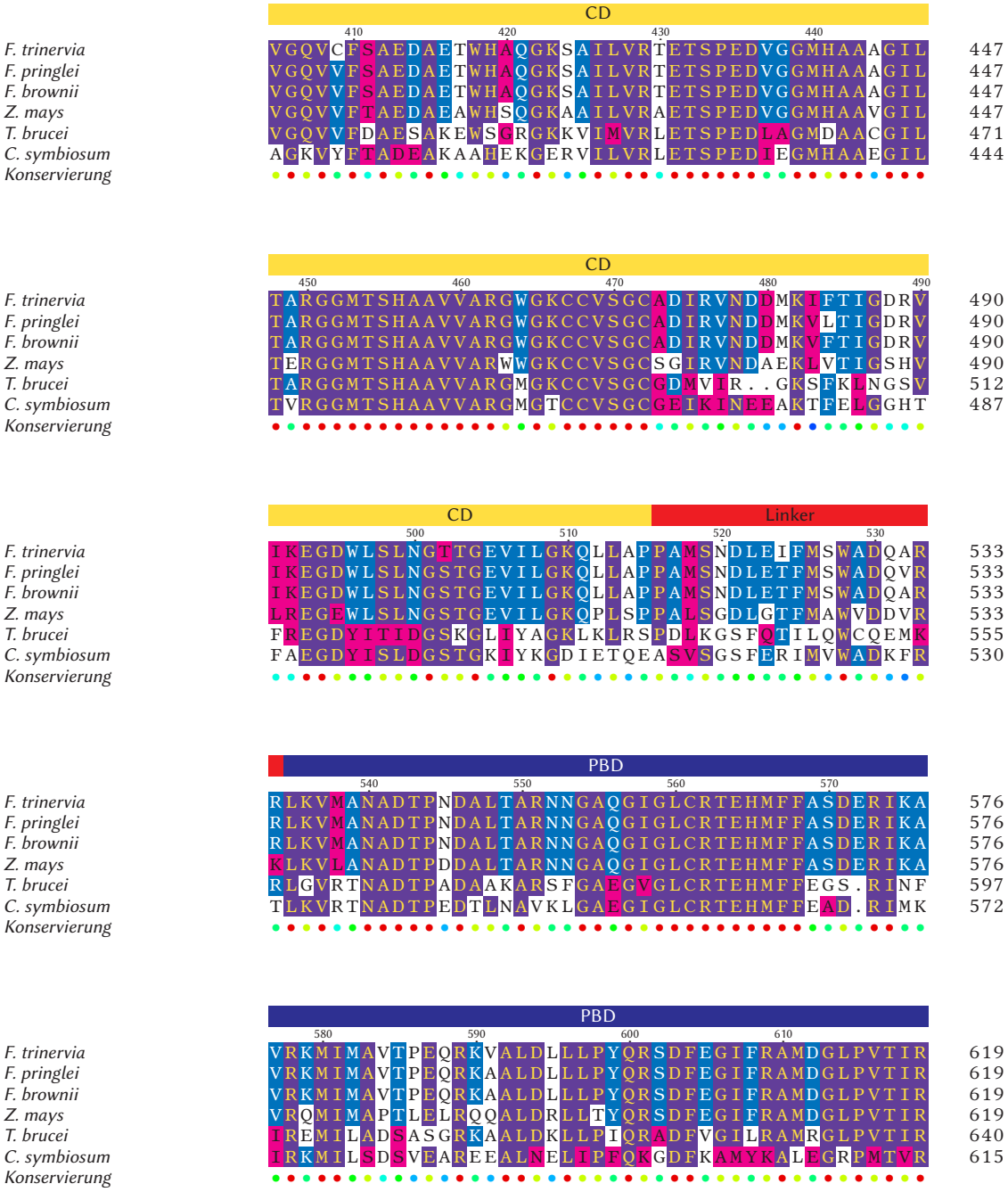
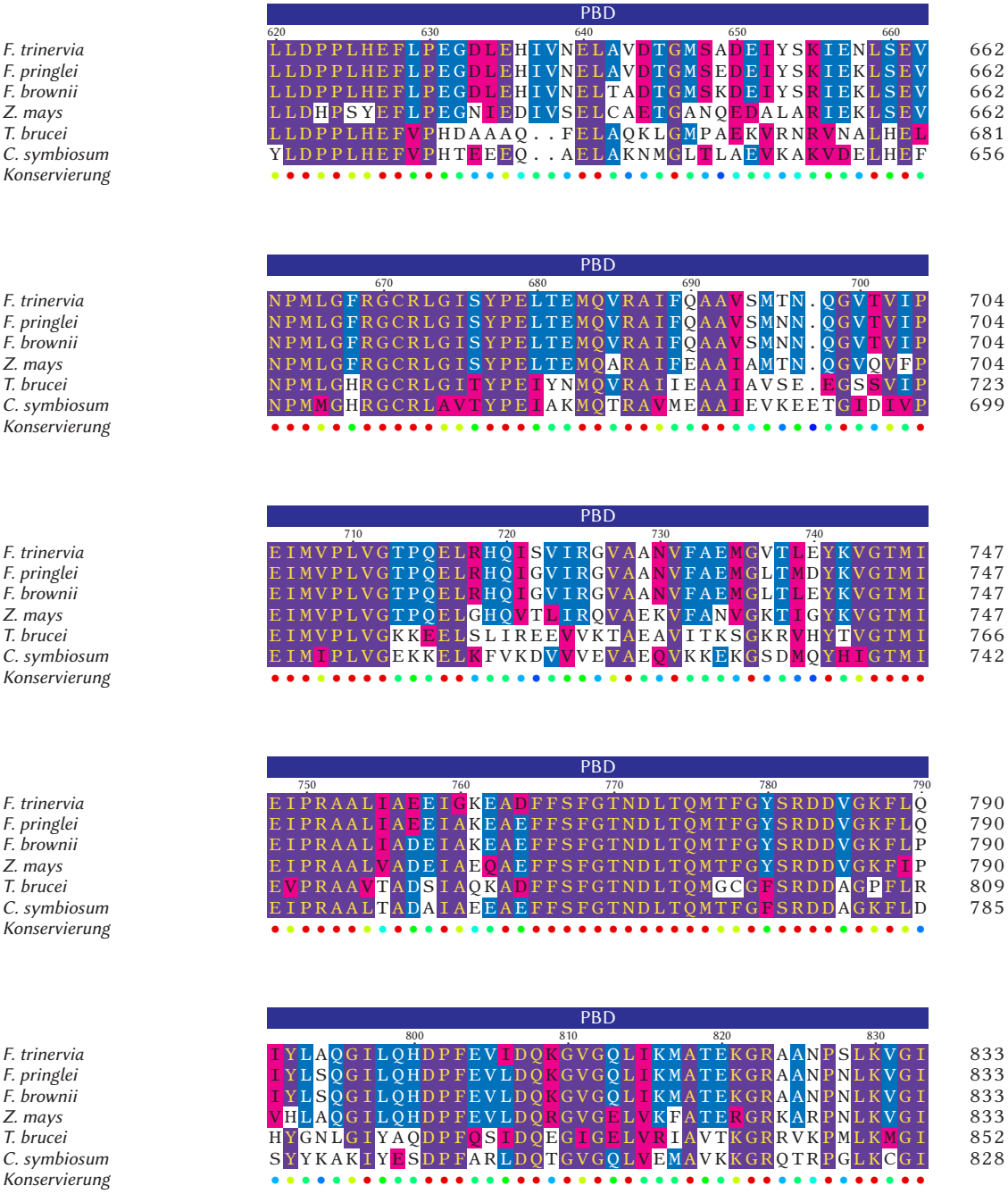


Abbildung A.1.: Paarweises Sequenzalignment (Needleman und Wunsch 1970) der für die PPDK aus *F. trinervia* und *F. pringlei* kodierenden Sequenzen in der MCS des Vektors pETEV-16b. Erstellt mit dem Programm „needle“ aus EMBOSS (Rice et al. 2000).


NBD1
10 20 30 40
F. trinervia KKRVFTFGKGRSEGNRDMKSLLGGKGANLAEMSSIGLSVPPGL 43
F. pringlei KKRVFTFGKGRSEGNKDMKSLLGGKGANLAEMASIGLSVPPGL 43
F. brownii KKRVFTFGKGNSEGNKDMKSLLGGKGANLAEMASIGLSVPPGL 43
Z. mays KKRVFHFGKGKSEGNKTMKELLGGKGANLAEMASIGLSVPPGF 43
T. brucei KKWVYYFGGGNADGNKNMKELLGGKGANLAEMVNLGIPVPPGF 43
C. symbiosum .KWVYKF....EEGNASMRNLLGGKGCNLAEMTILGMPIPQGF 38
Konservierung
NBD1
50 60 70 80
F. trinervia TISTEACEEYQQNGKSLPPGLWDEISEGLDYVQKEMSASLGDP 86
F. pringlei TISTEACEEYQQNGKKLPPGLWDEILEGLRYVQKEMSASLGDP 86
F. brownii TISTEACEEYQQNGKKLPPGLWDEILEGLQYVQKEMSASLGDP 86
Z. mays TVSTEACQQYQDAGCALPAGLWAEIVDGLQWVEEYMGATLGDP 86
T. brucei TITTEACKTYQET.ETIPQEVADQVRENVSRVEKEMGAKFGDP 85
C. symbiosum TVTTEACTEYYNSGKQITQEIQDQIFEAITWLEELNGKKFGDT 81
Konservierung
NBD1 NBD2
90 100 110 120
F. trinervia SKPLLLSVRSGAAISMPGMMDTVLNLGLNDEVVAGLAGKS..G 127
F. pringlei SKPLLLSVRSGAAISMPGMMDTVLNLGLNDEVVAGLAGKS..G 127
F. brownii SKALLLSVRSGAAISMPGMMDTVLNLGLNDEVVDGLAAKS..G 127
Z. mays QRPLLLSVRSGAAVSMPGMMDTVLNLGLNDEVAAGLAAKS..G 127
T. brucei ANPLLFSVRSGAAASMPGMMDTVLNLGLNKVTVDAWVRRAPRL 128
C. symbiosum EDPLLVSVRSGARASMPGMMDTILNLGLNDVAVEGFAKKTGN. 123
Konservierung
NBD2
130 140 150 160 170
F. trinervia ARFAYDSYRRFLDMFGNVVMGIPHSLFDEKLEQMKAEKGIHLD 170
F. pringlei ARFAYDSYRRFLDMFGNVVMGIPHSLFDEKLEEMKAEKGVHLD 170
F. brownii ARFAYDSYRRFLDMFGNVVMGIPHSLFDEKLEQMKAEKGIHLD 170
Z. mays ERFAYDSFRRFLDMFGNVVMDIPRSLFEEKLEHMKESKGLKND 170
T. brucei ERFVYDSYRRFITMYADIVMQVGREDFEEALSRMKERRGTKFD 171
C. symbiosum PRFAYDSYRRFIQMYSDVVMEVPKSHFEKIIDAMKEEKGVHFD 166
Konservierung
NBD2 NBD1
180 190 200 210
F. trinervia TDLTAADLKDLVEKYKNVYVEA.KGEKFPTDPKKQLELAVNAV 212
F. pringlei TDLTAADLKDLVEQYKNVYVEA.KGEKFPTDPKKQLELAVNAV 212
F. brownii TDLTAADLKDLAEQYKNVYVEA.KGEKFPTDPKKQLELAVNAV 212
Z. mays TDLTASDLKELVGQYKEVYLSA.KGEPFPSDPKKQLELAVLAV 212
T. brucei TDLTASDLKELCDGYLELFELK.TGCSFPQDPVMQLFAAIKAV 213
C. symbiosum TDLTADDLKELAEKFKAVYKEAMNGEEFPQEPKDQLMGAVKAV 209
Konservierung


NBD1
NBD3
220 230 240 250
F. trinervia FDSWDSPRANKYRSINQITGLKGTAVNIQSMVFGNMGNTSGTG 255
F. pringlei FDSWDSPRANKYRSINQITGLKGTAVNIQCMVFGNMGNTSGTG 255
F. brownii FDSWDSPRANKYRSINQITGLKGTAVNIQCMVFGNMGNTSGTG 255
Z. mays FNSWESPRAKKYRSINQITGLRGTAVNVQCMVFGNMGNTSGTG 255
T. brucei FRSWGNPRATIYRRMNNITGLLGTAVNVQAMVFGNINDRSATG 256
C. symbiosum FRSWDNPRAIVYRRMNDIPGDWGTAVNVQTMVFGNKGETSGTG 252
Konservierung
NBD3
260 270 280 290
F. trinervia VLFTRNPSTGEKKLYGEFLINAQGEDVVAGIRTPEDL..... 292
F. pringlei VLFTRNPSTGEKKLYGEFLVNAQGEDVVAGIRTPEDL..... 292
F. brownii VLFTRNPSTGEKKLYGEFLVNAQGEDVVAGIRTPEDL..... 292
Z. mays VLFTRNPNTGEKKLYGEFLVNAQGEDVVAGIRTPEDL..... 292
T. brucei VAFSRSPSTGENFFFGEYLVNAQGEDVVAGIRTPQQINHSLSL 299
C. symbiosum VAFTRNPSTGEKGIYGEYLINAQGEDVVAGVRTPQPI..... 289
Konservierung
NBD3
300 310
F. trinervia .....GTMETCMPEAYKELVENCEILERHYK 318
F. pringlei .....ATMETCMPEAYRELVENCKILERHYK 318
F. brownii .....VTMETCMPEAYRELVENCVILERHYK 318
Z. mays .....DAMKNLMPQAYDELVENCNILESHYK 318
T. brucei RWAKAHGVGEEERRKRYPSMEEAMPENYRLLCDVRKRLENHYR 342
C. symbiosum .....TQLENDMPDCYKQFMDLAMKLEKHFR 315
Konservierung
NBD3
Linker
320 330 340 350 360
F. trinervia DMMDIEFTVQENRLWMLQCRTGKRTGKGAVRIAVDMVNEGLID 361
F. pringlei DMMDIEFTVQENRLWMLQCRTGKRTGKGAVRIAVDMVNEGLID 361
F. brownii DMMDIEFTVQENRLWMLQCRTGKRTGKGAVRIAVDMVNEGLID 361
Z. mays EMQDIEFTVQENRLWMLQCRTGKRTGKSAVKIAVDMVNEGLVE 361
T. brucei DMQDLEFTVQDGRLWLLQCRNGKRTIHAAVRIAIDMVNEGLIS 385
C. symbiosum DMQDMEFTIEEGKLYFLQTRNGKRTAPAALQIACDLVDEGMIT 358
Konservierung
Linker
CD
370 380 390 400
F. trinervia TRTAIKRVETQHLDQLLHPQFEDPSAYKSHVVATGLPASPGAA 404
F. pringlei TRTAIKRVETQHLDQLLHPQFENPSAYKSHVVATGLPASPGAA 404
F. brownii TRTAIKRVETQHLDQLLHPQFENPSAYKSHVVATGLPASPGAA 404
Z. mays PRSAIKMVEPGHLDQLLHPQFENPSAYKDQVIATGLPASPGAA 404
T. brucei REEAVLRIDPYQVDHLMHPNLEPGAEKANKPIGRGLAASPGAA 428
C. symbiosum EEEAVVRIEAKSLDQLLHPTFNPAALKAGEVIGSALPASPGAA 401
Konservierung


CD
410 420 430 440
F. trinervia VGQVCFSAEDAETWHAQGKSAILVRTETSPEDVGGMHAAAGIL 447
F. pringlei VGQVVFSAEDAETWHAQGKSAILVRTETSPEDVGGMHAAAGIL 447
F. brownii VGQVVFSAEDAETWHAQGKSAILVRTETSPEDVGGMHAAAGIL 447
Z. mays VGQVVFTAEDAEAWHSQGKAAILVRAETSPEDVGGMHAAVGIL 447
T. brucei VGQVVFDAESAKEWSGRGKKVIMVRLETSPEDLAGMDAACGIL 471
C. symbiosum AGKVYFTADEAKAAHEKGERVILVRLETSPEDIEGMHAAEGIL 444
Konservierung
CD
450 460 470 480 490
F. trinervia TARGGMTSHAAVVARGWGKCCVSGCADIRVNDDMKIFTIGDRV 490
F. pringlei TARGGMTSHAAVVARGWGKCCVSGCADIRVNDDMKVLTIGDRV 490
F. brownii TARGGMTSHAAVVARGWGKCCVSGCADIRVNDDMKVFTIGDRV 490
Z. mays TERGGMTSHAAVVARWWGKCCVSGCSGIRVNDAEKLVTIGSHV 490
T. brucei TARGGMTSHAAVVARGMGKCCVSGCGDMVTR..GKSFKLNGSV 512
C. symbiosum TVRGGMTSHAAVVARGMGTCCVSGCGEIKINEEAKTFELGGHT 487
Konservierung
CD
Linker
500 510 520 530
F. trinervia IKEGDWLSLNGTTGEVILGKQLLAPPAMSNDLEIFMSWADQAR 533
F. pringlei IKEGDWLSLNGSTGEVILGKQLLAPPAMSNDLETFMSWADQVR 533
F. brownii IKEGDWLSLNGSTGEVILGKQLLAPPAMSNDLETFMSWADQAR 533
Z. mays LREGEWLSLNGSTGEVILGKQPLSPPALSGDLGTFMAWVDDVR 533
T. brucei FREGDYITIDGSKGLIYAGKLKLRSPDLKGSFQTILQWCQEMK 555
C. symbiosum FAEGDYISLDGSTGKIYKGDIETQEASVSGSFERIMVWADKFR 530
Konservierung
PBD
540 550 560 570
F. trinervia RLKVMANADTPNDALTARNNGAQGIGLCRTEHMFFASDERIKA 576
F. pringlei RLKVMANADTPNDALTARNNGAQGIGLCRTEHMFFASDERIKA 576
F. brownii RLKVMANADTPNDALTARNNGAQGIGLCRTEHMFFASDERIKA 576
Z. mays KLKVLANADTPDDALTARNNGAQGIGLCRTEHMFFASDERIKA 576
T. brucei RLGVRTNADTPADAAKARSFGAEGVGLCRTEHMFFEGS.RINF 597
C. symbiosum TLKVRTNADTPEDTLNAVKLGAEGIGLCRTEHMFFEAD.RIMK 572
Konservierung
PBD
580 590 600 610
F. trinervia VRKMIMAVTPEQRKVALDLLLPYQRSDFEGIFRAMDGLPVTIR 619
F. pringlei VRKMIMAVTPEQRKAALDLLLPYQRSDFEGIFRAMDGLPVTIR 619
F. brownii VRKMIMAVTPEQRKAALDLLLPYQRSDFEGIFRAMDGLPVTIR 619
Z. mays VRQMIMAPTLELRQQALDRLLTYQRSDFEGIFRAMDGLPVTIR 619
T. brucei IREMILADSASGRKAALDKLLPIQRADFVGILRAMRGLPVTIR 640
C. symbiosum IRKMILSDSVEAREEALNELIPFQKGDFKAMYKALEGRPMTVR 615
Konservierung


PBD
620 630 640 650 660
F. trinervia LLDPPLHEFLPEGDLEHIVNELAVDTGMSADEIYSKIENLSEV 662
F. pringlei LLDPPLHEFLPEGDLEHIVNELAVDTGMSEDEIYSKIEKLSEV 662
F. brownii LLDPPLHEFLPEGDLEHIVNELTADTGMSKDEIYSRIEKLSEV 662
Z. mays LLDHPSYEFLPEGNIEDIVSELCAETGANQEDALARIEKLSEV 662
T. brucei LLDPPLHEFVPHDAAAQ..FELAQKLGMPAEKVRNRVNALHEL 681
C. symbiosum YLDPPLHEFVPHTEEEQ..AELAKNMGLTLAEVKAKVDELHEF 656
Konservierung
PBD
670 680 690 700
F. trinervia NPMLGFRGCRLGISYPELTEMQVRAIFQAAVSMTN.QGVTVIP 704
F. pringlei NPMLGFRGCRLGISYPELTEMQVRAIFQAAVSMNN.QGVTVIP 704
F. brownii NPMLGFRGCRLGISYPELTEMQVRAIFQAAVSMNN.QGVTVIP 704
Z. mays NPMLGFRGCRLGISYPELTEMQARAIFEAAIAMTN.QGVQVFP 704
T. brucei NPMLGHRGCRLGITYPEIYNMQVRAIIEAAIAVSE.EGSSVIP 723
C. symbiosum NPMMGHRGCRLAVTYPEIAKMQTRAVMEAAIEVKEETGIDIVP 699
Konservierung
PBD
710 720 730 740
F. trinervia EIMVPLVGTPQELRHQISVIRGVAANVFAEMGVTLEYKVGTMI 747
F. pringlei EIMVPLVGTPQELRHQIGVIRGVAANVFAEMGLTMDYKVGTMI 747
F. brownii EIMVPLVGTPQELRHQIGVIRGVAANVFAEMGLTLEYKVGTMI 747
Z. mays EIMVPLVGTPQELGHQVTLIRQVAEKVFANVGKTIGYKVGTMI 747
T. brucei EIMVPLVGKKEELSLIREEVVKTAEAVITKSGKRVHYTVGTMI 766
C. symbiosum EIMIPLVGEKKELKFVKDVVVEVAEQVKKEKGSDMQYHIGTMI 742
Konservierung
PBD
750 760 770 780 790
F. trinervia EIPRAALIAEEIGKEADFFSFGTNDLTQMTFGYSRDDVGKFLQ 790
F. pringlei EIPRAALIAEEIAKEAEFFSFGTNDLTQMTFGYSRDDVGKFLQ 790
F. brownii EIPRAALIADEIAKEAEFFSFGTNDLTQMTFGYSRDDVGKFLP 790
Z. mays EIPRAALVADEIAEQAEFFSFGTNDLTQMTFGYSRDDVGKFIP 790
T. brucei EVPRAAVTADSIAQKADFFSFGTNDLTQMGCGFSRDDAGPFLR 809
C. symbiosum EIPRAALTADAIAEEAEFFSFGTNDLTQMTFGFSRDDAGKFLD 785
Konservierung
PBD
800 810 820 830
F. trinervia IYLAQGILQHDPFEVIDQKGVGQLIKMATEKGRAANPSLKVGI 833
F. pringlei IYLSQGILQHDPFEVLDQKGVGQLIKMATEKGRAANPNLKVGI 833
F. brownii IYLSQGILQHDPFEVLDQKGVGQLIKMATEKGRAANPNLKVGI 833
Z. mays VHLAQGILQHDPFEVLDQRGVGELVKFATERGRKARPNLKVGI 833
T. brucei HYGNLGIYAQDPFQSIDQEGIGELVRIAVTKGRRVKPMLKMGI 852
C. symbiosum SYYKAKIYESDPFARLDQTGVGQLVEMAVKKGRQTRPGLKCGI 828
Konservierung

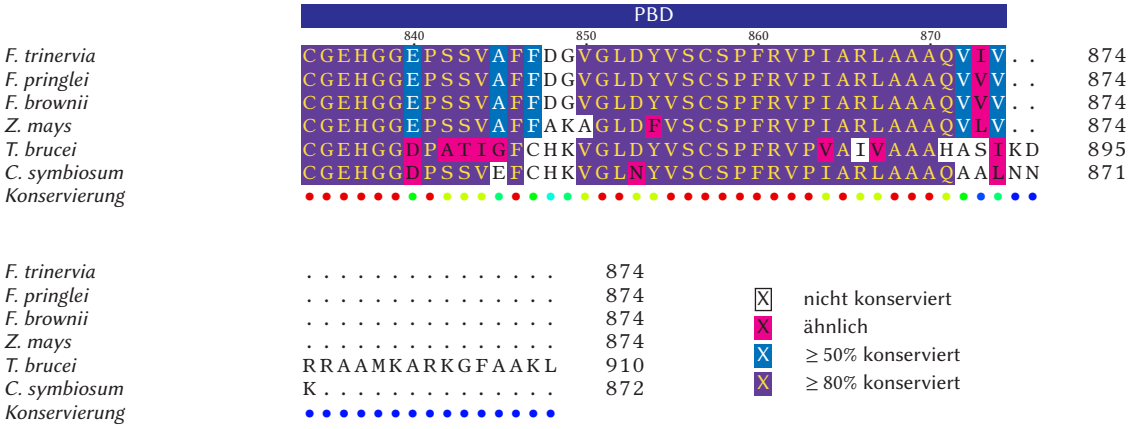


Abbildung A.2.: Multiples Alignment der Aminosäuresequenzen der PPDKs aus *F. trinervia*, *F. pringlei*, *F. brownii*, *Z. mays*, *T. brucei* und *C. symbiosum*. Die Nummerierung oberhalb des Alignments entspricht der *Flaveria*-Notation. Die Konservierung der Reste ist farbkodiert dargestellt: ≥80 % konserviert (violett), ≥50 % konserviert (blau) und nicht konserviert (weiß). Ähnliche Reste sind magenta hinterlegt. Das Alignment wurde mit dem Programm „T-Coffee“ erstellt (Notredame et al. 2000).

A.2. Plasmidkarten

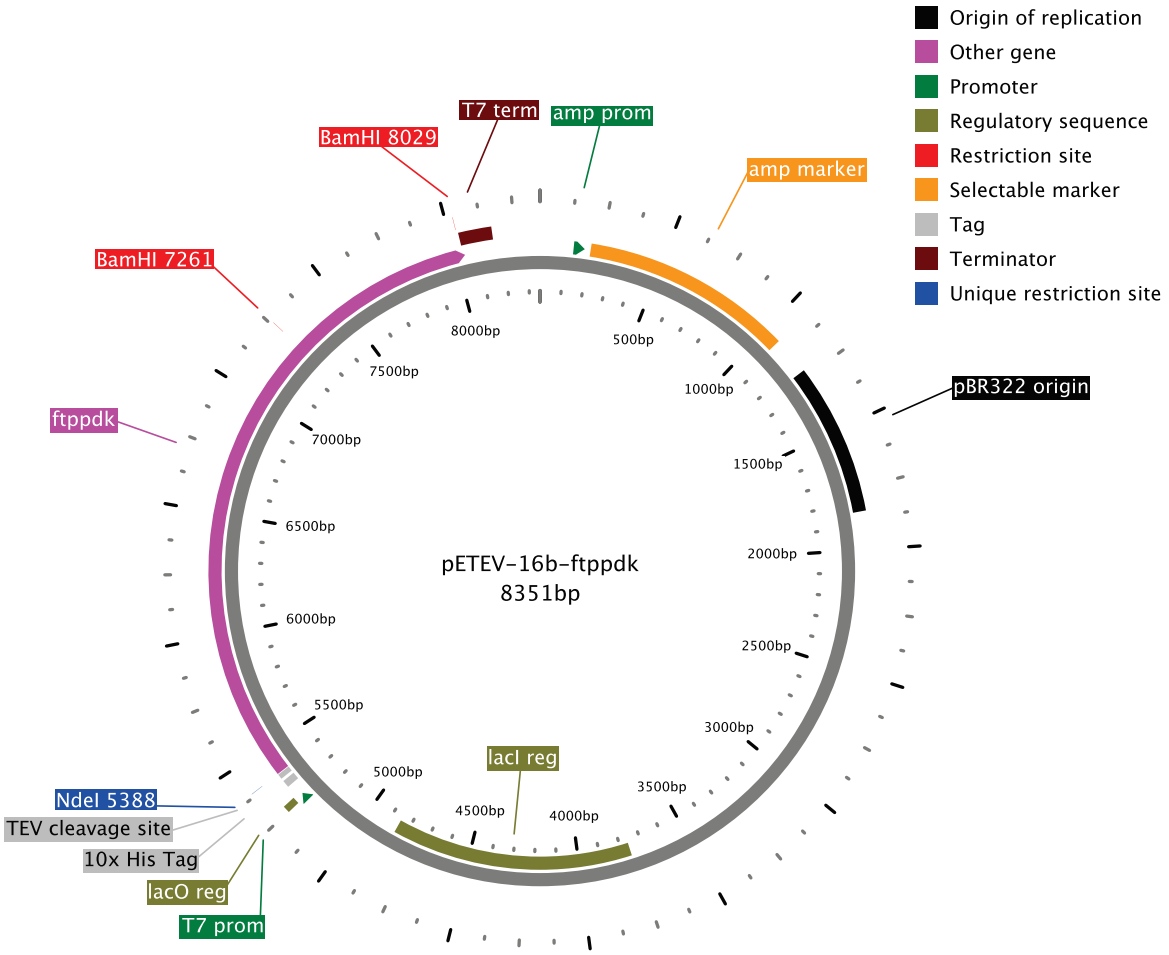


Abbildung A.3.: Plasmidkarte des Vektors pETEV-16b-ftppdk, welcher für die PPDK aus *F. trinervia* kodiert. Die Plasmidkarte wurde mit dem Programm „PlasMapper“ (Dong et al. 2004) generiert.

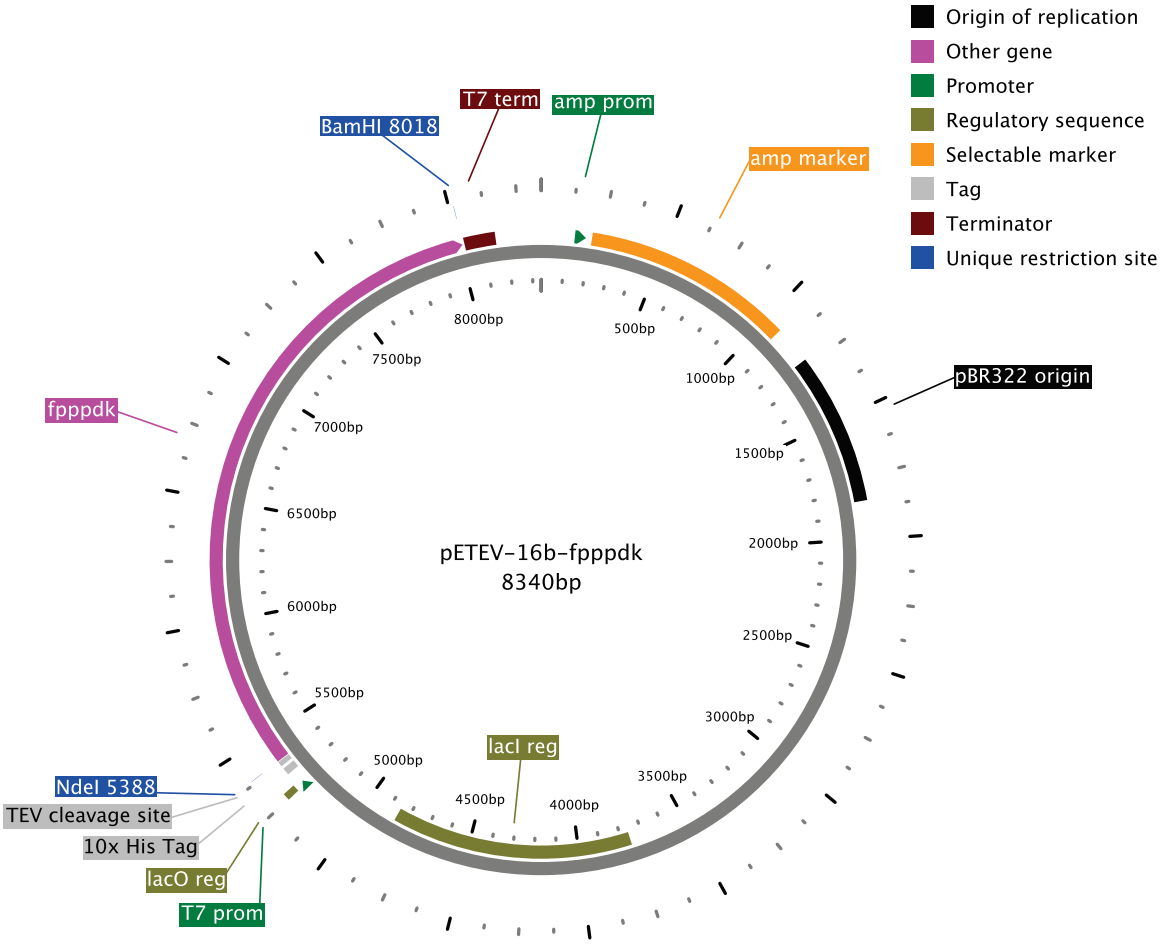


Abbildung A.4.: Plasmidkarte des Vektors pETEV-16b-fpppdk, welcher für die PPDK aus *F. pringlei* kodiert. Die Plasmidkarte wurde mit dem Programm „PlasMapper“ (Dong et al. 2004) generiert.

Danksagung

Ganz besonders danke ich an dieser Stelle meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Georg Groth für das entgegengebrachte Vertrauen, viele Denkanstöße und Anregungen, konstruktive Kritik und etliche fachliche und nicht-fachliche Diskussionen. Auch danke ich ihm ganz herzlich dafür, dass er bei allen auftretenden Problemen und Unwägbarkeiten während meiner Promotion stets ein offenes Ohr hatte und eine verlässliche Anlaufstelle war. Vielen Dank!

Herrn Prof. Dr. Holger Gohlke danke ich für die Übernahme des Korreferats und die fruchtbare Zusammenarbeit bei der „Bearbeitung“ der PPDK.

Dr. Daniel Schlieper für die Unterstützung beim „Erstkontakt“ mit der Proteinkristallographie, die vielen anregenden Diskussionen, die vermachte Sammlung an Ausgaben der „TEXnischen Komödie“, etliche Anekdoten und die Erkenntnis, dass der Zen-Buddhismus und das Fischen eines Proteinkristalls viele Gemeinsamkeiten haben. Die Analogie zwischen dem Bauen und Verfeinern einer Struktur und dem japanischen Brauch, Kugeln aus Erde zu polieren, werde ich – selbst unter größten Anstrengungen – wohl nie vergessen können.

Dr. Astrid Port danke ich für ihre sehr engagierte Hilfe bei sämtlichen Fragen rund um die Proteinkristallographie, viele aufschlussreiche Diskussionen und stets pragmatische Lösungsansätze für aufkommende Probleme.

Daniel Ciupka für die erfolgreiche Zusammenarbeit bei der PPDK. Danke Dir für Dein Engagement!

Den Kollegen im Institut für Biochemische Pflanzenphysiologie danke ich für viele gemeinsam verbrachte Stunden im Labor, Hilfe und Kritik. Mareike, danke dafür, dass wir es in unserer professionellen Laufbahn schon seit dem ersten Studiensemester miteinander aushalten und trotzdem noch häufig genug einer Meinung sind. Alex für die vielen Gespräche bei einer guten Flasche Club Mate, welche ich gerade beim Schreiben dieser Arbeit sehr vermisst habe. Möge unser Universum noch lange seinen dreidimensionalen Zustand beibehalten! Artur für die hervorragende Substitution der angeregten Diskussionen mit

Alex und dem Aufrechterhalten unseres Rituals zum gemeinsamen „Mensieren“. Lena danke ich für ihren lobenswerten Einsatz zur Rettung der Zimmerpflanzen im Institut, auch wenn ich da langfristig wenig Hoffnung habe. Liebe Claudia, Dir danke ich dafür, dass ich es offensichtlich nicht geschafft habe Dich während Deiner Bachelorarbeit langfristig von unserem Institut zu vergraulen. Nicole und Kerstin, danke, dass ihr die „guten Seelen“ des Labors seid! Ohne Euch würde der Laden nicht laufen.

Besonders herzlich bedanke ich mich bei meiner Familie – insbesondere meinen Eltern – für die Unterstützung während des Studiums und der Promotion, sowie das Verständnis dafür, dass ich gerade zum Ende hin recht wenig Zeit für sie aufbringen konnte.

Meinen Freunden danke ich für die vielen unbeschwerten Stunden außerhalb des Labors, sei es beim Lasertag, auf Festivals, beim Tanzen oder einfach nur beim gemütlichen Beisammensein am Abend. Danke!

Ganz besonders bedanke ich mich bei meiner besseren Hälfte Nadine. Gerade in den letzten Monaten war ich sicherlich anstrengend zu ertragen. Vielen Dank für die Geduld, Liebe und Unterstützung, die Du mir entgegengebracht hast und bringst. In ein paar Monaten bist dann Du dran!

Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Ich habe diese Arbeit selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel genutzt. Alle wörtlich oder inhaltlich übernommenen Stellen habe ich als solche gekennzeichnet. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation nur in diesem und keinem anderen Promotionsverfahren eingereicht habe und diesem Promotionsverfahren keine endgültig gescheiterten Promotionsverfahren vorausgegangen sind.

Düsseldorf, den 13.02.2017

Alexander Ralph Michael Minges