



**Phosphatmangel-induzierte  
*Phosphoethanolamin/Phosphocholin-Phosphatasen*  
aus Pflanzen: Struktur, enzymatische Reaktionen  
und Funktionen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt der

Naturwissenschaftliche Fakultät I – Biowissenschaften  
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Diplom-Biochemikerin

Anett May

geboren am 21.01.1974 in Halle (Saale)

Gutachterin/Gutachter:

1. Prof. Ingo Heilmann
2. Prof. Ricarda Jost
3. PD Dr. Margret Köck

verteidigt am: 09.07.2014

Halle (Saale), 03.03.2014

<b>1. Einleitung .....</b>	<b>1</b>
1.1 Phosphor und seine Bedeutung für Pflanzen.....	1
1.2 Adaptationen der Pflanzen an Phosphat-Limitierung .....	3
1.2.1 Allgemeine Aspekte.....	3
1.2.2 Veränderung des Wurzelsystems unter Phosphat-Defizit.....	4
1.2.3 Regulatorische und transkriptionelle Anpassungen bei P <sub>i</sub> -Defizit.....	5
1.2.4 Metabolische Stressantwort der Pflanze auf P <sub>i</sub> -Mangel.....	6
1.2.4.1 P <sub>i</sub> -Mangel induzierte extrazelluläre <i>Purple Acid</i> -Phosphatasen .....	8
1.2.4.2 P <sub>i</sub> -Mangel induzierte intrazelluläre Phosphatasen .....	9
1.2.4.3 Die Haloacid Dehalogenase (HAD)-Superfamilie.....	11
1.3 Zielstellung.....	14
<b>2. Ergebnisse .....</b>	<b>15</b>
2.1 <i>In vitro</i> -Studien der Genprodukte des <i>Atlg17710</i> und <i>At4g29530</i> .....	15
2.1.1 Aminosäuresequenzanalyse der Genfamilie .....	15
2.1.2 Transkriptionelle Analyse unter P <sub>i</sub> -Mangelbedingungen.....	16
2.1.3 Klonierung und heterologe Expression des Gens <i>Atlg17710</i> .....	19
2.1.4 Enzymatische Charakterisierung des Genprodukts von <i>Atlg17710</i> als PECP1 .....	20
2.1.4.1 Kinetische Charakterisierung der PECP1-Enzymreaktion .....	24
2.1.4.2 Charakterisierung der Sekundär- und der Tertiärstruktur der PECP1 .....	26
2.1.5 Identifizierung einer weiteren PECP in <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	31
2.2 Isolierung und Charakterisierung der <i>pecp1</i> -T-DNA-Insertionslinien .....	34
2.2.1 Transkriptgehalte des Gens <i>PECP1</i> in T-DNA-Insertionslinien .....	39
2.2.2 Phosphatase-Aktivität in den Extrakten der <i>pecp1</i> -Mutantenlinien .....	41
2.2.3 Quantifizierung von Metaboliten der PECP1-Reaktion.....	43
2.3 Generierung von Überexpressionspflanzen .....	45
2.3.1 Charakterisierung der <i>A. thaliana</i> Überexpressionspflanzen.....	46
2.3.2 Phosphatase-Aktivität in den Extrakten der Überexpressionspflanzen .....	48
2.3.3 Quantifizierung von Metaboliten in Überexpressionspflanzen .....	51
2.4 Darstellung der PECP-Enzymfamilie.....	52
2.4.1 Identifizierung Arabidopsis-verwandter P <sub>i</sub> -Mangel induzierter pflanzlicher Phosphatasen	52
2.4.2 Synthese der neuen P <sub>i</sub> -Mangel induzierten pflanzlichen Phosphatasen.....	53
2.4.3 Substratspektrum der neuen pflanzlichen Phosphatasen .....	55
2.4.4 <i>Steady state</i> -Parameter der PEA/PCho-Phosphatasen-Reaktionen.....	56
2.4.5 Phosphatasen der PHOSPHO1-Subfamilie in weiteren Pflanzenspezies .....	57
<b>3. Diskussion.....</b>	<b>64</b>
3.1 Enzymatische Eigenschaften der PHOSPHO1-Subfamilie.....	64
3.2 Die putative Funktion der PECP-Enzymfamilie im P <sub>i</sub> -versorgten Metabolismus .....	68

3.3 Die Rolle der AtPECP1 im P <sub>i</sub> -verarmten Pflanzenmetabolismus .....	71
<b>4. Zusammenfassung .....</b>	<b>75</b>
<b>5. Material und Methoden .....</b>	<b>77</b>
5.1 Verwendete Materialien .....	77
5.1.1 Geräte .....	77
5.1.2 Chemikalien .....	78
5.1.3 Analysesets und Enzyme .....	80
5.1.4 Vektoren .....	80
5.1.5 Oligonukleotide .....	81
5.1.6 Bakterienkulturen .....	82
5.1.7 Antibiotika .....	82
5.1.8 Antikörper .....	83
5.1.9 Kommerziell erworbener gentechnisch veränderter Arabidopsis-Samen .....	83
5.2 Allgemein angewandte Methoden .....	83
5.2.1 Kultivierung von <i>E. coli</i> Bakterien .....	83
5.2.2 Induktion und Ernte der Bakterienkultur .....	84
5.2.3 Zellaufschluss der <i>E. coli</i> Bakterien .....	84
5.2.4 Gerichtete pENTRTM/D-TOPO® Klonierung mittels <i>E. coli</i> TOP10 .....	84
5.2.5 Submerse Anzucht von Arabidopsis-Keimlingen .....	84
5.2.6 Anzucht von Bohnenpflanzen .....	85
5.2.7 Ernte von Reispflanzen .....	85
5.3 DNA molekularbiologische Methoden .....	85
5.3.1 Plasmidpräparation aus <i>E. coli</i> .....	85
5.3.2 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektorsysteme .....	86
5.3.3 Transformation von Plasmid-DNA .....	86
5.3.4 Standard-Polymerasekettenreaktionen (PCR) .....	86
5.3.5 Quantitative <i>Real-Time</i> RT-PCR (qRT-PCR) .....	87
5.3.6 Semiquantitative-PCR (sq-PCR) .....	87
5.3.7 Agarose-Gelelektrophorese .....	87
5.3.8 Restriktionsverdau von DNA .....	87
5.3.9 DNA-Aufreinigung aus dem Gel .....	87
5.3.10 Isolierung genomischer DNA aus Arabidopsis-Blättern .....	88
5.3.11 Bestimmung der Kopienzahl der T-DNA Insertionen .....	88
5.3.12 Genotypisierung der T-DNA-Insertionslinien .....	89
5.3.13 Sequenzierung von DNA-Material .....	89
5.3.14 Sequenzanalysen mit Hilfe von Datenbanken .....	89
5.4 RNA molekularbiologische Methoden .....	89

5.4.1 Isolation von RNA aus Pflanzen.....	89
5.4.2 cDNA Synthese mit Hilfe der <i>Reversen Transkriptase</i> .....	90
5.5 Proteinchemische Methoden .....	90
5.5.1 Heterologe Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine .....	90
5.5.2 SDS-PAGE, <i>Western Blot</i> und MALDI-TOF Massenspektrometrie.....	90
5.5.3 Proteinextraktion aus Pflanzen .....	91
5.5.4 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	91
5.5.5 Enzymaktivitätstests .....	92
5.5.6 Kinetische Charakterisierung der Phosphatase-Reaktion .....	94
5.5.7 Gelfiltration und nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	95
5.6 Extraktion und quantitativer Nachweis von Metaboliten.....	95
<b>6. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>96</b>
<b>7. Anhang .....</b>	<b>A</b>
7.1 Vektorkarten .....	A
7.2 Berechnung der spezifischen AtPECP1-Aktivität .....	B
7.3 Lineweaver-Burk Plots der v/S-Charakteristik der AtPECP2.....	C
7.4 v/S-Charakteristiken der PECP-Isoenzyme .....	D
7.5 <i>Multiples Alignment</i> (Clustal-W2) der HAD Superfamilie Hydrolasen .....	J

AK	Antikörper
AS	Aminosäuren
<i>At</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
AtCol-0	<i>Arabidopsis Wildtyp-Pflanze des Ökotyps Columbia-0</i>
<i>AtPECP1</i>	<i>At1g17710</i>
<i>AtPECP2</i>	<i>At4g29530</i>
<i>AtPPsPase1</i>	<i>At1g73010</i>
AtPECP1	<i>A. thaliana</i> Phosphoethanolamin/Phosphocholin-Phosphatase1
AtPECP2	<i>A. thaliana</i> Phosphoethanolamin/Phosphocholin-Phosphatase2
<i>At OE-PECP1</i>	Überexpressionspflanze des Gens <i>At1g17710</i>
<i>atpecp1-1</i>	Arabidopsis-Linie GABI mit T-DNA-Insertion im Gen <i>At1g17710</i>
<i>atpecp1-2</i>	Arabidopsis-Linie Wisconsin mit T-DNA-Insertion im Gen <i>At1g17710</i>
<i>atpecp1-3</i>	Arabidopsis-Linie SALK mit T-DNA-Insertion im Gen <i>At1g17710</i>
AtPPsPase1	<i>A. thaliana</i> Pyrophosphat-spezifische-Phosphatase1
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Cho	Cholin
cDNA	copy DNA
CDS	<i>coding sequence</i>
cDNA-AFLP	<i>cDNA amplified fragment length polymorphism</i>
ddH <sub>2</sub> O	doppelt-destilliertes Wasser
kDa	Kilo Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
EA	Ethanolamin
EtOH	Ethanol
FG	Frischgewicht
GABI	Genomanalyse im biologischen System Pflanze
His	Histidin
IMAC	<i>immobilized metal affinity chromatography</i>

IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
$K_D$	Dissoziationskonstante
$K_m$	Michaelis-Menten-Konstante
<i>Le</i>	<i>Lycopersicon esculentum</i> (neu: <i>Solanum lycopersicum</i> )
LePS2	saure Phosphatase aus <i>Lycopersicon esculentum</i>
LB	Luria-Bertani
MDP-1	<i>magnesium-dependent Phosphatase-1</i>
Me	Metall
MW	<i>molecular weight</i>
NaAc	Natriumacetat
OD	optische Dichte
OE	Überexpressionspflanzen
<i>ORF</i>	<i>open reading frame</i>
<i>Os</i>	<i>Oryza sativa</i>
OsACP1	<i>Oryza sativa</i> saure Phosphatase 1
$pK_a$ , $pK_s$	Logarithmierte Säurekonstante
<i>PAGE</i>	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAP	<i>Purple Acid-Phosphatasen</i>
PCho	Phosphocholin
<i>PCR</i>	<i>polymerase chain reaction</i>
PEA	Phosphoethanolamin
pET	<i>plasmid for Expression by T7 RNA-polymerase</i>
$P_i$	Orthophosphat, $PO_4^{3-}$
(+ $P_i$ )	Phosphatversorgung
(- $P_i$ )	Phosphatmangel
p-NPP	para-Nitrophenylphosphat
<i>Psi</i>	<i>phosphate-starvation-induced genes</i>
PSP	Phosphoserin-Phosphatasen
<i>Pv</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>
PvHAD1	( <i>Phaseolus vulgaris</i> Haloacid Dehalogenase1)
PvPS2	( <i>Phaseolus vulgaris</i> Phosphatmangel-induzierte Phosphatase2)
PVP	Polyvinylpyrrolidon
RBS	Ribosomen-Bindestelle
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rotations per minute</i>

RT	Raumtemperatur
SALK	SALK Institut für biologische Studien
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
SDS-PAGE	SDS- Polyacrylamid Gelelektrophorese
SSC	<i>Saline Sodium Citrate</i>
SOC	<i>Salt Optimal Carbon</i>
<i>St</i>	<i>Solanum tuberosum</i>
StPPP	( <i>Solanum tuberosum</i> Phosphat- und Pathogen-induzierte Phosphatase)
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>TBS</i>	<i>Tris-buffer-saline</i>
<i>TBST</i>	<i>Tris-buffer-saline</i> mit Tween20
TCA	Trichloressigsäure ( <i>trichloroacetic acid</i> )
<i>TIBA</i>	<i>2,3,5-triiodobenzoic acid</i>
T3, T4	3. bzw. 4. Generation
v/v	Volumen/Volumen
$V_{\max}$	Maximalgeschwindigkeit
w/v	Gewicht/Volumen
YFP	<i>Yellow Flourescent Protein</i>

Anmerkung zur Terminologie:

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Anglizismen sind *kursiv* gedruckt.

Für Aminosäuren wurde der Einbuchstaben- und der Dreibuchstaben-, für Nukleinsäuren der übliche Einbuchstaben-Code verwendet.

<b>Abbildung 1:</b> Ausschnitt der regulatorischen Phosphatmangel-Antwort in Pflanzen.....	3
<b>Abbildung 2:</b> Modell der metabolischen Phosphatmangel-Antwort in Pflanzen.....	7
<b>Abbildung 3:</b> Katalytische Motive der HAD-Superfamilie.....	11
<b>Abbildung 4:</b> Räumliche Struktur der klassischen Rossmann-Kerndomäne der HAD-Superfamilie.....	12
<b>Abbildung 5:</b> Multiples <i>Alignment</i> verwandter Phosphatasen der HAD-Superfamilie in Arabidopsis.....	15
<b>Abbildung 6:</b> Diagramm zur transkriptionellen Aktivierung des <i>At1g17710</i> und des <i>At4g29530</i> .....	17
<b>Abbildung 7:</b> Sq-PCR zur transkriptionellen Aktivierung der Arabidopsis-Gene.....	18
<b>Abbildung 8:</b> Schematische Darstellung des Konstrukts pET-28b(+)/ <i>At1g17710</i> .....	19
<b>Abbildung 9:</b> Reinigung des <i>At1g17710</i> -Proteins mittels IMAC. ....	20
<b>Abbildung 10:</b> Untersuchung zur Metall-Abhängigkeit der PECP1 .....	22
<b>Abbildung 11:</b> Untersuchung zur MgCl <sub>2</sub> -Abhängigkeit der PECP1.....	23
<b>Abbildung 12:</b> Untersuchung zur pH-Abhängigkeit der PECP1.....	24
<b>Abbildung 13:</b> kinetische Daten der PECP1-Reaktion mit den Substraten Phosphocholin und Phosphoethanolamin.....	25
<b>Abbildung 14:</b> Computergestützte Sekundärstruktur-Vorhersage der AtPECP1 verglichen mit den Sekundär- strukturen der AtPPsPase1 und der HsPHOSPHO1.....	27
<b>Abbildung 15:</b> Bestimmung des nativen Gewichts der AtPECP1 durch Gelfiltration.....	28
<b>Abbildung 16:</b> Untersuchung der Tertiärstruktur der AtPECP1.....	29
<b>Abbildung 17:</b> Kinetische Daten der AtPECP2-Reaktion mit dem Substrat Phosphoethanolamin.....	33
<b>Abbildung 18:</b> Untersuchte T-DNA-Insertionen im Gen <i>PECP1</i> auf dem Chromosom 1.....	35
<b>Abbildung 19:</b> Nachweis der Homozygotie der Arabidopsis T-DNA-Insertionslinien.....	36
<b>Abbildung 20:</b> <i>Southern Blot</i> -Analyse der T-DNA-Insertionslinien.....	38
<b>Abbildung 21:</b> sq-PCR-Analyse der Transkripte des <i>AtPECP1</i> in <i>pecp1-1</i> und <i>pecp1-2</i> -Pflanzen.....	40
<b>Abbildung 22:</b> qRT-PCR-Analyse der relativen Transkriptmengen des <i>PECP1</i> in <i>pecp1-3</i> im Vergleich zu Col-0.....	40
<b>Abbildung 23:</b> Phosphatase-Aktivitätstest mit Phosphoethanolamin als Substrat.....	41
<b>Abbildung 24:</b> Phosphatase-Aktivitätstest mit Phosphocholin als Substrat .....	42
<b>Abbildung 25:</b> Schematische Darstellung des <i>At1g17710 (PECP1)/pGWB20</i> -Konstrukts.....	45
<b>Abbildung 26:</b> qRT-PCR-Analyse der relativen Transkriptmengen des <i>AtPECP1</i> in Überexpressions- pflanzen unter Phosphatversorgung.....	46
<b>Abbildung 27:</b> SDS-PAGE und <i>Western Blot</i> -Analyse der Arabidopsis Überexpressionspflanzen.....	47
<b>Abbildung 28:</b> P <sub>i</sub> -Freisetzung nach Phosphatase-Reaktion mit Phosphoethanolamin.....	49
<b>Abbildung 29:</b> P <sub>i</sub> -Freisetzung nach Phosphatase-Reaktion mit Phosphocholin.....	50
<b>Abbildung 30:</b> Sequenzvergleich der homologen P <sub>i</sub> -Mangel induzierten pflanzlichen Phosphatasen der HAD-Superfamilie.....	52
<b>Abbildung 31:</b> Schemata zur Struktur der pET-22b(+)/Phosphatase-Konstrukte.....	54
<b>Abbildung 32:</b> Sequenzvergleich homologer pflanzlicher Phosphatasen der PHOSPHO1-Subfamilie ver- schiedener Pflanzenspezies.....	59
<b>Abbildung 33:</b> Bioinformatische Verwandtschaftsanalyse der PHOSPHO1-Subfamilie der pflanzlichen HAD- Superfamilie.....	61
<b>Abbildung 34:</b> Genereller katalytischer Mechanismus der HAD-Phosphatasen.....	66

**Abbildung 35:** Synthese und Metabolismus des Ethanolamins und weitere Derivate in Pflanzen.....68

**Abbildung 36:** Modell zur Funktion der PECP1 im P<sub>i</sub>-verarmten Metabolismus von *A. thaliana*.....72

**Abbildung 37:** Kalibriergeraden zur Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe der Methode von Bradford, 1976.....91

**Abbildung 38:** Kalibriergeraden zur Bestimmung von anorganischem Phosphat mit Hilfe der Methode nach Heinonen & Lahti (1981).....92

**Abbildung 39:** Kalibriergeraden zur Bestimmung von anorganischem Phosphat mit Hilfe der Methode nach Zilversmit & Davis (1950).....93

**Abbildung 40:** Schematische Darstellung des Vektors pET-28b(+)......A

**Abbildung 41:** Schematische Darstellung des Vektors pET-22b(+)......A

<b>Tabelle 1:</b> Spezifische Aktivität der PECP1 in Gegenwart verschiedener Substrate .....	21
<b>Tabelle 2:</b> Parameter für die Kinetik der PECP1-Reaktion .....	25
<b>Tabelle 3:</b> Sekundärstruktur-Elemente der AtPPsPase1, der AtPECP1 und der HsPHOSPHO1 .....	26
<b>Tabelle 4:</b> Spezifische Aktivität und theoretische Oligomerstruktur der AtPECP1 nach Gelfiltration .....	30
<b>Tabelle 5:</b> Spezifische Aktivität der PECP2 in Gegenwart verschiedener Substrate .....	32
<b>Tabelle 6:</b> <i>Steady state</i> -Parameter für die Kinetik der AtPECP2-Reaktion .....	33
<b>Tabelle 7:</b> <i>PCR-Primer</i> -Kombinationen und erwartete Produktgrößen .....	36
<b>Tabelle 8:</b> Bestimmung von Phosphocholin, Cholin und Ethanolamin in <i>knock out</i> -Pflanzen .....	44
<b>Tabelle 9:</b> Phosphatase-Aktivität mit PEA in Extrakten der Überexpressionspflanzen .....	48
<b>Tabelle 10:</b> Bestimmung von Phosphocholin, Cholin und Ethanolamin in Überexpressionspflanzen .....	51
<b>Tabelle 11:</b> Parameter zur löslichen Synthese der rekombinanten Proteine aus Pflanzen .....	54
<b>Tabelle 12:</b> Aktivität mit p-NPP, pH-Wert der Reaktion und spezifische Aktivität mit den Substraten PEA und PCho der neuen pflanzlichen Phosphatasen .....	55
<b>Tabelle 13:</b> <i>Steady state</i> -Parameter für die Kinetik der PECP-Hydrolysereaktionen .....	56
<b>Tabelle 14:</b> $K_m$ -Werte von Enzymspezies der HAD-Superfamilie Phosphohydrolasen .....	65
<b>Tabelle 15:</b> Verwendete Plasmide .....	79
<b>Tabelle 16:</b> Verwendete <i>Primer</i> .....	80
<b>Tabelle 17:</b> Verwendete Mikroorganismen .....	81
<b>Tabelle 18:</b> Verwendete Antibiotika .....	81
<b>Tabelle 19:</b> Verwendete Antikörper .....	82
<b>Tabelle 20:</b> Verwendeter Samen der Mutantenlinien .....	85
<b>Tabelle 21:</b> <i>PCR</i> -Ansatz und <i>PCR</i> -Amplifikationsschritte .....	88

## 1. Einleitung

Neuere Schätzungen gehen davon aus, dass die natürlichen Phosphor-Reserven bis 2050 erschöpft sein werden. In den meisten Landökosystemen ist das Pflanzenwachstum durch die geringe Verfügbarkeit an freiem Phosphat ( $P_i$ ) eingeschränkt. Über 70% der terrestrischen Biomasse wächst auf Böden mit niedrigem Phosphat-Gehalt, was auch auf über die Hälfte der landwirtschaftlich genutzten Böden zutrifft. Durch die intensive Bearbeitung der Böden verringert sich das Phosphat-Angebot für die Nutzpflanzen. Das betrifft mehr als 50 % der globalen und 75 % der landwirtschaftlichen Flächen in Afrika (Lynch *et al.*, 2011). Der weltweite Einsatz von preiswertem Phosphor für die Optimierung von Ernteerträgen ist aufgrund der begrenzten Verfügbarkeit dieser Ressource auf etwa 30 % des globalen Ackerlandes beschränkt (Vance *et al.*, 2003). Geringe Vorkommen hochwertigen Phosphors und hohe Energiekosten für die Düngemittelproduktion begrenzen den intensiven Einsatz von Phosphat in den Landwirtschaften armer Länder. Die Entwicklung von Kulturpflanzen, beispielsweise Getreide, mit besseren Fähigkeiten auf Böden mit reduziertem  $P_i$ -Gehalt Ertragssteigerungen zu generieren, könnten das Nahrungsmittelangebot in Entwicklungsländern wesentlich verbessern und in den entwickelten Nationen die Nachhaltigkeit der Landwirtschaft bedeutend erhöhen (Lynch *et al.*, 2011).

### 1.1 Phosphor und seine Bedeutung für Pflanzen

Das Element Phosphor existiert in der Natur als phosphatreiches Mineral, meist als Apatit oder Phosphorit. Die Verwitterung dieser Phosphatgesteine ist die wichtigste natürliche Phosphorquelle und wird nach entsprechender Aufbereitung dem Menschen als Mineraldünger zur Kultivierung von Pflanzen zugänglich. Neben dem mineralischen Vorkommen des Phosphors im Boden gibt es weitere verschiedene Phosphor-Quellen, beispielsweise organische Verbindungen, wie Phytat (Inositolhexakisphosphorsäure). Etwa 20 – 80 % des gebundenen Phosphors im Boden kommen in dieser organischen Form vor und sind somit die Hauptquelle zur Freisetzung von Phosphaten (Schachtman *et al.*, 1998). Als beträchtliche Reserve dienen die im Boden auftretenden pflanzlichen und tierischen Stoffwechsel- und Abbauprodukte, in denen Phosphat-Verbindungen existieren.

Alle lebenden Organismen, so auch die Pflanzen, benötigen Phosphor als Makronährstoff für ihr Wachstum und ihre Entwicklung. Die Steuerung physiologischer Prozesse, beispielsweise die Photosynthese grüner Pflanzen und Cyanobakterien, die Regulierung von Gen- und Enzymaktivitäten, der Ablauf von Signalkaskaden über Phosphorylierungen aktiver Proteinkinasen etc., alle diese Vorgänge sind abhängig vom ausreichend gefüllten Phosphor-Pool der Zelle. Das vollständig oxidierte Phosphat ist eine Schlüsselkomponente im Primärstoff- und Energiestoffwechsel wichtiger Intermediate der Nukleinsäuren und Phospholipide. Die Aufnahme des Orthophosphats ist ein Problem für Pflanzen, denn trotz des reichhaltig vorkommenden Bodenphosphors, ist der lösliche Phosphat-Anteil im Bodenwasser ungefähr 1000fach geringer als andere erforderliche Ionen (Ticconi & Abel, 2004). Zur verbesserten Löslichkeit der Nährstoffe und besonders des Phosphats aus seinen Komplexen,

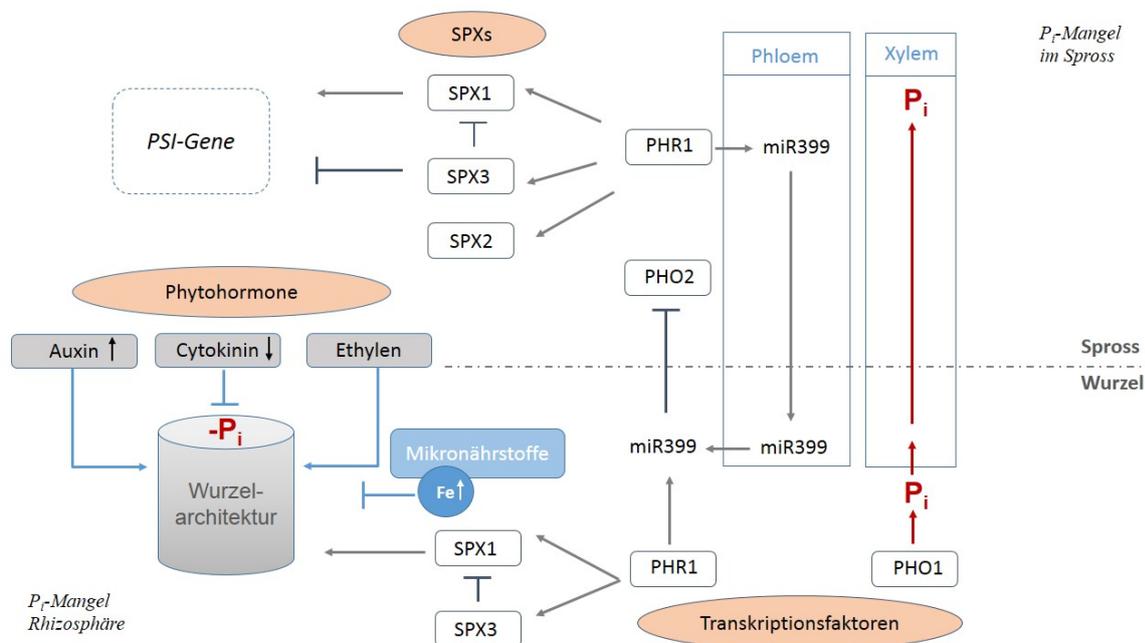
haben manche Pflanzenarten ein dichtverzweigtes Proteoidwurzelsystem entwickelt (Watt & Evans, 1999). Dieses Wurzelsystem fördert über die Abgabe von organischen Säuren, meist Zitronensäure, die Senkung des Boden-pH-Wertes. Über diese Ansäuerung des Bodens können die Salze aus ihren Komplexen gelöst werden. Es konnte unter anderem in *Lupinus albus* gezeigt werden, dass die Proteoidwurzeln spezifische saure Phosphatasen exsudieren, welche nachfolgend das Phosphat aus den organischen Verbindungen freisetzen (Adams & Pate, 1992). Die für die Pflanzen zugängliche lösliche Phosphat-Konzentration beträgt im Bodenwasser etwa 10  $\mu\text{M}$  (Marschner, 1995). Die in Lösung vorliegende Phosphat-Form ist abhängig vom pH-Bereich. Die Dissoziation der Orthophosphorsäure ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) im sauren Milieu zu  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  hat einen  $\text{p}K_s$ -Wert von 2.1 und im neutralen Milieu zu  $\text{HPO}_4^{2-}$  einen  $\text{p}K_s$ -Wert von 7.2 (Schachtman *et al.*, 1998). Das im sauren Bodenwasser vorliegende  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  kann nachfolgend ins Innere der Pflanzen transportiert werden. Neben der begünstigten Zufuhr an Phosphat, konnte die Mobilisierung von Mikronährstoffen wie Eisen und Mangan als ein weiterer positiver Effekt des Proteoid-Wurzelsystems gezeigt werden (Braun & Helmke, 1995).

Nach der Bereitstellung des Phosphats durch die Pflanzenwurzeln, wird dieses aktiv in die epidermalen und kortikalen Zellen der Wurzeln befördert (Jia *et al.*, 2011). Die identifizierten pflanzlichen Phosphattransporter-Gene sind in vier Familien (*Pht1* bis *Pht4*) klassifiziert, variieren in ihrer subzellulären Lokalisation (*Pht1* Plasmamembran; *Pht2* Chloroplast; *Pht3* Mitochondrien; *Pht4* Golgi-Apparat) und weisen damit auf ihre unterschiedlichen biologischen Funktionen hin (Rausch & Bucher, 2002). Ist das Phosphat in den kortikalen Zellen der Wurzeln angekommen, so muss es in den apoplastischen Raum des Xylems geladen werden. Anschließend werden die Pflanzenorgane über den Xylem- und Phloemstrom mit Phosphat versorgt (Marschner 1995; Jia *et al.*, 2011). Der Transport erfolgt stets von den Wurzelzellen zu den neu gebildeten Blättern. Der Einbau des anorganischen Phosphats in organische Verbindungen des pflanzlichen Stoffwechsels erfolgt außerordentlich schnell. Bei ausreichender  $\text{P}_i$ -Versorgung bleibt der Phosphat-Pool im Zytoplasma der Pflanzenzelle konstant. Ein Teil des Phosphats wird in Form des  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  im sauren Milieu der Vakuole gespeichert und dient als  $\text{P}_i$ -Puffer zum Ausgleich der  $\text{P}_i$ -Homöostase. Erst beim Sinken der zytosolischen  $\text{P}_i$ -Konzentration wird diese Reserve angegriffen und steht der Synthese neuer Organophosphorverbindungen zur Verfügung (Lee & Ratcliffe, 1993).

## 1.2 Adaptationen der Pflanzen an Phosphat-Limitierung

### 1.2.1 Allgemeine Aspekte

In allen Organismen ist eine ausreichende Phosphataufnahme und Phosphatbereitstellung die Grundvoraussetzung für einen funktionierenden Energie- und Stoffwechsel. Bei Pflanzen haben sich in art-abhängigen Grenzen morphologische, physiologische und biochemische Adaptationen entwickelt, die ein Überleben unter Phosphat-Limitierung ermöglichen (Abel *et al.*, 2002; Yang & Finnegan, 2010). Zur Sicherung von adäquaten Phosphat-Konzentrationen werden eine Reihe von Reaktionen ausgelöst, darin enthalten sind Modifikationen der Wurzelarchitektur, Veränderungen der Membranstruktur und des Kohlenstoff-Metabolismus, Sekretion von organischen Säuren, Protonen und Enzymen, wie Phosphatasen und Nukleasen, Akkumulation von Anthocyanen, und eine veränderte Genexpression von einer Anzahl in die  $P_i$ -Adaptation involvierter Gene, wodurch die Beschaffung und Verwertung von  $P_i$  erleichtert wird (Raghothama, 1999; Vance *et al.* 2003; Rouached *et al.*, 2010). Die ablaufenden transkriptionellen und posttranskriptionellen Regulationen sind in einem Netzwerk organisiert, welches aus den Schaltungen seiner Elemente nachfolgend verschiedenartige biochemische und metabolische Antworten zum Ausgleich des  $P_i$ -Stresses bereithält. Der Umfang und die Komplexität dieses Netzwerkes machen es für Pflanzen unabdingbar, den aktuellen  $P_i$ -Status zu registrieren und die adaptiven Reaktionen koordiniert zu regulieren. Die Abbildung 1 zeigt einen Ausschnitt der Phosphatmangel-Antwort in Pflanzen. Es sind Adaptationsreaktionen auf regulatorischer und transkriptioneller Ebenen dargestellt.



**Abbildung 1: Ausschnitt der regulatorischen Phosphatmangel-Antwort in Pflanzen.**

Das Schema (Hammond & White, 2011, stark abgeändert) repräsentiert die Verflechtung verschiedener regulatorischer Pfade bei der Beantwortung von Phosphat-Stress in Pflanzen. Es ist die  $P_i$ -verarmte Rhizosphäre und der  $P_i$ -verarmte Sprossbereich gezeigt, welcher in Phloem- und in Xylem-Abschnitt unterteilt ist. Darin existierende Verbindungen zwischen den  $P_i$ -Mangel regulatorischen Pfaden oder den molekularen Elementen sind mit Pfeilen und Linien dargestellt. Eine positive rückgekoppelte Regulationsfunktion ist mit einem Pfeilende und eine negative rückgekoppelte Regulationsfunktion mit einem Querstrichende gekennzeichnet. Pfeile innerhalb der Boxen zeigen den Anstieg  $\uparrow$  und den Abfall  $\downarrow$  des jeweiligen Elementes unter  $P_i$ -Defizit.

### 1.2.2 Veränderung des Wurzelsystems unter Phosphat-Defizit

Die Wurzel ist neben der Sprossachse und dem Blatt eines der drei Grundorgane aller Gefäßpflanzen. Über das essentielle Wurzelsystem werden wichtige gelöste Nährstoffe und vor allem Wasser in das Pflanzeninnere transportiert. Pflanzen, welche sich an eine Phosphat-verarmte Rhizosphäre anpassen und darin wachsen, zeigen eine veränderte Wurzelarchitektur. Die morphologisch veränderten Wurzeln dieser  $P_i$ -verarmten Pflanzen besitzen neue Eigenschaften, welche die Phosphat-Akquise und die Beschaffung anderer essentieller Nährstoffe aus dem Boden erhöhen. So sind unter anderem eine verstärkte Lateralwurzelentwicklung und eine erhöhte Wurzelhaarbildung bzw. eine Wurzelhaarverlängerung nachgewiesen (Osmont *et al.*, 2007; Desnos, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass die Verlängerung der Primärwurzel sich verlangsamt (Linkohr *et al.*, 2002) und diese dadurch stark reduziert ist (Williamson *et al.*, 2001; Sánchez-Calderon *et al.*, 2005).

Die Veränderung des Wurzelsystems  $P_i$ -verarmter Pflanzen ist so weitreichend, dass die Pflanzen in der Lage sind, den externen  $P_i$ -Status des Bodens sensorisch mit Hilfe ihrer Wurzelspitzen zu erfassen (Williamson *et al.*, 2001). Es konnte gezeigt werden, dass die lokale Erfassung des aktuellen Phosphat-Status über die Wurzelspitzen zur Anpassung der Aktivitäten des apikalen Wurzelmeristems führt (Ticconi *et al.*, 2009).

Jüngste Studien erläutern, dass die Erfassung des lokalen externen  $P_i$ -Status der Rhizosphäre indirekt über die komplexen chemischen Interaktionen zwischen Phosphat und seinen assoziierten Metallkationen, im aktuellen Fall Eisen, in der Rhizosphäre erfolgen könnte (Svistoonoff *et al.*, 2007; Abel, 2011). Einige Untersuchungen berichteten über antagonistische Interaktionen zwischen einer erhöhten Eisen-Akkumulationen in Wurzeln und Stängeln von  $P_i$ -verarmten Arabidopsis- und Reispflanzen (Misson *et al.*, 2005; Hirsch *et al.*, 2006; Ward *et al.*, 2008; Zheng *et al.*, 2009). Es konnte gezeigt werden, dass experimentell entzogenes Eisen aus  $P_i$ -Mangel-Kulturmedien von Pflanzen dem inhibitorischen Effekt des Primärwurzelwachstums entgegenwirkt (Ward *et al.*, 2008). Das Stagnieren des Primärwurzelwachstums unter  $P_i$ -Limitierung ist vermutlich ein Ergebnis des ansteigenden Eisen-Spiegels und seiner zellulären Toxizität.

Einen entscheidenden Einfluss auf die Wurzelveränderungen zur  $P_i$ -Akquise hat die Balance zwischen den Phytohormonen Cytokinin, Ethylen und Auxin (Abb. 1). Um ein Pflanzenorgan zu erweitern, zu verlängern oder ein verändertes partikuläres Entwicklungsprogramm, wie die Verdichtung der Wurzelhaare, zu etablieren, müssen Pflanzen Mechanismen entwickeln, die stark an die Perzeption von Umweltreizen gekoppelt sind. Viele dieser Pflanzenantworten auf Umweltfaktoren sind über Auxin und Ethylen vermittelt (López-Bucio *et al.*, 2005; Nancy *et al.*, 2005). López-Bucio und Kollegen konnten 2002 den Effekt von Auxin unter  $P_i$ -Limitierung erklären, wobei es bei Phosphat-Defizit zu einem Anstieg der Auxin-Konzentration mittels einer gesteigerten Auxin-Synthese kommt und/oder die Abänderung des polaren Auxin-Transportes zu einer Veränderung der Wurzelarchitektur führt. Zusätzlich zum Phytohormon Auxin stimulieren die Hormone Ethylen und Gibberellinsäure die Lateralwurzel- und Wurzelhaarbildung und die Reduktion der Primärwurzel (Jiang *et al.*, 2007).

### 1.2.3 Regulatorische und transkriptionelle Anpassungen bei P<sub>i</sub>-Defizit

Umfassende Transkriptom-Analysen identifizierten Gruppen von Genen, welche zum einen durch die veränderte Wurzelentwicklung lokal reguliert werden und zum anderen durch metabolische Anpassungen systemisch reguliert werden. In der Modellpflanze *Arabidopsis thaliana* werden zum Beispiel etwa 900 bis 3000 Gene in einer umfassenden Phosphatmangel-Antwort reguliert, wobei der Transkriptionsfaktor PHR1 dabei eine direkte Kontrollfunktion bei der Generegulation ausübt (Thibaud *et al.*, 2010; Bustos *et al.*, 2010). Unter Phosphatmangel-Antwort wird in der vorliegenden Arbeit eine komplexe Reaktion der Pflanze auf ein Phosphat-Defizit verstanden, welches zahlreiche Komponenten umfasst. In der Abbildung 1 ist ein Ausschnitt des regulatorischen Systems dargestellt und soll einen Einblick in die Komplexität der Regulation ermöglichen. Verschiedenste Gene werden durch den Transkriptionsfaktor PHR1 aktiviert, beispielsweise die micro-RNA miR399. Diese kleinen RNA-Moleküle sind nur 20 – 24 Nukleotide lang und besitzen eine wichtige Funktion bei der geregelten Verteilung des Phosphats von der Wurzel zum Spross (Kuo & Chiou, 2011). Das *Arabidopsis* Genom kodiert für sechs P<sub>i</sub>-Mangel induzierte miR399-Gene (Aung *et al.*, 2006). Diese miR399-Gene regulieren die P<sub>i</sub>-Homöostase über die Expression des Ubiquitin E2-konjugierenden Enzyms PHO2/UBC24 (Abb.1). In Studien mit *Arabidopsis pho2*-Mutantpflanzen konnte gezeigt werden, dass es zur Akkumulation von Phosphat in Blättern und Stängeln kommt, wenn eine *non-sense*-Mutation im miR399-Zielgen vorliegt (Aung *et al.*, 2006). Die Überexpression der miR399 in den Mutantpflanzen resultierte in einem übermäßigen Anstieg von Phosphat im Stängel, wenn diese Pflanzen unter P<sub>i</sub>-Defizit wuchsen (Bari *et al.*, 2006).

Die systemische Aktivität des Transkriptionsfaktor PHR1 wird vermutlich über eine posttranslationale SUMOylierung gesteuert (Miura *et al.*, 2005). Über die Aktivierung der miR399 und verschiedener *non-coding* RNAs, welche wiederum die PHO2 Expression regulieren, aktiviert der Transkriptionsfaktor PHR1 nachfolgend die *Phosphate-Starvation-Inducible* (PSI)-Gene, welche dann eine biochemische Antwort unter P<sub>i</sub>-Defizit auslösen (Ticconi & Abel, 2004).

Eine große Anzahl von Proteinen, die unter der Kontrolle des Transkriptionsfaktors PHR1 stehen, sind nach dem Hefe-Protein Syg1Pho81 und dem humanen Protein XPR1, benannt wurden. Sie besitzen eine intrinsische **SPX**-Proteindomäne und sind direkt oder indirekt mit der Phosphat-Homöostase verbunden. Das *A. thaliana* Genom kodiert für 20 Gene mit SPX-Domäne, welche in 4 Subfamilien eingeteilt sind (Duan *et al.*, 2008). Die SPX-Proteine: PHO1, SPX1, SPX2, SPX3 und SPX4 sind bisher über verschiedene Analysen charakterisiert worden (Hamburger *et al.*, 2002; Duan *et al.* 2008), wobei das PHO1-Protein für die P<sub>i</sub>-Beladung der Wurzel in die Xylem-Gefäße verantwortlich ist (Abb. 1). Die *PHO1*-Genfamilie in *Arabidopsis* enthält 11 homologe Vertreter, welche unter P<sub>i</sub>-Limitierung sowohl in der Wurzel als auch im Stängel exprimiert werden (Stefanovic *et al.*, 2007). Die SPX-Proteine, SPX1 und SPX3, sind ebenfalls direkt involviert in die pflanzliche Adaptations-Antwort unter Phosphat-Stress (Abb. 1). SPX1 ist im Zellkern lokalisiert und ist vermutlich für die transkriptionelle Aktivierung von Genen verantwortlich, welche für die P<sub>i</sub>-Mobilisierung und für die

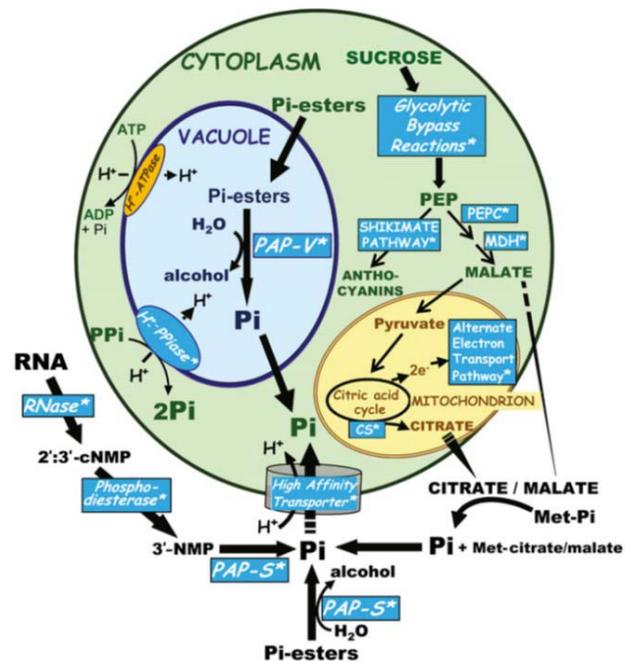
Beseitigung von reaktiven sauerstoffhaltigen Spezies verantwortlich sind. Zur Steuerung dieser transkriptionellen Mechanismen könnte SPX3 eine negativ rückgekoppelte Regulationsfunktion auf die Expression des SPX1 haben (Duan *et al.*, 2008).

#### **1.2.4 Metabolische Stressantwort der Pflanze auf P<sub>i</sub>-Mangel**

Die *Phosphate Starvation Response* (PSR) umfasst hunderte koordiniert induzierte PSI-Gene, welche für Enzyme kodieren, die bevorzugt intern gebundenes Phosphat benutzen, um die fehlende externe Phosphat-Bereitstellung zu kompensieren und somit die P<sub>i</sub>-Homöostase ausbalancieren (Lin *et al.*, 2009; Nilsson *et al.*, 2010; Plaxton & Tran 2011).

Die PSR-Mechanismen sind vielschichtig. So wird neben intern gebundenem P<sub>i</sub> auch extern gebundenes P<sub>i</sub> für die Pflanze zugänglich gemacht. Beispielsweise werden organische Säuren wie Malat und Citrat in die Rhizosphäre abgegeben, wo sie mit Metall-Ionen (Al<sup>3+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Fe<sup>3+</sup>) Chelat-Komplexe bilden und somit das gebundene P<sub>i</sub> aus den verschiedenen Verbindungen lösen (Plaxton & Tran, 2011). Der Export dieser Säuren erfolgt entweder über aktive Membranpumpen, die durch H<sup>+</sup>-ATPasen im Plasmalemma angetrieben werden oder über passive Transporte durch Tunnel-ähnliche Transporter (Yan *et al.*, 2002; Diatloff *et al.*, 2004). Die PSR-Enzyme bewirken die Freisetzung von organisch gebundenem Phosphor aus vielerlei Quellen, beispielsweise aus der Bodenmatrix, von pflanzlichen Speichergeweben, seneszenten Organen und intrazellulären Kompartimenten. Eine Gruppe dieser Enzyme sind die extrazellulären, die vakuolär lokalisierten und die intrazellulären PSI-Hydrolasen. Vertreter sind unter anderen die T2-Typ-Ribonukleasen, die *purple acid*-Phosphatasen und die zytosolischen löslichen Phosphatasen (Köck *et al.*, 1995; Bosse & Köck, 1998; Abel *et al.*, 2000; Miller *et al.*, 2001; Ticconi & Abel 2004; Tran *et al.*, 2010).

Die Abbildung 2 zeigt ein Modell der verschiedenen Vernetzungen der metabolischen PSR-Prozesse.



**Abbildung 2: Modell der metabolischen Phosphatmangel-Antwort in Pflanzen.**

Das Modell wurde aus Plaxton & Tran (2011), *Plant Physiology* 156, 1006-1015 entnommen.

Es sind verschiedene Adaptationsreaktionen gezeigt, die die  $P_i$ -Homöostase  $P_i$ -verarmter Pflanzen auf metabolischer Ebene regulieren. Die in der Abbildung dargestellten Enzyme sind die verschiedenen PSR-Hydrolasen (Nukleasen und Phosphatasen). Dabei sind die Purple Acid-Phosphatasen (PAP) extrazellulär (PAP-S\*) bzw. vakuolär lokalisierte Enzyme (PAP-V\*).

Eine interne Phosphat-Quelle zur Remobilisierung von Phosphat ist in den Phospholipidmembranen enthalten. In der Phosphatmangel-Situation wird mit Hilfe von  $P_i$ -Mangel aktivierten Phospholipasen Phosphat aus diesen Membranen freigesetzt (Plaxton & Tran, 2011). In Pflanzen haben die verschiedenen Membranen eine sehr unterschiedliche Lipidzusammensetzung. So bestehen die chloroplastidären Thylakoidmembranen und auch die Hüllmembranen vorwiegend aus Galacto- und Sulfolipiden (Essigmann *et al.*, 1998). In den Membranen der Mitochondrien und in der Plasmamembran sind diese Lipide nicht vertreten. Dort wird die Membran aus Phospholipiden gebildet (Andersson *et al.*, 2003; Heldt & Piechulla, 2008). Die Phospholipide der extraplastidischen Membranen werden bei starker  $P_i$ -Limitierung reduziert und durch amphipathische Galacto- und Sulfolipide ersetzt (Ticconi & Abel, 2004; Plaxton & Tran, 2011). Dieser Austausch wurde in *A. thaliana pho1*-Mutantpflanzen beobachtet, welche einen reduzierten  $P_i$ -Gehalt in ihren Blättern enthielten. Dieser Effekt ist auf den Verlust der PHO1-Funktion zurückzuführen, die, wie bereits in 1.2.3 erwähnt, für die  $P_i$ -Beladung in die Xylem-Gefäße in den oberirdischen Geweben der Wurzel verantwortlich ist. Die Extrakte dieser Blätter offenbarten einen reduzierten Phospholipidgehalt und einen angestiegenen Galacto- und Sulfolipidgehalt (Poirier *et al.*, 1991; Essigmann *et al.*, 1998). Das Umgestalten der Membran von Phospholipiden zu Galactolipiden ist ein Prozess, welcher gleichzeitig aus der Phospholipid-Hydrolyse und der Galactolipid-Biosynthese besteht (Nakamura, 2013). Die Hydrolyse der Phospholipide erfolgt durch die Phospholipasen A, C und D (Valentin & Lambeau,

2000), wobei die Phospholipasen C und D in die Phosphatmangel-Antwort involviert sind (Gaude *et al.*, 2008; Plaxton & Tran, 2011).

Im Genom von *A. thaliana* sind bereits sechs putative Phospholipase C-Gene identifiziert, wobei eines dieser Gene, *NPC4*, eine starke transkriptionelle Aktivität unter  $P_i$ -Limitierung aufweist (Nakamura *et al.*, 2005). Subzelluläre Lokalisierungsanalysen zeigten, dass das NPC4-Protein in der Plasmamembran angereichert ist. Die Analysen von *npc4*-Mutantpflanzen, bei denen die Phospholipase-C-Aktivität unter  $P_i$ -Defizit massiv reduziert ist, verdeutlichten die wichtige Funktion der NPC4 unter  $P_i$ -Mangel (Nakamura *et al.*, 2005).

Des Weiteren wird von einer  $P_i$ -Mangel aktivierten Phospholipase C5, NPC5, berichtet (Gaude *et al.*, 2008). Dieses Enzym ist in Arabidopsis-Blättern aktiviert und spaltet die Substrate Phosphatidylethanolamin und Phosphatidylcholin. Nach der Abspaltung dieser phosphorylierten Kopfgruppen können die Moleküle Phosphatidsäure und Diacylglycerol zur Synthese der Galacto- und Sulfolipide eingesetzt und die Neugestaltung der Membran generiert werden (Gaude *et al.*, 2008).

Die unter  $P_i$ -Defizit in *A. thaliana* gebildeten PSI-Phospholipasen PLD1 und PLD2 sind möglicherweise in die Regulierung des Umbaus der Wurzelmembranen involviert und setzen durch ihre Spaltaktivität ebenfalls Diacylglycerin für die Synthese der Galacto- und Sulfolipide frei (Plaxton & Tran, 2011).

#### 1.2.4.1 $P_i$ -Mangel induzierte extrazelluläre *Purple Acid-Phosphatasen*

Die bisher am besten charakterisierte pflanzliche PSR-Enzymfamilie der extrazellulären sauren Phosphatasen sind die *Purple Acid-Phosphatasen* (PAPs). Sie gehören in die Superfamilie der Metallophosphoesterasen, welche über die Koordination mit einem Fe(III)-Liganden in Lösung eine rötliche Farbe zeigen und deshalb als „rote“ Phosphatasen bezeichnet werden (Olczak *et al.*, 2003). Eukaryotische *Purple Acid-Phosphatasen* existieren mannigfaltig als Isoenzyme in einer umfangreichen Anzahl von Geweben oder zellulären Kompartimenten. Ihre Funktion ist die Bereitstellung, der Transport und die Wiederverwertung von Phosphat unter  $P_i$ -limitierenden Bedingungen. Verschiedene Studien zeigten, dass sie vorrangig eine Funktion beim Recycling von Phosphat aus Phosphomonoestern und Phosphoanhydriden besitzen (Bozzo *et al.*, 2004; Zimmerman *et al.*, 2004; Zhu *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 2009). Die in der Abbildung 2 dargestellten PAP-Enzyme hydrolisieren unspezifisch ein breites Spektrum an Phosphomonoestern in einem weit umspannenden pH-Reaktionsbereich (Duff *et al.*, 1994). Daneben fand man auch PAP-Vertreter, die als Phosphoprotein-Phosphatasen und Exonukleasen fungieren (Zhu *et al.*, 2002; Olczak *et al.*, 2003).

Das Arabidopsis-Genom kodiert für 29 verschiedene *Purple Acid-Phosphatasen*, deren Expression durch verschiedene Entwicklungs- und Umweltfaktoren beeinflusst wird (Tran *et al.*, 2010). Die am höchsten unter  $P_i$ -Defizit induzierten *A. thaliana Purple Acid-Phosphatasen* sind die Isoenzyme AtPAP12 und AtPAP26. Sie funktionieren hauptsächlich als Wurzel-sekretierte saure Phosphatasen

und akquirieren vorrangig Phosphat aus dem Substrat Phosphoenolpyruvat (Tran *et al.*, 2010). In der  $P_i$ -Mangel-Situation hat eine der beiden untersuchten Phosphatasen, AtPAP26, neben ihrer extrazellulären Funktion auch eine zweite intrazelluläre Aufgabe zu erfüllen, indem sie vakuoläres Phosphat wiederverwertet (siehe Abb. 2). Ein besseres Verständnis zur Funktion der beiden PAP-Phosphatasen konnte mit Hilfe von *atpap26* und *atpap12* Mutantpflanzen erreicht werden. AtPAP26 ist für die effiziente Ernährung der Arabidopsis-Pflanze unter  $P_i$ -Mangel verantwortlich und ist der prinzipielle Phosphat-Beschaffer in dieser Situation (Hurley *et al.*, 2010).

#### 1.2.4.2 $P_i$ -Mangel induzierte intrazelluläre Phosphatasen

Ein entscheidender Mechanismus zum Schutz der systemischen Phosphat-Homöostase ist die unmittelbare Freisetzung von Phosphat aus intrazellulär lokalisierten phosphorylierten Substanzen durch  $P_i$ -Mangel aktivierte Phosphohydrolasen. Stenzel *et al.* (2003) konnten mit Hilfe von Tomatenzellkulturen Kandidaten für solche intrazellulären Phosphatasen bestimmen, welche aufgrund abweichender Strukturelemente nicht zu den Vertretern der vakuolären *Purple Acid*-Phosphatasen gehörten. Über das *Screening* einer cDNA-Bibliothek isolierten sie die aus drei Genen bestehende *Psi14*-Genfamilie und ordneten sie in die LePS2-Familie (*L. esculentum* Phosphatase2) ein. In einer parallelen Studie wurde das Genprodukt von *Psi14C*, die LePS2;1 (*L. esculentum* Phosphatase2;1), als saure Phosphatase charakterisiert. Sie besitzt im optimalen pH-Bereich von 4 – 5 mit dem artifiziellen Substrat para-Nitrophenylphosphat  $P_i$ -freisetzende Aktivität (Baldwin *et al.*, 2001). Untersuchungen zur transkriptionellen Aktivierung der *Psi14* – Gene zeigte, dass bereits nach 12 Stunden Kultivierung der Tomatenzellen unter  $P_i$ -Defizit eine hohe relative Transkriptmenge dieser Gene nachzuweisen war (Stenzel *et al.*, 2003). Interessanterweise verschwand die transkriptionelle Aktivierung der *Psi14*-Gene bereits eine Stunde nach Phosphat-Zugabe. Dadurch konnte gezeigt werden, dass eine rasche Beantwortung des abiotischen Stresses über die Aktivierung spezifischer PSI-Gene möglich ist und diese nur zur aktuellen Erfordernis angeschaltet werden. Eine Funktion der LePS2;1 als Proteinphosphatase konnte mit einem rekombinanten GST-Fusionsprotein gezeigt werden (Baldwin *et al.*, 2008).

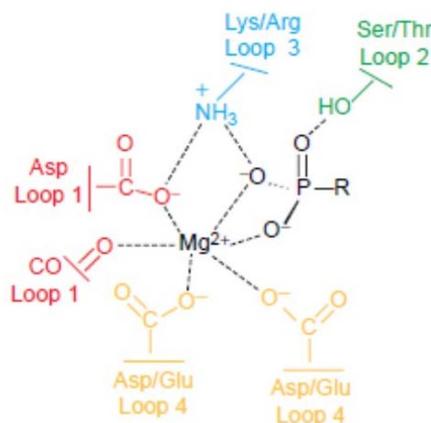
In der verwandten Kartoffelpflanze konnte mit Hilfe der cDNA-AFLP-Technik ein Fragment isoliert werden, dessen korrespondierendes *StPPP*-Gen signifikante Sequenzhomologien zu Genen verschiedener saurer Phosphatasen aufwies (Petters *et al.* 2002). Die Sequenz besaß auf Nukleotid- und Proteinebene etwa 90 % Homologie zur  $P_i$ -induzierten sauren Phosphatase LePS2;1 aus Tomate und enthielt die gleichen konservierten Domänen. Eine transkriptionelle Aktivierung von *StPPP* bei  $P_i$ -Defizit wurde bestätigt (Petters *et al.*, 2002). Untersuchungen zur enzymatischen Aktivität sind bisher nicht bekannt. Die Proteine aus Tomate und Kartoffel besitzen drei kurze Sequenzmotive, die vermuten lassen, dass es sich um Vertreter der HAD-Superfamilie handelt (Koonin & Tatusov, 1994).

Von dieser Superfamilie ist bekannt, dass sie viele Phosphatasen enthält. Weitere Studien berichteten über die  $P_i$ -Mangel aktivierte Transkription strukturell verwandter Gene aus der Gartenbohne, *PvHAD1* (*P. vulgaris Haloacid Dehalogenase1*) und *PvPS2* (*P. vulgaris phosphate starvation induced phosphatase2*). Unter der Verwendung eines GST-Fusionsproteins konnte der *PvHAD1* eine Aktivität als Serin/Threonin-Phosphatase zugeordnet werden (Liu *et al.*, 2010). Das zweite Gen *PvPS2* wurde ebenfalls über das *Screenen* einer substraktiven cDNA-Bank als  $P_i$ -Mangel induziertes Gen isoliert. Untersuchungen auf Proteinebene erfolgten nicht (Tian *et al.*, 2007). Ein weiteres Pflanzengewebe wurde aus Reis isoliert. Das Gen *OsACP1* (*Oryza sativa Acid Phosphatase1*) wird bereits nach einem Tag Kultivierung der Reispflanzen unter Phosphatmangel transkriptionell aktiviert (Hur *et al.*, 2007). Untersuchungen auf Proteinebene ergaben, dass das Genprodukt des *OsACP1* das artifizielle Substrat para-Nitrophenylphosphat bei pH 5.6 hydrolysieren kann (Hur *et al.*, 2007). Weitere enzymatische Analysen dieser Phosphatase sind nicht bekannt.

Über *Microarray*-Analysen konnten zwei Gene, *Atlg73010* und *Atlg17710*, in *Arabidopsis thaliana* identifiziert werden, die unter Phosphatmangel am höchsten transkriptionell aktiviert werden (Müller *et al.* 2007, Morcuende *et al.* 2007). Diese beiden Gene sind homolog zur LePS2-Genfamilie in Tomate. In eigenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass durch die Expression des Gens *Atlg73010* in der *Arabidopsis*-Pflanze bereits nach 6 Stunden Phosphatmangel eine hohe Transkriptmenge vorhanden war, welche nach Phosphat-Zugabe rasch wieder verschwand (May *et al.*, 2011). Dieses Gen kodiert für eine  $P_i$ -Mangel aktivierte anorganische Pyrophosphatase und wurde als *AtPPsPase1* (*A. thaliana Pyrophosphat spezifische Phosphatase1*) benannt. Die Untersuchung der Substratspezifität ergab, dass die  $Mg^{2+}$ -abhängige *AtPPsPase1* Natrium-Pyrophosphat hoch spezifisch umsetzt ( $0.43 \text{ nmol Pi min}^{-1} \mu\text{g}^{-1}$ ). Der  $K_m$ -Wert für die  $PP_i$ -hydrolysierende Reaktion der *PPsPase1* beträgt  $38.8 \mu\text{M}$ , was darauf hindeutet, dass Natrium-Pyrophosphat das natürliche Substrat der *PPsPase1* in der Pflanze sein könnte (May *et al.*, 2011). Das zweite  $P_i$ -Mangel Gen *Atlg17710* ist bisher enzymatisch nicht charakterisiert worden. Unsere vorläufigen Analysen in Datenbanken ergaben, dass es ein drittes Gen (*At4g29530*) mit hoher Homologie zu den beiden genannten Genen gibt. Informationen zu einer transkriptionellen Aktivierung gibt es bisher nicht.

### 1.2.4.3 Die Haloacid Dehalogenase (HAD)-Superfamilie

Die Haloacid-Dehalogenase (HAD)-Superfamilie ist eine große Superfamilie ubiquitär vorkommender Enzyme (> 19.000 bekannte Proteine), die in den Proteomen der drei großen Bereiche der Lebewesen repräsentiert wird. Eine große Anzahl dieser Enzyme fand man beispielsweise in *Escherichia coli* (28), in *Mycobacterium tuberculosis* (30), in *Caenorhabditis elegans* (84), in *Arabidopsis thaliana* (169) und in *Homo sapiens* (183). Die Superfamilie umfasst Enzyme der namensgebenden Haloacid-Dehalogenasen (HADs), der Phosphonatasen, der P-typ ATPasen, der Phosphomutasen und der Phosphat-Monoesterhydrolasen (Phosphatasen), wobei die ATPasen mit etwa 20 % vertreten sind und die Phosphatasen die umfangreichste Klasse mit einem Anteil von etwa 79 % bilden (Allen & Dunaway-Mariano, 2004 und 2009). Die gemeinsamen Sequenzmotive der HAD-Superfamilie konnten mit Hilfe von Computeranalysen entschlüsselt werden (Koonin & Tatusov, 1994). Durch das schrittweise Absuchen des offenen Leserahmens einer Anzahl von unbekanntem Enzymen fand man im aktiven Zentrum einige konservierte Aminosäuren, die in drei verschiedenen Motiven eingeordnet sind (siehe Abbildung 3). Die bisher charakterisierten HAD-Enzyme zeigen einen gemeinsamen Katalyse-Mechanismus, indem sie die Spaltung von C-Cl-, C-OP- und C-P-Bindungen katalysieren (Kuznetsova *et al.*, 2006). Über Kristallstrukturen, beispielsweise die *X-ray*-Struktur der Phosphoserin-Phosphatase *MjPSP* von *Methanococcus jannaschii* (Wang *et al.*, 2001), konnten drei konservierte **Sequenzmotive 1-3** charakterisiert werden, welche die Kerndomäne umfassen. Die Gesamthomologie der Proteine ist gering und beschränkt sich innerhalb der HAD-Superfamilie auf diese drei Motive.



**Abbildung 3: Katalytische Motive der HAD-Superfamilie.**

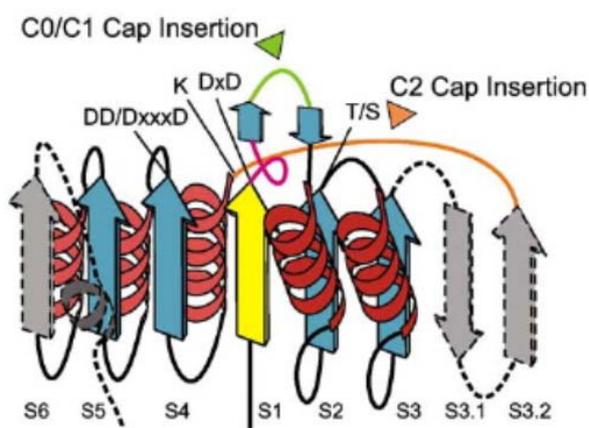
Das Konstrukt wurde aus Burroughs *et al.* (2006), *J. Mol. Biol.* 361, 1003-1034 entnommen und zeigt die an der Katalyse beteiligten konservierten Aminosäuren der charakteristischen HAD-Motive 1, 2 und 3. Der Phosphoryltransfer wird über ein essentielles  $Mg^{2+}$ -Ion koordiniert.

#### HAD-Superfamilie Konsens:

<b>Motiv 1</b>	<b>Motiv 2</b>	<b>Motiv 3</b>
<b>DxDx (T/V)</b>	<b>(S/T)</b>	<b>K-x (18/30) – (G/S; D/S) x3 (D/N)</b>

Im **Motiv 1** sind zwei nukleophile Aspartat-Reste vorhanden, wobei das erste Aspartat für die Bildung des Aspartat-Phosphoryl-Intermediats im aktiven Zentrum essentiell ist. Studien zur ortsspezifischen Mutagenese, bei denen das erste Aspartat zugunsten einer anderen Aminosäure ausgetauscht wurde, führten bei der *A. thaliana* Pyrophosphatase (May *et al.*, 2011) und bei weiteren HAD-Enzymen zum Totalausfall der Enzymaktivität (Maruyama & MacLennan, 1988; Kurihara *et al.*, 1995; Collet *et al.*, 1999; Selengut, 2001). Im **Motiv 2** befindet sich ein Serin- bzw. Threonin-Rest als Phosphoryl-Bindestelle und im **Motiv 3** sind ein Lysin- bzw. ein Arginin-Rest und ein weiterer Carboxylat-Rest als Metallbindestelle enthalten (Koonin & Tatusov, 1994).

Enzyme, die zur HAD-Superfamilie gehören, besitzen vielfältigste Substratspezifitäten. Aus diesem Grunde wurden als weitere Kriterien für die Klassifizierung der Enzyme innerhalb der Superfamilie charakteristische Strukturmerkmale herangezogen. Alle Proteine der HAD-Superfamilie besitzen in ihrer Kerndomäne eine Rossmann-Faltung, welche in der Abbildung 4 dargestellt ist. Unterschiede zwischen allen Enzymen sind variable Bereiche, die allgemein als *Cap*-Insertionen bezeichnet werden. Es existieren drei verschiedene *Cap*-Varianten: C0, C1 (Abb. 4, in Grün) und C2 (in Orange). Die Positionen der wichtigen katalytischen Aminosäuren der **Motive 1 – 3** in der Rossmann-Kerndomäne sind in der Abbildung 4 ebenfalls dargestellt. So befinden sich die beiden Aspartate des **Motivs 1** zu Beginn einer vorgelagerten einzelnen Helix (in Pink). Im Anschluss daran sind zwei antiparallele  $\beta$ -Faltblätter (in Blau) lokalisiert. Proteine, die zwischen den antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern mehrere Helices besitzen, formen eine C1-*Cap*-Insertion (Abb. 4, in Grün). Andere Proteine, welche nur die  $\beta$ -Faltblätter besitzen und keine weiteren Helices dazwischen aufweisen, besitzen ein C0-*Cap*-Modul. Die Proteine, die eine Insertion innerhalb des **Motivs 3** in der Kerndomäne enthalten, bilden ein C2-*Cap*-Modul aus (Abb. 4 in Orange).



**Abbildung 4: Räumliche Struktur der klassischen Rossmann-Kerndomäne der HAD-Superfamilie.**

Das Konstrukt wurde aus Burroughs *et al.* (2006) entnommen und zeigt die variablen *Cap*-Module: C0, C1 und C2 innerhalb der Rossmann-Kerndomäne. Die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren sind an Bereichen abgebildet, an denen sie lokalisiert sind.

Die Zuordnung der Enzyme innerhalb der *Cap*-Insertionen erfolgt weiterhin nach Familien. So gibt es beispielsweise die Phosphoserin-Phosphatase (PSP)-Familie innerhalb des C1-*Cap*-Moduls. Das Enzym besitzt zwischen den beiden antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern tetrahelikale Strukturen. Im Laufe der Zeit sind weitere Phosphatasen mit diesem Strukturmerkmal charakterisiert worden, die jedoch andere Phosphomonoester enzymatisch umsetzen. Diese Enzyme bilden innerhalb der PSP-Familie Subfamilien. Eine Subfamilie ist die PHOSPHO1-Subfamilie. Das namensgebende Enzym ist die humane PHOSPHO1 (Roberts *et al.*, 2004). Zusätzlich zum tetrahelikalen C1-*Cap*-Modul, besitzt die PHOSPHO1 ein kleines C2-*Cap*-Modul, welches drei konservierte Cysteine enthält (siehe Ergebnisteil, Abb. 14). Diese Eigenschaft der PHOSPHO1-Subfamilie innerhalb der PSP-Familie wurde von Burroughs *et al.* (2006) in ihrem Übersichtsartikel zur strukturellen Einordnung der Phosphatasen innerhalb der HAD-Superfamilie erstmals beschrieben.

### 1.3 Zielstellung

In *A. thaliana* gibt es zwei  $P_i$ -Mangel induzierte Gene, *At1g73010* und *At1g17710*, welche unter  $P_i$ -Stress am höchsten transkriptionell aktiviert werden. In meiner Diplomarbeit in 2009 wurde das Genprodukt des Locus *At1g73010* als eine intrazelluläre lösliche Pyrophosphatase charakterisiert. Aufgrund der Primärsequenz, welche die drei charakteristischen **Motive 1 – 3** der HAD-Superfamilie enthält, konnte die PPsPase1 als eine neuartige zytoplasmatische alkalische Phosphatase bestimmt werden, die nicht zu den klassischen Pyrophosphatase in Arabidopsis gehört. Das zweite Gen, *At1g17710*, ist sequenzhomolog zur PPsPase1. Außer der bekannten transkriptionellen Aktivierung unter Phosphat-Defizit, gibt es bis dato keine weiteren Informationen zur enzymatischen Aktivität dieser putativen Phosphatase. Ein drittes sequenzhomologes Gen, *At4g29530*, ist bisher weder transkriptionell noch enzymatisch untersucht worden und es konnte zu Beginn dieser Arbeit nur die Beschreibung als eine weitere putative Phosphatase erfolgen. Studien in Tomate, Kartoffel, Bohne und Reis offenbarten strukturell verwandte Gene, die transkriptionell unter  $P_i$ -Limitierung rasch hoch induziert werden. Es ist daher denkbar, dass diese pflanzlichen Enzyme eine spezifische Familie  $P_i$ -Mangel induzierter Phosphatase innerhalb der HAD-Superfamilie bilden. Des Weiteren ist aufgrund der Verwandtschaft der putativen Phosphatase zur PPsPase1 zu prüfen, ob die bisher nicht charakterisierten Enzyme möglicherweise als Pyrophosphatase im  $P_i$ -verarmten Metabolismus fungieren.

Ziel dieser Arbeit war es deshalb, die Gene *At1g17710* und *At4g29530* aus *A. thaliana*, sowie die verwandten anderen pflanzlichen Gene: *Psi14A*, *-B* und *-C*, *StPPP*, *PvHAD1*, *PvPS2* und *OsACPI* heterolog im Bakterium *Escherichia coli* zu exprimieren. Anschließend sollten die putativen Phosphatase enzymatisch charakterisiert und funktionell in den durch  $P_i$ -Defizit modifizierten Metabolismus eingeordnet werden. Da es keine Informationen zur transkriptionellen Aktivierung des dritten Arabidopsis-Gens des Locus *At4g29530* gibt, sollten anhand von Transkriptionsanalysen Untersuchungen hierzu erfolgen. Um die Substratspezifität des dritten Genprodukts der kleinen Genfamilie in *Arabidopsis thaliana* zu bestimmen, sollte auch dieses kloniert, heterolog exprimiert und enzymatisch charakterisiert werden.

Mit Hilfe von Arabidopsis-Mutantenpflanzen (T-DNA-Insertionslinien und Überexpressionspflanzen) sollte die Enzymaktivität der Phosphatase des Genlocus *At1g17710* in diesen Pflanzenextrakten bestimmt werden. Des Weiteren sollten metabolische Studien erfolgen. Ziel war die Erstellung eines Profils der an der Phosphatase-Reaktion beteiligten Metabolite in den Extrakten. Aus diesen Ergebnissen heraus könnten nachfolgend Aussagen zur Funktion der Phosphatase im biologischen System getroffen werden.

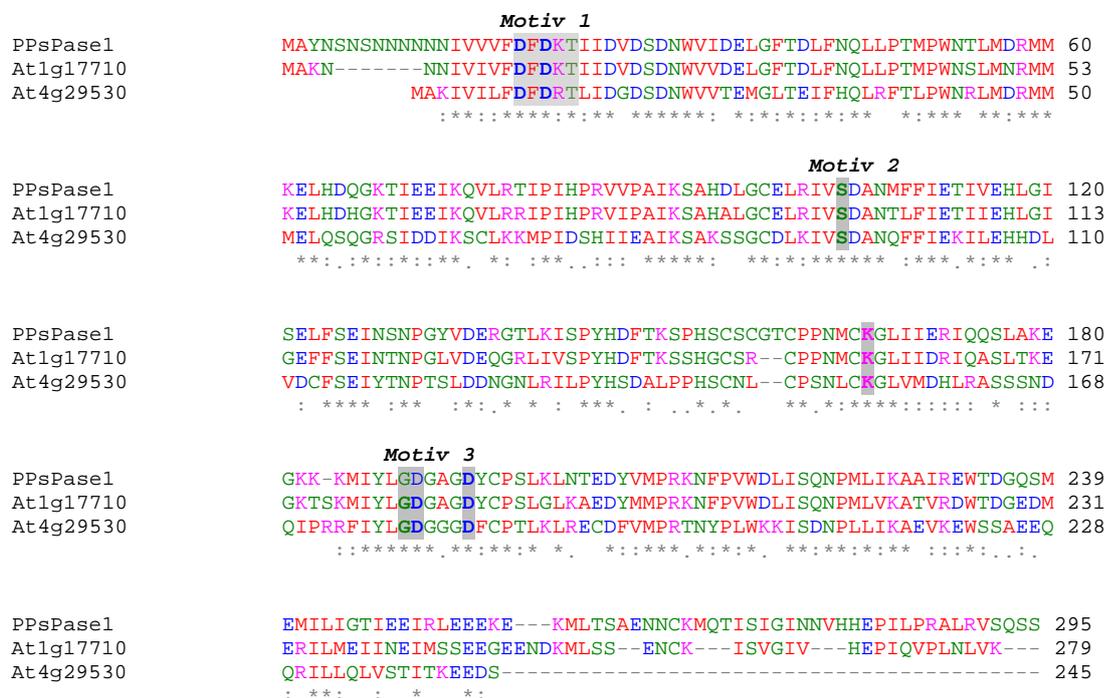
## 2. Ergebnisse

### 2.1 *In vitro*-Studien der Genprodukte des *At1g17710* und *At4g29530*

#### 2.1.1 Aminosäuresequenzanalyse der Genfamilie

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit bestand in der enzymatischen Charakterisierung von intrazellulären Phosphatasen, die unter P<sub>i</sub>-Mangel-Bedingungen verstärkt synthetisiert werden. Wie in der Einleitung erläutert, gibt es in *A. thaliana* eine kleine Genfamilie, zu der das Gen des Locus *At1g73010* gehört. Dieses Gen kodiert für eine Pyrophosphatase. Die Gene der Loci *At1g17710* und *At4g29530* sind homolog und kodieren für putative Phosphatasen unbekanntens Typs. Aufgrund der Ähnlichkeiten der Aminosäuresequenzen aller drei Gene ist davon auszugehen, dass es sich um Isoenzyme in *A. thaliana* handelt. Vor den Untersuchungen zur Substratspezifität der zwei bisher nicht aufgeklärten Enzyme sollte mit Hilfe eines multiplen *Alignments* die Verwandtschaft innerhalb der kleinen Arabidopsis-Genfamilie geprüft werden.

Die Abbildung 5 zeigt das Ergebnis dieser Aminosäuresequenzanalyse.



**Abbildung 5: Multiples Alignment verwandter Phosphatasen der HAD-Superfamilie in Arabidopsis.**

Der Aminosäuresequenz-Vergleich erfolgte mit dem Programm *ClustalW2*. Zu sehen sind die Aminosäuresequenzen der kleinen Arabidopsis-Genfamilie, wobei die PPsPase1 als Pyrophosphatase bestimmt wurde. Die gemeinsamen *Motive 1-3* der HAD-Superfamilie sind grau unterlegt. Die mit einem Stern (\*) gekennzeichneten Aminosäuren sind in allen drei Sequenzen hoch konserviert.

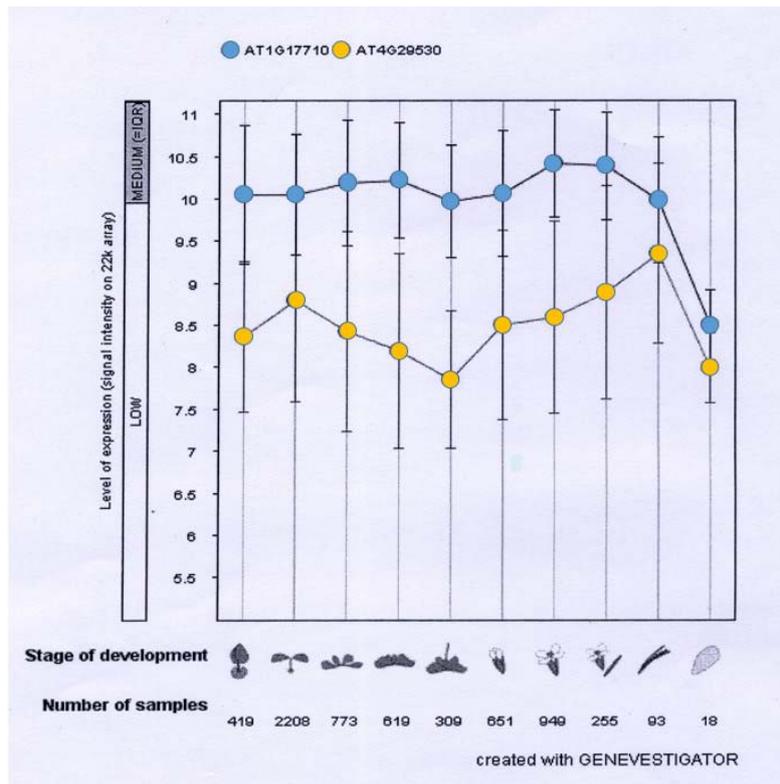
Alle drei Sequenzen besitzen die konservierten charakteristischen *Motive 1 – 3* der HAD-Superfamilie. Die Sequenz des *At4g29530* hat im konservierten *Motiv 1* nach dem zweiten Aspartat einen Aminosäure-Austausch. Anstelle der Aminosäure Lysin ist ein Arginin-Rest vorhanden, dieses Merkmal unterscheidet die Sequenz von den beiden anderen Sequenzen.

Die Sequenz-Identitäten unterscheiden sich innerhalb der kleinen Arabidopsis-Genfamilie. Die PPsPase1 ist in ihrer vollen Sequenzlänge in etwa 70 % homolog zur *At1g17710*-Sequenz. Dagegen ist die PPsPase1 nur ungefähr 50 % mit der *At4g29530*-Sequenz identisch. Die *At1g17710*-Sequenz ist ebenfalls nur in etwa 50 % übereinstimmend mit der *At4g29530*-Sequenz. Diese dritte Sequenz weicht hinsichtlich der Länge ihrer Primärsequenz von den beiden anderen Sequenzen ab. Sie enthält 30 Aminosäuren weniger. Trotzdem sind diese kürzeren Bereiche mit den Bereichen der beiden anderen Sequenzen ca. 50 % übereinstimmend.

Die Prüfung der Sequenzen bezüglich Signal-kodierender Motive mit dem Programm SignalP3.0 (Emanuelsson *et al.*, 2007) ergab, dass in Abwesenheit dieser, die putativen Phosphatasen entsprechend der PPsPase1, als lösliche zytoplasmatische Phosphatasen eingeordnet werden. Kalkulationen unter Verwendung des Internet-Portals ExPASy (<http://www.expasy.org>) ergaben, dass die putative Phosphatase des Locus *At1g17710* ein theoretisches Molekulargewicht von 31.5 kDa und die putative Phosphatase des Locus *At4g29530* ein theoretisches Molekulargewicht von 28.0 kDa besitzt.

### 2.1.2 Transkriptionelle Analyse unter P<sub>i</sub>-Mangelbedingungen

In der Einleitung im Abschnitt 1.2.4.2 wurden die P<sub>i</sub>-Mangel aktivierten Gene aus den verschiedenen Pflanzenarten vorgestellt, welche für die intrazellulären putativen Phosphatasen kodieren. Die kleine *Arabidopsis thaliana* Genfamilie enthält die P<sub>i</sub>-Mangel aktivierten Gene *At1g73010* und *At1g17710* (Müller *et al.*, 2007). Informationen zur transkriptionellen Aktivierung des *At4g29530* konnten bis dato nur über die Datenbank *GENEVESTIGATOR* (<https://www.genevestigator.com/>; Hruz *et al.*, 2008) gewonnen werden, welche Aussagen zum Transkriptgehalt der Gene, *At1g17710* und *At4g29530*, in verschiedenen Entwicklungsstadien von *A. thaliana*, bereitstellt (siehe Abb. 6). Die Analysen in dieser Datenbank bezogen sich ausschließlich auf den vollversorgten Pflanzenmetabolismus.

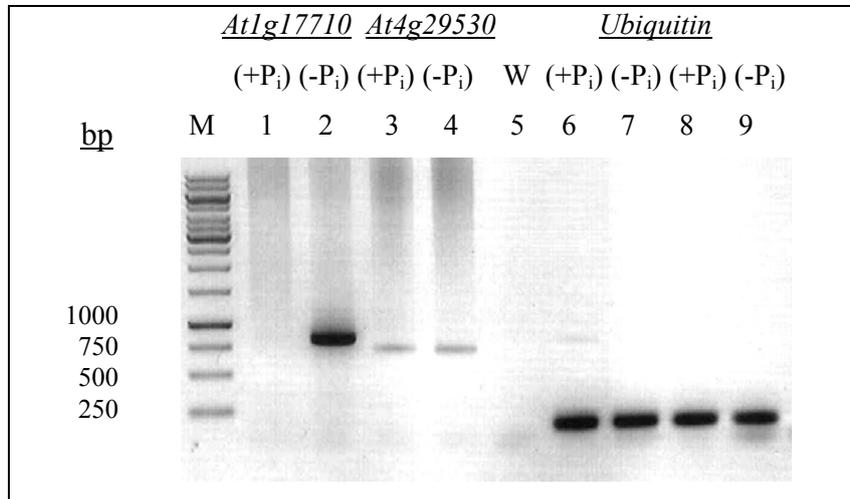


**Abbildung 6: Diagramm zur transkriptionellen Aktivierung des *At1g17710* und des *At4g29530*.**

Das Diagramm wurde mit dem Programm GENEVESTIGATOR generiert. Die obere Kurve mit blauen Punkten ist dem Gen *At1g17710* zugeordnet. Die untere Kurve (gelbe Punkte) ist dem Gen *At4g29530* zugeordnet. Unter dem Diagramm ist das jeweilige Entwicklungsstadium von *A. thaliana* mit Pflanzensymbolen gezeigt. Die letzte Zeile bezieht sich auf die Anzahl der jeweils getesteten Proben im jeweiligen Stadium.

Aus den Signalintensitäten des Diagramms ist zu entnehmen, dass sowohl *At1g17710* (obere Kurve) als auch *At4g29530* (untere Kurve), in allen untersuchten Entwicklungsstadien exprimiert werden. Die Transkriptionssignale des *At1g17710* sind deutlich höher als die Transkriptionssignale des *At4g29530*. Um den Einfluss des Phosphatmangels auf die Transkription der Gene zu untersuchen, sollten im nächsten Schritt dieser Arbeit die Transkriptlevel dieser Gene mittels semiquantitativer *PCR* (5.3.6) untersucht werden. Dazu war es erforderlich, die RNA aus Col-0-Keimlingen zu isolieren (5.4.1) und daraus die cDNA zu gewinnen (5.4.2). Die Keimlinge wurden zum einen im Vollmedium (+P<sub>i</sub>) und zum anderen im P<sub>i</sub>-Mangel-Medium (-P<sub>i</sub>) angezogen (5.2.5). Die Gesamt-RNA konnte aus den Keimlingen, bestehend aus Wurzel, Spross und Blättern, gewonnen werden. In der semiquantitativen-*PCR* wurde die aus der RNA generierte cDNA als *Template* eingesetzt. Es wurden die *Primer* 12 und 13 in der Reaktion verwendet (siehe Tabelle 16), welche den kodierenden Bereich des Gens amplifizieren, so dass ein Produkt der Größe von 738 bp zu erwarten ist. Zum Nachweis der Transkripte des *At1g17710* wurden die *Primer* 1 und 2 eingesetzt, welche das vollständige Produkt der Größe von 840 bp ergeben. Die Transkriptmenge des Amplifikats des *Ubiquitins UBQ11*, welches als *House-keeping* Gen konstitutiv in Arabidopsis exprimiert wird, diente als Standard zur Quantifizierung der Reaktion. Dazu wurden in der sq-*PCR*-Reaktion die *Primer* 18 und 19 verwendet. Diese *Primer* binden im

3'-Bereich der *Ubiquitin*-Sequenz und ergeben ein Produkt der Größe von 175 bp. Die nachfolgende Abbildung 7 zeigt das Ergebnis der sq-PCR.



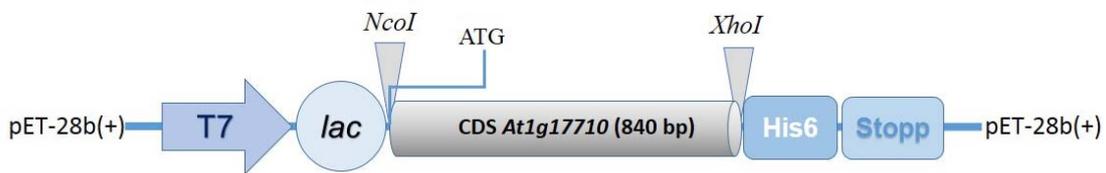
**Abbildung 7: Sq-PCR zur transkriptionellen Aktivierung der Arabidopsis-Gene.**

In der Spur 1 ist die (+P<sub>i</sub>)-cDNA-Probe aufgetragen. Es konnte kein PCR-Produkt des *Atlg17710* nachgewiesen werden. Die Spur 2 dagegen enthält das PCR-Produkt des *Atlg17710* unter (-P<sub>i</sub>). In Spur 3 ist die (+P<sub>i</sub>)-cDNA-Probe des *At4g29530* aufgetragen. Das PCR-Produkt ist amplifiziert worden. Die Spur 4 zeigt ebenfalls das gebildete PCR-Produkt des *At4g29530* unter (-P<sub>i</sub>). Die Spur 5 enthält eine Wasserprobe (W) als Kontrolle. Die Spuren 6 – 9 enthalten die mit den Primern Ubi-f und Ubi-rr amplifizierten Produkte des *Ubiquitins*. Als Größenstandard (M) wurde der *GeneRuler*<sup>TM</sup> 1kb DNA Ladder von Fermentas verwendet.

In Agarosegel (Abb. 7) sind die PCR-Produkte der beiden untersuchten Gene dokumentiert. Erwartungsgemäß gelingt eine Amplifizierung des *Atlg17710*-Transkripts mit Hilfe der (-P<sub>i</sub>)-cDNA-Proben. Die Transkription des Gens *Atlg17710* unterliegt einer starken Induktion unter Phosphatmangel. Eine Aktivität unter P<sub>i</sub>-Versorgung konnte mit dieser sq-PCR nicht gezeigt werden. Die transkriptionelle Aktivität des Gens *At4g29530* konnte sowohl unter P<sub>i</sub>-Versorgung als auch unter P<sub>i</sub>-Mangel nachgewiesen werden. Die Amplifikate sind in den Spuren 3 und 4 erkennbar. Es ist allerdings zu bedenken, dass die Transkription des Gens unter normalen Bedingungen und unter P<sub>i</sub>-Mangel-Bedingungen sehr gering ist, so dass von der relativen Transkriptionsmenge nicht automatisch auf die Höhe der Proteinmenge *in vivo* geschlossen werden kann. Dieser Befund zeigt, dass das *At4g29530* unter P<sub>i</sub>-Mangel nicht induziert wird sondern konstitutiv in Arabidopsis exprimiert ist. Im Vergleich der Transkriptgehalte beider Gene ist die Menge an gebildetem PCR-Produkt des Gens *At4g29530* deutlich geringer, als die Transkriptmenge von *Atlg17710* unter Phosphatmangel. Das *Ubiquitin*-Transkript konnte sowohl unter P<sub>i</sub>-Versorgung als auch unter P<sub>i</sub>-Mangel nachgewiesen werden. Die Menge des Ubiquitin-Transkript blieb erwartungsgemäß konstant.

### 2.1.3 Klonierung und heterologe Expression des Gens *At1g17710*

Um die enzymatischen Eigenschaften des Genprodukts von *At1g17710* untersuchen zu können, sollte der kodierende Bereich des *At1g17710* gerichtet in den bakteriellen Expressionsvektor pET-28b(+) kloniert werden. Dazu wurden die *Primer* 3 und 4 entwickelt, welche die Restriktionsschnittstellen *NcoI* und *XhoI* enthielten (siehe Tab. 16). Als *Template* zur Amplifizierung des Produktes diente der cDNA-Klon pORF\_At1/11 (Köck *et al.*, unveröffentlicht, Tab. 15). In der Abbildung 8 ist die Klonierungsregion des Zielvektors pET-28b(+) mit der kodierenden Sequenz des *At1g17710* gezeigt. Das Expressionssystem erlaubt über das Vorhandensein eines C-terminalen His<sub>6</sub>-tags die spätere affinitätschromatographische Reinigung des rekombinanten Proteins.



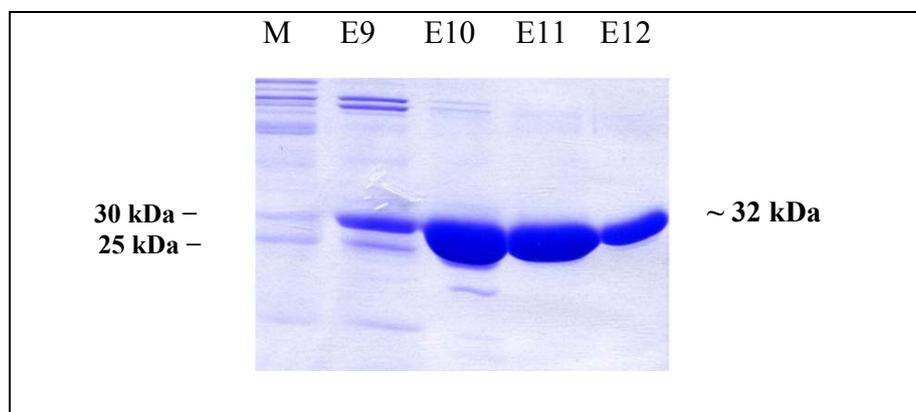
**Abbildung 8: Schematische Darstellung des Konstrukts pET-28b(+)/*At1g17710*.**

Die Abbildung zeigt den Aufbau des Klonierungsproduktes bestehend aus dem Expressionsvektor pET-28b(+) und der CDS des *At1g17710*. Die Expression des Fremdgens steht unter der Kontrolle des T7-Promotors (T7) und kann durch IPTG induziert werden. Die enthaltenen Restriktionsschnittstellen *NcoI* (mit ATG) und *XhoI* dienen ausschließlich zur Integration der kodierenden Gensequenz in den pET-28b(+). Am C-terminalen Ende der Sequenz befindet sich ein His<sub>6</sub>-tag.

Für die *PCR*-Reaktion (5.3.4) zur Gewinnung der *At1g17710*-kodierenden Sequenz wurde eine *proof-reading*-DNA-Polymerase verwendet. Das erlaubte im nächsten Schritt eine *Zwischenklonierung* in den Vektor pJET1.2/blunt. Über eine *Kolonie-PCR* konnten positive *E. coli*-Klone des Stammes DH5 $\alpha$  gewonnen werden. Anschließende Sequenzierungen des DNA-Materials (5.3.13) bestätigten das Vorliegen fehlerfreier Konstrukte. Im nächsten Schritt wurden die Plasmide isoliert, verdaut und die kodierende DNA-Sequenz des *At1g17710* in den Zielvektor pET-28b(+) ligiert. Zur Kontrolle der Ligation wurde erneut eine *Kolonie-PCR* durchgeführt. Über ein Agarosegel konnten vier positive *E. coli*-Klone bestimmt werden (Ergebnis nicht gezeigt). Schließlich erfolgte die Transformation des Konstrukts in die *E. coli*-Bakterien des Stammes BL21(DE3).

Nach erfolgreicher Klonierung und der gelungenen Fusion des C-terminalen His<sub>6</sub>-tags an die kodierende Region des *At1g17710*, erfolgte die heterologe Expression des Gens und die Synthese des rekombinanten Proteins in *E. coli* BL21(DE3). Dazu wurden zwei Klone ausgewählt. Die Induktion der Hauptkultur erfolgte bei einer OD<sub>(600nm)</sub> von 0.8 zunächst mit 1 mM IPTG bei 37 °C. Diese Bedingungen resultierten in der Akkumulation von *inclusion bodies*. Studien zur löslichen Proteinsynthese unter Variation der Parameter IPTG-Konzentration und Kultivierungstemperatur erwiesen schließlich eine

IPTG-Konzentration von 400  $\mu$ M sowie 4 h Kultivierung der Bakterien bei 24 °C als optimal zur Erhöhung des löslichen Proteinanteils. Unter diesen Bedingungen gelang die Erhöhung dieses Anteils auf ~ 60 % im Rohextrakt, verglichen mit dem Anteil an aggregiertem Protein im Pellet (Daten nicht gezeigt). Der Rohextrakt mit dem enthaltenen rekombinanten Protein wurde affinitätschromatographisch gereinigt (5.5.1). Die nachfolgende Abbildung 9 zeigt exemplarisch ein SDS-Polyacrylamidgel nach Reinigung mittels IMAC. Pro Reinigung enthielten die angereicherten Fraktionen 35 – 40 mg Protein/800 ml kultivierter Bakterien. Anschließend bestätigte eine MALDI-TOF MS Analyse (5.5.2) die korrekte und vollständige Aminosäuresequenz des Proteins. Das kalkulierte Molekulargewicht von ~ 31.5 kDa (ohne His-tag) stimmt mit dem apparenten Molekulargewicht von ~ 32 kDa (inklusive His<sub>6</sub>-tag) überein.



**Abbildung 9: Reinigung des *AtIg17710*-Proteins mittels IMAC.**

Es wurden 20  $\mu$ l der Elutionsproben 9–12 (E9–E12) aufgetragen. Als Größenstandard (M) wurde der Marker SM0661 von Fermentas verwendet.

#### 2.1.4 Enzymatische Charakterisierung des Genprodukts von *AtIg17710* als PECP1

Aufgrund der hohen prozentualen Aminosäuresequenzidentität der PPsPase1 und der putativen Phosphatase des Locus *AtIg17710*, war davon auszugehen, dass beide Phosphatasen Isoenzyme sind. Zunächst wurde analysiert, ob das *AtIg17710*-Protein eine entsprechende Phosphatase-Aktivität besitzt. Dazu wurden im Phosphatase-Assay nach Heinonen & Lahti (5.5.5) unter Einsatz von 10 mM para-Nitrophenylphosphat verschiedene Reaktionsansätze getestet, die im Puffer und im pH-Wert differierten. Die kinetischen Charakterisierungen der Reaktionen verliefen nach der im Abschnitt 5.5.6 angegebenen Methode (Daten nicht gezeigt). Eine Phosphatase-Aktivität des Enzyms konnte im leicht sauren bis neutralen Reaktionsmilieu bei pH 6.5 – 7.5 nachgewiesen werden.

Die Untersuchungen zur Substratspezifität der Phosphatase mit dem Substrat Natrium-Pyrophosphat erbrachten das unerwartete Resultat, dass dieses Substrat nur sehr langsam umgesetzt wird (Tab. 1). Daraus folgt, dass das Genprodukt von *AtIg17710* keine weitere Pyrophosphatase in Arabidopsis ist.

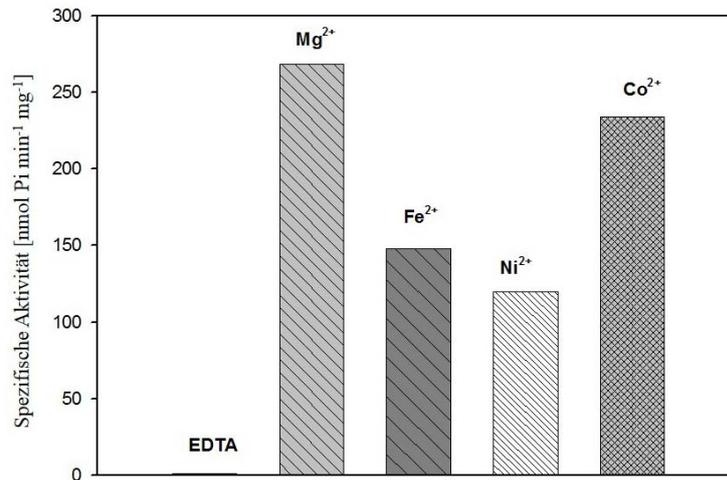
Zur genaueren Bestimmung des Substratspektrums wurde eine Anzahl von phosphorylierten Substanzen ausgewählt, die als typische Substrate anderer, bereits bekannter Phosphatasen der HAD-Superfamilie fungieren. Darin eingeschlossen sind Nukleotide, phosphorylierte Zuckerverbindungen und phosphorylierte Cofaktoren. Folgende Verbindungen wurden als potentielle Substrate eingesetzt: Phosphoethanolamin, Phosphocholin, Pospho-L-Serin, Phospho-L-Tyrosin, Pyridoxalphosphat, Thiamindiphosphat, Glucose-6-Phosphat, Gluconat-6-Phosphat, ATP, AMP, Ribose-5-Phosphat, Phosphoenolpyruvat, L-Glycerol-3-Phosphat,  $\beta$ -Glycerol-Phosphat. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen (pH 7.0, 1 mM Substrat, 8 mM MgCl<sub>2</sub>, 50  $\mu$ g/ml Protein) zeigten Phosphoethanolamin, Phosphocholin, Natrium-Pyrophosphat, Phospho-L-Serin und Phospho-L-Tyrosin einen Umsatz durch das getestete Enzym. Phosphoethanolamin und Phosphocholin wiesen dabei die mit Abstand höchsten Umsatzgeschwindigkeiten auf (Tab. 1). Mit diesem Ergebnis konnte der Charakter des Enzyms als spezifische Phosphoethanolamin/Phosphocholin Phosphatase bestimmt werden. Aufgrund dieser Präferenz wurde der Name *Arabidopsis thaliana* Phosphoethanolamin/ Phosphocholin Phosphatase1 (AtPECP1) gewählt und das Enzym in die Enzymklasse EC 3.1.3.75 eingruppiert.

**Tabelle 1: Spezifische Aktivität der PECP1 in Gegenwart verschiedener Substrate.**

Substrat	Spezifische Aktivität [ $\mu$ mol P <sub>i</sub> min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> ]
Phosphoethanolamin	3.665 $\pm$ 0.021
Phosphocholin	0.475 $\pm$ 0.0108
Natrium-Pyrophosphat	< 0.0001
Phospho-L-Serin	< 0.0001
Phospho-L-Tyrosin	< 0.0001

Da die zur HAD-Superfamilie gehörigen Phosphatasen Magnesiumionen als Cofaktoren enthalten, wurde die Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der Gegenwart von Metallionen untersucht. Im Hinblick auf AtPECP1 ist die Beobachtung relevant, dass das Enzym den Metall-Cofaktor während der Reinigungsprozedur weitgehend verloren geht (Daten nicht gezeigt). Zur Beobachtung charakteristischer Aktivitäten ist die Gegenwart extern zugefügter Salze zweiwertiger Metalle erforderlich. Zunächst wurde analysiert, welches zweiwertige Metallion diese Funktion am effektivsten erfüllt. Dabei kamen folgende Metallsalze zur Anwendung: MgCl<sub>2</sub>, CaCl<sub>2</sub>, FeCl<sub>2</sub>, NiCl<sub>2</sub>, CoCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub> und ZnCl<sub>2</sub>. Zum Vergleich wurde ein Reaktionsansatz unter Zusatz von 1 mM EDTA in Abwesenheit extern zugesetzten Metallsalzes untersucht. Unter diesen Bedingungen konnte keinerlei katalytische Aktivität beobachtet werden. In Gegenwart von CaCl<sub>2</sub>, CuCl<sub>2</sub> und ZnCl<sub>2</sub> wurde ebenfalls keine katalytische Aktivität erhalten. Unter den gewählten Reaktionsbedingungen wurden in Gegenwart von

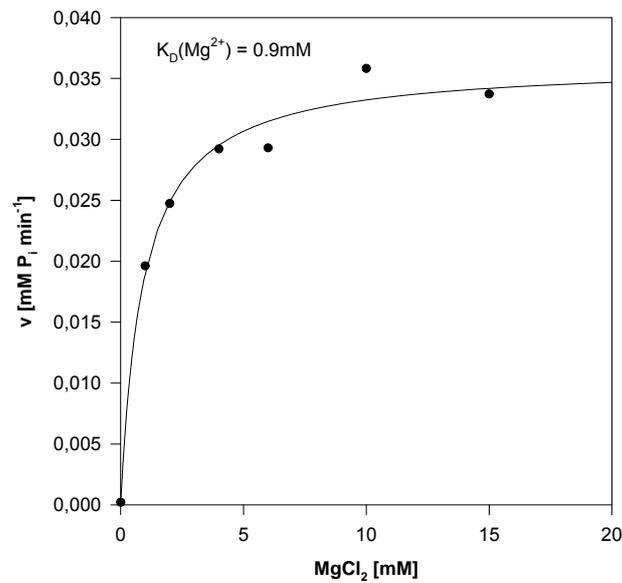
Mg<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> und Ni<sup>2+</sup> vergleichbare Aktivitäten gemessen. Dabei konnte in Gegenwart von MgCl<sub>2</sub> die höchste spezifische Aktivität erhalten werden. Die Abbildung 10 zeigt die Metallsalz-Präferenz der PECP1.



**Abbildung 10: Untersuchung zur Metall-Abhängigkeit der PECP1.**

Die Reaktionsansätze beinhalteten jeweils 2 mM Phosphocholin als Substrat, 1,5 mM Metallsalz und 50 µg ml<sup>-1</sup> PECP1. Die Reaktionen liefen im Tris/HCl pH 7.5 Puffersystem. Die freigesetzte P<sub>i</sub>-Konzentration wurde nach Heinonen & Lahti (5.5.5) bestimmt.

Diese Experimente dokumentieren die stringente Metall-Abhängigkeit der PECP1. Darüber hinaus weisen sie auf Magnesiumionen als native Cofaktoren des Enzyms hin. Um die Abhängigkeit der PECP1-Reaktionsgeschwindigkeit von der MgCl<sub>2</sub>-Konzentration quantitativ zu analysieren und die Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) der Cofaktorbindung am Holoenzym zu bestimmen, wurde die Phosphatase-Aktivität in Gegenwart unterschiedlicher MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen (0 – 15 mM) untersucht. Die Abbildung 11 zeigt das Ergebnis dieser Untersuchung. Die beobachtete MgCl<sub>2</sub>-Abhängigkeit der Reaktion zeigt einen hyperbolen Verlauf. Die ermittelte Dissoziationskonstante ( $K_D$ ) für die Bindung von Mg<sup>2+</sup> an die PECP1 beträgt 0.9 mM.

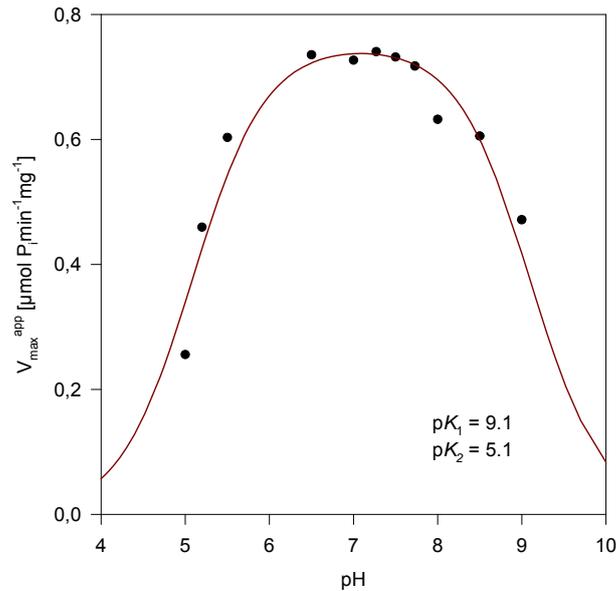


**Abbildung 11: Untersuchung zur MgCl<sub>2</sub>-Abhängigkeit der PECP1.**

Die Reaktionsansätze beinhalten 1 mM Phosphocholin als Substrat, 0-15 mM MgCl<sub>2</sub> und 50 µg ml<sup>-1</sup> PECP1. Die Reaktionen liefen im Tris/HCl pH 7.5 Puffersystem ab. Die Geschwindigkeiten der P<sub>i</sub>-Freisetzung wurden nach Heinonen & Lahti (5.5.5) bestimmt.

Zur Charakterisierung der pH-Abhängigkeit des katalytischen Umsatzes durch PECP1 wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten bei verschiedenen pH-Werten in Gegenwart von 1 mM Phosphocholin gemessen. Die enzymatischen Reaktionen liefen im pH-Bereich von 5.0 bis 9.0 ab. Es wurden folgende Puffersysteme verwendet: NaAc/Essigsäure pH 5.0 – 5.5, Hepes/NaOH pH 5.5 – 7.5, Tris/HCl pH 7.5 – 9.0. Die Berechnung der empirischen Daten erfolgte nach der Gleichung (I), 5.5.6. Das Ergebnis zur Untersuchung des pH-Profiles ist in Abbildung 12 zu sehen.

Das Diagramm zeigt eine Glockenkurve, welche dem Reaktionsverhalten eines typischen zwei-basischen Enzyms entspricht. Die berechneten pK<sub>a</sub>-Werte betragen pK<sub>2</sub> = 5.1 und pK<sub>1</sub> = 9.1. Die diesen pK<sub>a</sub>-Werten zugrunde liegenden Protonierungsgleichgewichte werden in Abschnitt 3.1 diskutiert. Die erhaltene Glockenkurve weist einen ausgeprägten Plateau-Bereich (pH 6.0 – 8.0) auf, in dem das Enzym die höchsten Aktivitäten zeigt. Rechnerisch konnte ein Optimum bei pH 7.2 bestimmt werden.



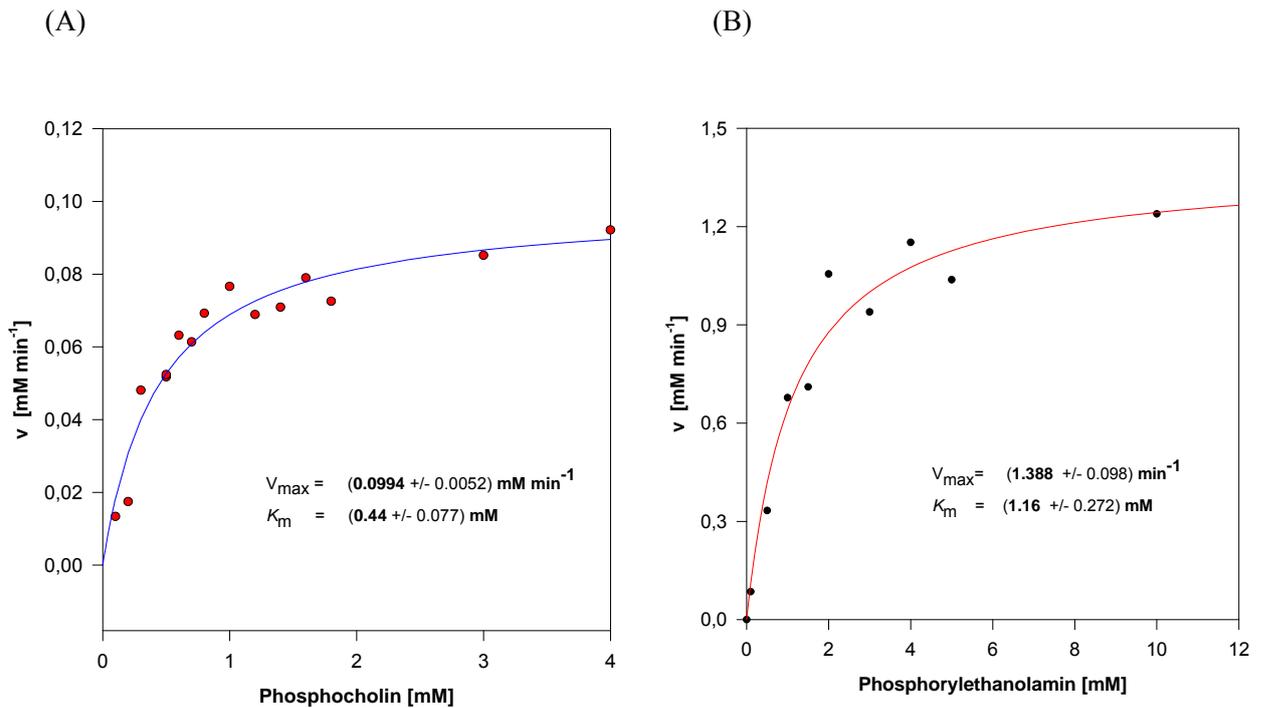
**Abbildung 12: Untersuchung zur pH-Abhängigkeit der PECP1.**

Die Reaktionsansätze beinhalteten jeweils 1 mM Phosphocholin, 8 mM  $\text{MgCl}_2$  und  $50 \mu\text{g ml}^{-1}$  PECP1. Die Reaktionen liefen in verschiedenen Puffersystemen im pH-Bereich von 5–9 ab. Die  $\text{P}_i$ -Freisetzungen wurden nach Heinonen & Lahti (5.5.5) bestimmt.

#### 2.1.4.1 Kinetische Charakterisierung der PECP1-Enzymreaktion

Zur Bestimmung der *steady state*-Parameter  $K_m$  und  $V_{\max}$  der durch die PECP1 katalysierten Hydrolysereaktion, wurde die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration unter konstanten Reaktionsbedingungen (37 °C, pH 7.2) gemessen. Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden anhand der Freisetzung des Produktes Phosphat nach Heinonen & Lahti (5.5.5) bestimmt. In der Abbildung 13 A und B sind die  $v/S$ -Charakteristiken für die zwei Substrate Phosphocholin und Phosphoethanolamin dargestellt. Aus drei unabhängig bestimmten Reaktionsgeschwindigkeiten wurden die Mittelwerte berechnet und aufgetragen. Die Berechnung von  $K_m$  und  $V_{\max}$  erfolgte mittels nichtlinearer Regression nach der Michaelis-Menten-Gleichung (I):

$$v = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \quad (\text{I})$$



**Abbildung 13 A) und B):** Reaktionsgeschwindigkeit der PECP1-Reaktion im *steady state* in Gegenwart der Substrate Phosphocholin bzw. Phosphoethanolamin. Die Reaktionsansätze beinhalteten jeweils 0.1 – 4.0 mM Phosphocholin bzw. 0.1 – 12.0 mM Phosphoethanolamin, 8 mM MgCl<sub>2</sub> und 50 µg ml<sup>-1</sup> PECP1. Die P<sub>i</sub>-Freisetzungen wurden nach Heinonen & Lahti (5.5.5) bestimmt.

Beide Diagramme (Abb. 13 A, B) zeigen hyperbole Sättigungskurven. Die Enzymreaktion der PECP1 folgt somit dem klassischen Michaelis-Menten-Prinzip. Für das Substrat Phosphocholin wurde ein  $K_m$  von 0.44 mM bestimmt und für das Substrat Phosphoethanolamin ein  $K_m$  von 1.16 mM. Die Phosphocholin-hydrolysierende PECP1-Reaktion hat eine Maximalgeschwindigkeit von 0.1 mM min<sup>-1</sup>. Die Phosphoethanolamin-hydrolysierende PECP1-Reaktion hat einen  $V_{\max}$ -Wert von 1.388 mM min<sup>-1</sup>. Durch die Ermittlung der kinetischen Parameter konnte nachfolgend die katalytische Konstante ( $k_{\text{cat}}$ ) und die katalytische Effizienz ( $k_{\text{cat}}/K_m$ ) der Reaktion errechnet werden (Tab. 2).

**Tabelle 2: Parameter für die Kinetik der PECP1-Reaktion.**

Substrat	$K_m$	$k_{\text{cat}}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{\text{cat}}/K_m$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
Phosphocholin	0.444	1.04	2.34 x 10 <sup>3</sup>
Phosphoethanolamin	1.163	13.0	1.06 x 10 <sup>4</sup>

### 2.1.4.2 Charakterisierung der Sekundär- und der Tertiärstruktur der PECP1

Trotz einer hohen Homologie der Aminosäuresequenzen unterscheiden sich PPsPase1 und PECP1 in Hinblick auf ihre katalytischen Eigenschaften und ihre Substrataffinität grundsätzlich. Beide Phosphatasen, deren biologische Funktion vermutlich darin besteht Orthophosphat zur raschen Beantwortung der P<sub>i</sub>-Stress-Situation bereitzustellen, sind in verschiedenen Stoffwechsel-Wegen in *A. thaliana* aktiv. Es stellte sich daher die Frage, ob diese enzymatischen Unterschiede in ihrer Substratspezifität aus den abweichenden Sekundär- und/oder Tertiärstrukturen resultieren.

#### Analyse der Sekundärstruktur der PECP1

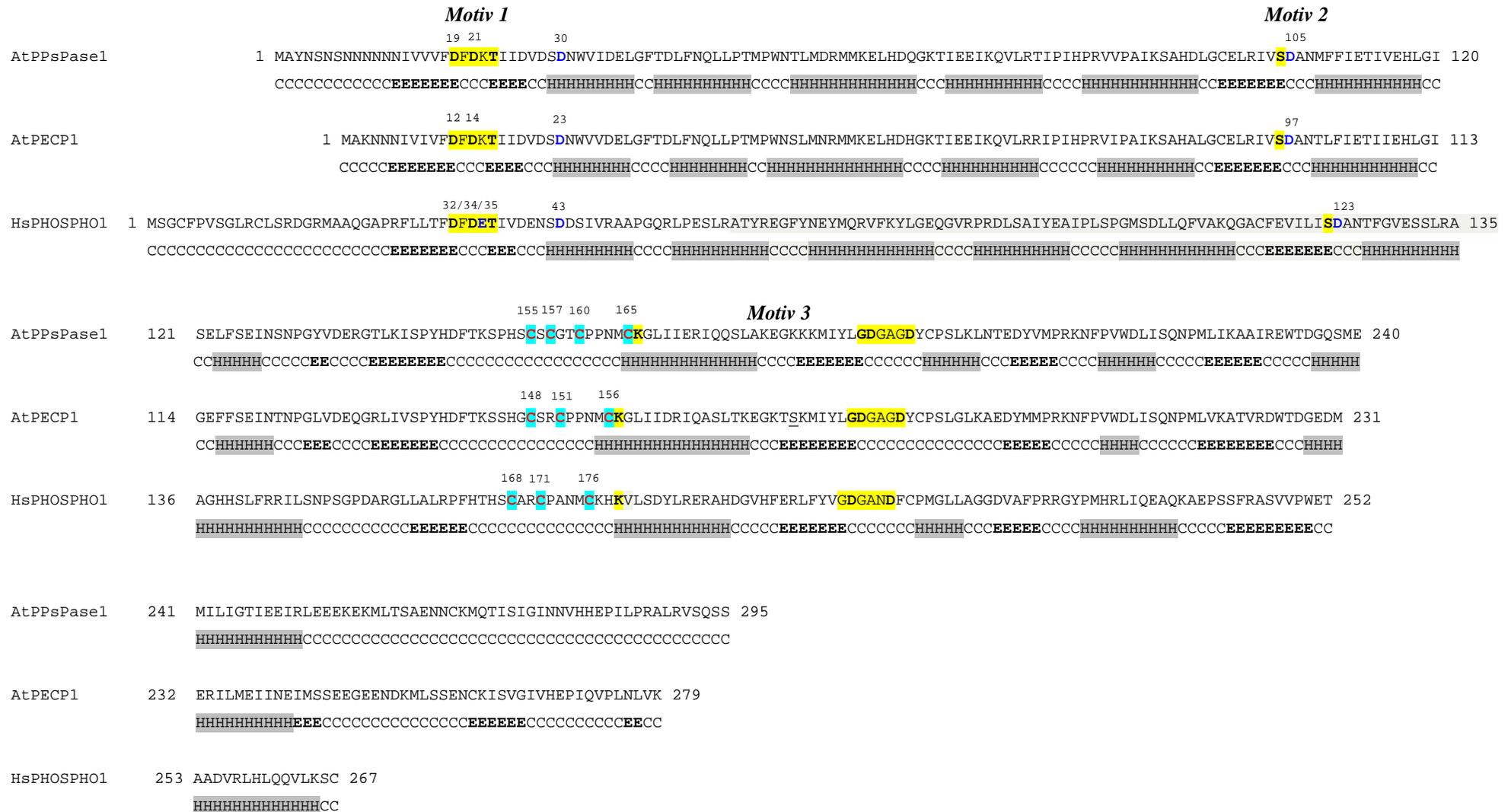
Mit Hilfe des Struktur-Analyse-Programms *Proteus* (5.3.14) wurde die Sekundärstruktur der PECP1 analysiert. Das *Proteus*-Programm kombiniert verschiedene Vorhersage-Modelle, die den Programmen PSIPRED (Jones, 1999), JNET (Cluff & Burton, 1999), TRANSSEC und dem Struktur- und *Alignment*-Programm (XALIGN) zugrunde legen.

Da die kinetischen Untersuchungen die PECP1 als eine Phosphoethanolamin/Phosphocholin-Phosphatase identifizierten, wurde als Vergleichsbasis das Enzym der PHOSPHO1-Subfamilie, die humane PHOSPHO1 (siehe Einleitung, 1.2.4.3), gewählt. Anhand der bekannten Primärstrukturen von PECP1 und PPsPase1 wurden Sekundärstrukturvorhersagen erstellt. Wie bereits erwähnt, besitzt die HsPHOSPHO1 zusätzlich zum C1-Cap-Modul ein kleines C2-Cap-Modul, welches drei konservierte Cysteine an den Positionen 168, 171 und 176 enthält. Es stellte sich daher die Frage, ob die PECP1 ebenfalls dieses C2-Cap-Modul mit den drei konservierten Cysteinen enthält. Es ist zu prüfen, ob die PPsPase1 auch dieses C2-Cap-Modul besitzt oder ob es darin Abweichungen gibt.

In der Tabelle 3 und in Abbildung 14 sind die Ergebnisse zu dieser Untersuchung zusammengefasst.

**Tabelle 3: Sekundärstruktur-Elemente der AtPPsPase1, der AtPECP1 und der HsPHOSPHO1.**

Enzyme \ Struktur-Element	$\alpha$ -Helix		$\beta$ -Faltblatt		<i>Random Coil</i>	
	[AS-Reste]	[%]	[AS-Reste]	[%]	[AS-Reste]	[%]
AtPPsPase1	112	38	46	16	137	46
AtPECP1	101	36	60	22	118	42
HsPHOSPHO1	115	43	44	16	108	40



**Abbildung 14: Computergestützte Sekundärstruktur-Vorhersage der AtPECP1 im Vergleich mit den Sekundärstrukturen der AtPPsPase1 und der HsPHOSPHO1.**

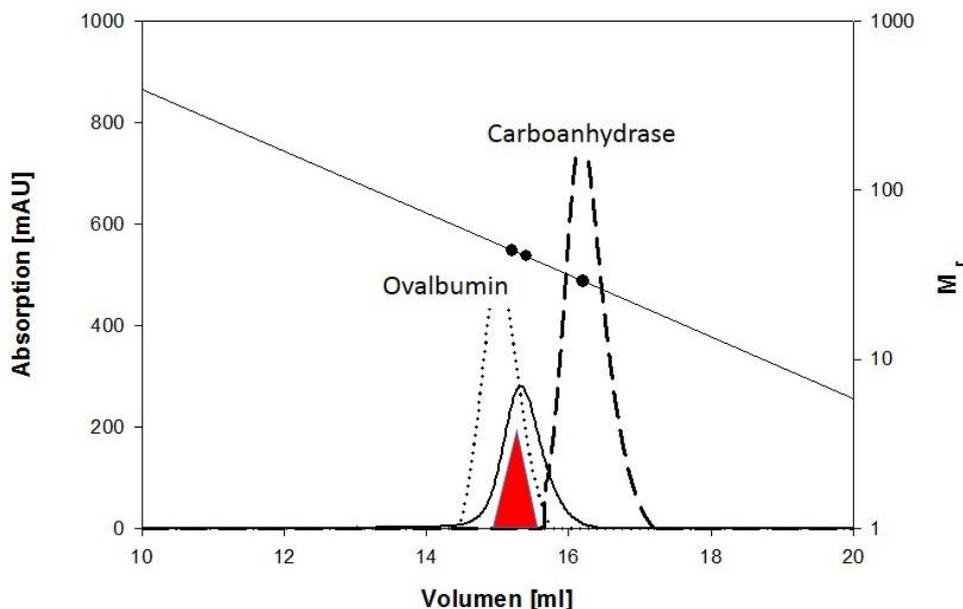
In der Darstellung sind die Sekundärstrukturen der Enzymspezies der HAD-Superfamilie AtPPsPase1, AtPECP1 und HsPHOSPHO1 gezeigt. Die charakteristischen *Motiv 1*, *2* und *3* sind gelb hervorgehoben. Das Strukturelement Helix ist mit **H**, das Element  $\beta$ -Faltblatt mit **E** und die *Random-Coil*-Bereiche mit **C** gekennzeichnet. Die Helices sind grau unterlegt. Die  $\beta$ -Faltblätter sind durch **Fettschrift** des Elements **E** hervorgehoben. Die konservierten Aspartat-Aminosäuren, welche zur Substrat-Identifizierung, Substrat-Bindung und Substrat-Spaltung notwendig sind, sind dunkelblau markiert. Die Zahlen, welche oberhalb, seitlich rechts und links der Sequenz platziert sind, geben die Positionen und die Angaben zur Anzahl der einzelnen Aminosäuren wieder. Die Bereiche, welche die konservierten Cysteine (fett rot) enthalten, sind hellblau unterlegt.

Als Ergebnis der Sekundärstruktur-Vorhersage der der PECP1 und der PPsPase1 ist festzustellen, dass beide Enzyme ein C1-Cap-Modul mit mehreren Helices zwischen den  $\beta$ -Faltblättern besitzen. Aufgrund der katalytischen Umsetzung der Phosphomonoester und des Vorhandenseins des C1-Cap-Moduls, gehören beide Phosphatasen in die PSP-Familie innerhalb der HAD-Superfamilie. Überraschenderweise besitzen sowohl die PECP1 als auch PPsPase1 ein kleines C2-Cap-Modul. Die PECP1 enthält die drei konservierten Cysteine an den Positionen 148, 151 und 156. Die PPsPase1 enthält neben den drei Cysteinen an den Positionen 157, 160 und 165 ein weiteres Cystein in Position 155. Damit hebt sich die Pyrophosphatase von den anderen Phosphoethanolamin/Phosphocholin-Phosphatasen ab.

In der Tabelle 3 sind die Anteile an  $\alpha$ -Helices,  $\beta$ -Faltblättern und unspezifischen *Coils* aller drei Phosphatasen aufgelistet. Es wird ersichtlich, dass die Anzahl der Elemente fast identisch ist. Die Ursachen der verschiedenen Substratspezifitäten der PECP1 und der PPsPase1 konnten anhand dieser Analyse nicht eindeutig geklärt werden. Daher soll im nächsten Schritt zur Beantwortung dieser Frage die Tertiärstruktur der PECP1 genauer untersucht werden.

### Untersuchungen zur Tertiärstruktur der PECP1

Zuerst sollte über eine Gelfiltration die apparente native Molekülmasse der PECP1 bestimmt werden. Dazu wurde eine affinitätschromatographisch gereinigte Probe (375  $\mu$ l,  $\sim$  1.4 mg PECP1-Protein) auf eine Superdex 200 HR 10/30 Säule gegeben und die einzelnen Fraktionen gesammelt (siehe 5.5.7). Die Abbildung 15 zeigt das Chromatogramm der Gelfiltration.



**Abbildung 15: Bestimmung der nativen Molekülmasse der PECP1 durch Gelfiltration.**

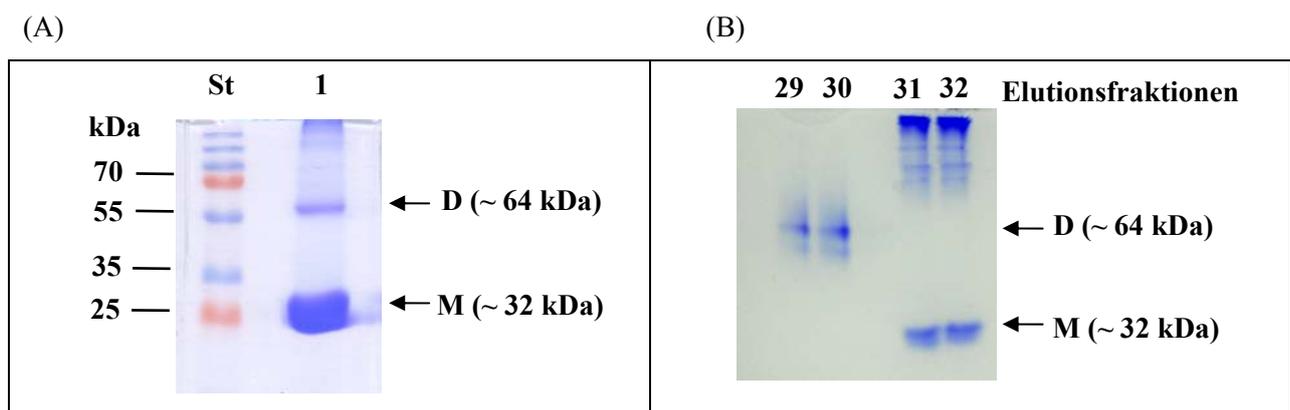
Es ist das Profil der PECP1 (durchgängige Linie,  $\Delta$ ) zu sehen. Der gepunktete *Peak* zeigt das Elutionsprofil des Ovalbumin-Proteins (44 kDa) und der gestrichelte *Peak* zeigt das Elutionsprofil der Carboanhydrase (29 kDa).

Im Chromatogramm der Gelfiltration sind drei definierte Proteinprofile zu sehen. Das Proteinprofil der PECP1 befindet sich zwischen dem rechts abgebildeten *Peak* des Standardproteins Ovalbumin mit einer nativen Molekülmasse von 44 kDa und dem links befindlichen *Peak* der Carboanhydrase von 29 kDa. Die PECP1 wurde bei einem Volumen von 15.4 ml eluiert.

Die native Molekülmasse der PECP1 wurde über einen *Plot* des Elutionsvolumens mit der bekannten nativen Molekülmasse der Standardproteine berechnet. Das Elutionsvolumen war äquivalent zur Auftragung der molekularen Masse von 41 kDa. Diese ermittelte Masse liegt zwischen dem Monomer von etwa 32 kDa und dem Dimer von etwa 64 kDa. Daher ist davon auszugehen, dass beide Spezies, das Monomer und das Dimer der PECP1, sich in einer schnellen Gleichgewichtsreaktion befinden.

Zur Überprüfung dieser Annahme wurden daraufhin alle Elutionsfraktionen auf Enzymaktivität der PECP1 getestet. Es konnte ausschließlich in den Fraktionen 29, 30, 31 und 32 eine Phosphatase-Aktivität mit 2 mM Phosphocholin und 8 mM MgCl<sub>2</sub> nachgewiesen werden. Diese Fraktionen bilden den Protein*peak* der PECP1 im Diagramm. Die Tabelle 4 zeigt die Enzymaktivitäten der PECP1 der Gelfiltrationsfraktionen 29 – 32. Die P<sub>i</sub>-Freisetzung wurde nach Heinonen & Lahti (5.5.5) bestimmt.

Um die Oligomerstruktur in den Elutionsfraktionen 29 – 32 näher bestimmen zu können, wurden zwei verschiedene Experimente durchgeführt. Zuerst wurden vor dem Gelfiltrationslauf von der affinitätschromatographisch gereinigten Proteinprobe 20 µl entnommen und über die mild-denaturierende SDS-PAGE analysiert (Abb. 16, A). Nach der Gelfiltration und der Testung der Fraktionen auf Enzymaktivität, wurden die eluierten Fraktionen 29 – 32 in einer PAGE ohne SDS analysiert (Abb. 16, B).



**Abbildung 16: Untersuchung der Tertiärstruktur der PECP1.**

**Bild A):** Analyse des PECP1-Proteins mittels mild-denaturierende SDS-PAGE ohne Erhitzen der Probe (5.5.2). Der Ladebuffer enthielt 2 % SDS und der Laufpuffer 0,1 % SDS. Die Spur 1 repräsentiert die Bande für das Dimer (D) und die Bande für das Monomer (M) der PECP1 in korrekter Größe. Als Größenvergleich diente der Proteinstandard (St) SM1811/2 von Fermentas. **Bild B):** Analyse der Fraktionen 29 – 32 mittels PAGE ohne SDS (5.5.2). Proben der Gelfiltrationsproben 29 – 32, welche eine PECP1-Aktivität enthielten, wurden unter nativen Bedingungen in einer PAGE untersucht. Die Fraktionen 29 und 30 enthielten das Dimer (D) und die Fraktionen 31 und 32 das Monomer (M) der PECP1.

Im Gelbild A) der Abb. 16 ist eine Bande mit **D** bezeichnet, die der Größe der Dimer-Form (~ 64 kDa) der PECP1 entspricht. Des Weiteren ist eine Bande **M** zu sehen, die der Größe der Monomer-Form (~ 32 kDa) der PECP1 entspricht. Es zeigte sich, dass die Monomer-Form aufgrund der mild-denaturierenden Bedingungen überwiegt. Das Gelbild B) der Abb. 16 zeigt eine weitere Untersuchung der Elutionsfraktionen 29 – 32. In diesen Fraktionen konnte die PECP1-Aktivität nachgewiesen werden (Tab. 4). Die Proben wurden einer nicht-denaturierenden *PAGE* unterzogen. Die Fraktionen 29 und 30 enthalten die Dimer-Form (**D**) und die Fraktionen 31 und 32 die Monomer-Form (**M**) der PECP1. Das Ergebnis zu dieser Untersuchung bestätigte die Annahme, dass die PECP1, sowohl als Dimer als auch als Monomer, in einer schnellen Gleichgewichtsreaktion enzymatisch aktiv ist.

**Tabelle 4: Spezifische Aktivität und theoretische Oligomerstruktur der AtPECP1 nach Gelfiltration.**

Elutionsfraktionen	Spezifische Aktivität [ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ]	Oligomerstruktur
29	0.116	Dimer
30	1.876	Dimer
31	1.037	Monomer
32	0.228	Monomer

Meine früheren Untersuchungen zur Tertiärstruktur der PPsPase1 ergaben, dass das Enzym ein funktionell aktives Tetramer ist und eine kalkulierte native Molekülmasse von etwa 120 kDa besitzt (May *et al.*, 2011). Das Ergebnis der Gelfiltration zur Analyse der Tertiärstruktur der PECP1 ergab dagegen, dass die PECP1 ein funktionell aktives Monomer/Dimer ist und eine molekulare Masse von etwa 64 kDa besitzt.

Mit diesen Analysen konnten erstmals Unterschiede zwischen der PPsPase1 und der PECP1 aus *Arabidopsis thaliana* gezeigt werden. Die Tertiärstrukturen beider homologer Phosphatasen sind voneinander abweichend. Es könnte die Ursache dafür sein, dass trotz der hohen Sequenz-übereinstimmungen beider Enzyme die Substratpräferenzen so grundlegend verschieden sind.

### 2.1.5 Identifizierung einer weiteren PECP in *Arabidopsis thaliana*

Im Abschnitt 2.1.2 wurde die transkriptionelle Analyse des dritten homologen Gens (*At4g29530*) innerhalb der kleinen Arabidopsis-Genfamilie beschrieben. Überraschenderweise zeigte es sich, dass die Transkription des Gens *At4g29530* unter  $P_i$ -Mangel keiner Aktivierung unterliegt, sondern konstitutiv exprimiert wird (siehe Abb. 7). Hierdurch unterscheidet sich dieses Gen grundsätzlich von den beiden anderen Genen (*PPsPase1* und *PECP1*).

Die enzymatischen Analysen der PECP1 ergaben, dass es neben der unter  $P_i$ -Mangel-Bedingungen induzierten Pyrophosphatase eine  $P_i$ -Mangel induzierte Phosphoethanolamin/Phosphocholin Phosphatase in *A. thaliana* gibt. Daher soll im Folgenden die Substratspezifität des Genproduktes von *At4g29530* untersucht werden. Dazu wurde dieses Gen in einen entsprechenden Expressionsvektor kloniert und heterolog in *E. coli* exprimiert.

#### Klonierung und heterologe Expression des Gens *At4g29530*

Die Klonierungsstrategie entsprach dem für AtPECP1 beschriebenen Verfahren (siehe 2.1.3). Nach Prüfung auf interne Restriktionsschnittstellen der kodierenden Sequenz von *At4g29530*, wurde das Expressionsplasmid pET-22b(+) als Zielvektor gewählt. Dieser Vektor bietet ebenfalls die Möglichkeit einer erweiterten His<sub>6</sub>-tag-Klonierung. Die *Primer* 14 und 15 wurden so konstruiert, dass sie am 5'-Ende der kodierenden Sequenz eine *NdeI*- und am 3'-Ende eine *XhoI*-Schnittstelle vorsahen (vgl. Tab. 16). Nach der Amplifikation der kodierenden *At4g29530*-Sequenz aus dem Plasmid pORFAt3/37 (AG Köck, unveröffentlicht), konnte das *PCR*-Produkt, entsprechend der für AtPECP1 beschriebenen Methode, in das Plasmid pJET1.2/blunt zwischenkloniert werden. Anschließende Sequenzierungen bestätigten den fehlerfreien und vollständigen Einbau der DNA in den Vektor. Nach dem Verdau aus dem pJET1.2/blunt-Vektor und der Ligation der DNA in den Zielvektor pET-22b(+), wurde das Plasmid in den Bakterienstamm *E. coli* BL21(DE3) transformiert. Anschließend erfolgte die heterologe Expression des *At4g29530-ORFs* und die Synthese des rekombinanten Proteins im Bakterium. Zunächst resultierte die Protein-Synthese unter Standardbedingungen in *inclusion bodies*. Durch die Veränderung der IPTG-Konzentration und der Kultivierungstemperatur gelang es, die putative Phosphatase mittels Induktion mit 300  $\mu$ M IPTG und einer Temperatur von 28 °C löslich zu produzieren. Der lösliche Proteinanteil betrug im Bakterienrohextrakt > 50 % (Daten nicht gezeigt). Über eine anschließende Reinigung und Anreicherung des rekombinanten Proteins mittels IMAC konnten 12 mg Protein aus 800 ml Bakterienkultur gewonnen werden.

### Enzymatische Charakterisierung der AtPECP2

Zunächst sollte untersucht werden, ob das Genprodukt von *At4g29530* eine Phosphatase ist. Neben dem artifiziellen Phosphatase-Substrat para-Nitrophenylphosphat wurden die gleichen Verbindungen als putative Substrate getestet, die für die Untersuchung der PECP1 verwendet wurden (siehe 2.1.4). Die Konzentrationen betragen jeweils 1 mM. Der pH-Wert der Reaktionsansätze betrug 6.8. Mit Hilfe des Phosphatase-Tests nach Zilversmit & Davis (5.5.5) wurde die Produktfreisetzung des Phosphats bestimmt. Die übrigen Reaktionsbedingungen sind im Abschnitt 5.5.6 angegeben. Signifikante Umsätze konnten mit para-Nitrophenylphosphat, mit Natrium-Pyrophosphat, mit Phosphoethanolamin und mit Phosphocholin nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt). Phosphoethanolamin und Phosphocholin wiesen dabei die mit Abstand höchsten Umsatzgeschwindigkeiten auf (siehe Tab. 5).

**Tabelle 5: Spezifische Aktivität der PECP2 in Gegenwart verschiedener Substrate.**

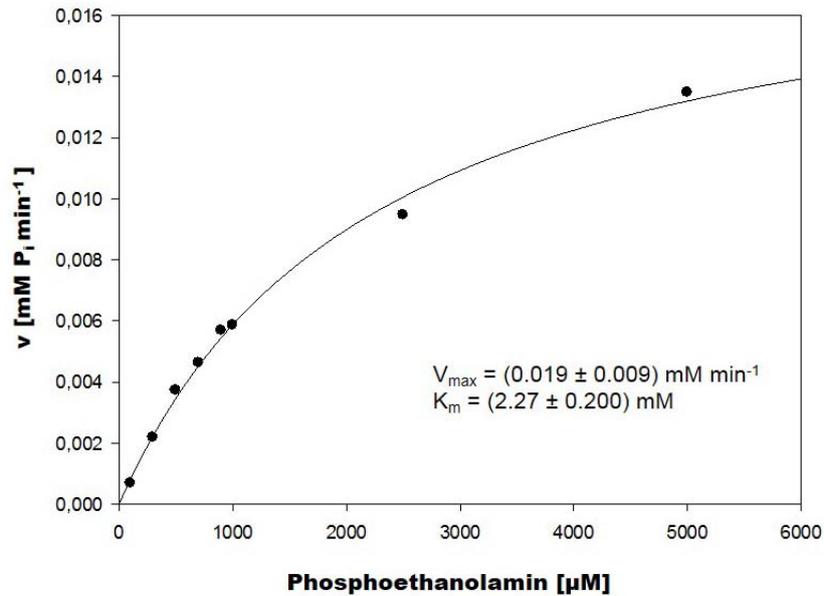
Substrat	Spezifische Aktivität [ $\mu\text{mol P}_i \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ]
Phosphoethanolamin	$0.11 \pm 0.010$
Phosphocholin	$0.01 \pm 0.007$

Aufgrund der Präferenz des untersuchten Enzyms für Phosphoethanolamin und Phosphocholin wurde der Name *Arabidopsis thaliana Phosphoethanolamin/Phosphocholin Phosphatase2* (AtPECP2) gewählt. Daher wird AtPECP2 als eine weitere pflanzliche PECP als EC 3.1.3.75 klassifiziert.

### v/S-Charakteristik der AtPECP2

Zur Bestimmung der *steady state*-Parameter  $K_m$  und  $V_{\max}$  der durch die AtPECP2 katalysierten Hydrolysereaktion, wurde die Reaktionsgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Substratkonzentration unter konstanten Reaktionsbedingungen (37 °C, pH 6.8) gemessen. Der Konzentrationsbereich für das Substrat Phosphoethanolamin umfasste 0.1 – 5.0 mM. Die Reaktionsgeschwindigkeiten wurden anhand der Freisetzung des Produktes Phosphat bestimmt.

In der Abbildung 17 ist die dazugehörige v/S-Charakteristik dargestellt. Zu jedem Wert wurden drei unabhängige Progresskurven aufgenommen ( $n = 3$ ). In der Abbildung sind die Mittelwerte aus den je drei unabhängig bestimmten Reaktionsgeschwindigkeiten gezeigt. Die Berechnung von  $K_m$  und  $V_{\max}$  erfolgte mittels nichtlinearer Regression nach der Michaelis-Menten-Gleichung (2.1.5).



**Abbildung 17: Kinetische Daten der AtPECP2-Reaktion mit dem Substrat Phosphoethanolamin.**

Die Reaktionsansätze beinhalteten jeweils 0.1 – 5 mM Phosphoethanolamin, 10 mM MgCl<sub>2</sub> und 17 µg ml<sup>-1</sup> AtPECP2. Die Reaktionen liefen im Puffer 100 mM HEPES/NaOH pH 6.8 ab. Die P<sub>i</sub>-Freisetzungen wurden nach Zilversmit & Davis (5.5.5) bestimmt.

Auswertung der *steady state*-Daten zeigt, dass die Abhängigkeit der Geschwindigkeiten von der Substratkonzentration einem hyperbolen Verlauf folgt. Dies wird durch die Sekundärauftragungen nach Lineweaver-Burk bestätigt (siehe 7.3). Somit liegen keine charakteristischen Abweichungen vom Michaelis-Menten-Verhalten vor. Es wurden ein  $K_m$ -Wert von 2.27 mM und eine Maximalgeschwindigkeit von 0.019 mM min<sup>-1</sup> bestimmt. Aus der Maximalgeschwindigkeit wurde unter Berücksichtigung einer Proteinkonzentration von 17 µg ml<sup>-1</sup> im Reaktionsansatz ein  $k_{cat}$ -Wert von 0.534 s<sup>-1</sup> errechnet. Mit Hilfe dieser kinetischen Parameter wurde zusätzlich die katalytische Effizienz ( $k_{cat}/K_m$ ) aus den Daten berechnet (Tab. 6).

**Tabelle 6: *Steady state*-Parameter für die Kinetik der AtPECP2-Reaktion.**

Enzym	Substrat	$K_m$	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
AtPECP2	Phosphoethanolamin	2.27 mM	0.534	2.35 x 10 <sup>2</sup>

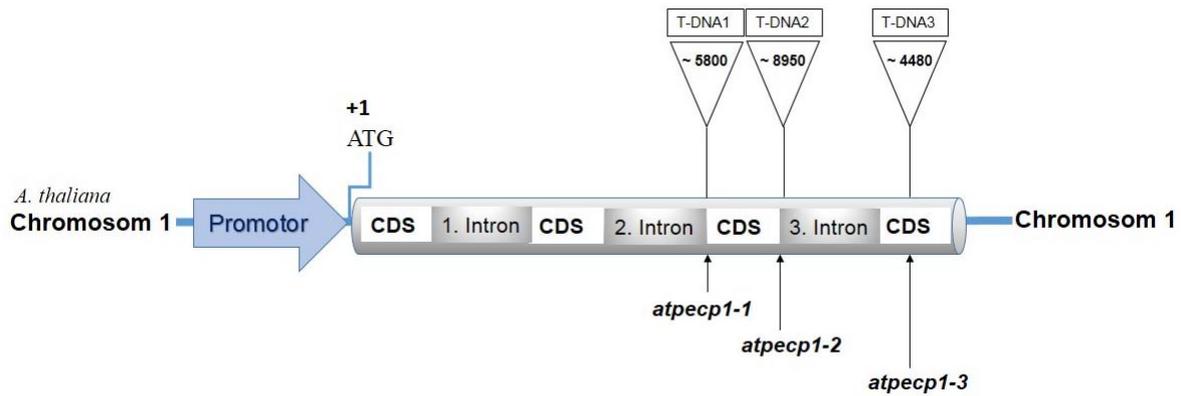
Eine Untersuchung mit dem Substrat Phosphocholin führte zu keiner aussagekräftigen v/S-Charakteristik, da die AtPECP2 dieses Substrat nur sehr langsam spaltet (siehe Anhang 7.3). Die enzymatischen Konstanten konnten nicht berechnet werden.

## 2.2 Isolierung und Charakterisierung der *pecp1*-T-DNA-Insertionslinien

In den *in vitro*-Studien des vorangestellten Kapitels 2.1 erfolgte die enzymatische Aufklärung der rekombinanten PECP1. Um die Funktion der PECP1 näher charakterisieren zu können, sollte mit *Arabidopsis thaliana* T-DNA-Insertionslinien gearbeitet werden, welche das Protein nicht mehr bilden. Dazu wurde zunächst eine Datenbank-Analyse durchgeführt. Über die *TAIR*-Datenbank (<http://www.arabidopsis.org/>) konnten Informationen zu Mutantenlinien gewonnen werden. Verschiedene Forschungseinrichtungen bieten T-DNA-Insertionslinien von *A. thaliana* an. Die Generierung der *Atlg17710*-T-DNA-Mutantenlinien, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden (siehe 5.1.9), erfolgte durch drei verschiedene Institute:

- Die GABI-Kat-*Atlg17710*-T-DNA-Insertionslinie wurde aus der GABI-Kat-Kollektion bezogen (Alonso *et al.*, 2003). Die Generierung der Linie erfolgte unter Verwendung von Pflanzen des Ökotyps Col-0. Sie trägt eine T-DNA-Insertion des Vektors pAC106. Zur Vereinfachung der Bezeichnung wurde die Linie *pecp1-1* genannt.
- Die WiscDsLOx-*Atlg17710*-T-DNA-Insertionslinie wurde aus der WiscDsLox-T-DNA-Kollektion bezogen (Woody *et al.*, 2007). Die Generierung der Linie erfolgte unter Verwendung von Pflanzen des Ökotyps Col-0. Sie trägt eine T-DNA-Insertion des Vektors pDsLox. Die Linie wurde *pecp1-2* genannt.
- Die SALK-*Atlg17710*-T-DNA-Insertionslinie entstammt der SALK-T-DNA-Kollektion, die im Col-0-Hintergrund unter Verwendung des Vektors pROK2 generiert wurde (Alonso *et al.* 2003). Die Linie wurde in dieser Arbeit *pecp1-3* genannt.

Nach den Angaben der Datenbankeinträge der einzelnen Institute enthalten alle benannten Linien eine T-DNA-Insertion im kodierenden Bereich des Gens *Atlg17710*, welche ein unterbrochenes oder fehlendes Transkript bewirken sollte und somit die Translation des vollständigen Proteins unterbinden. Die nachfolgende schematische Darstellung (Abb. 18) zeigt die Lage der T-DNA-Insertionen aller drei Linien im Locus *Atlg17710* auf Chromosom 1 von *A. thaliana*.



**Abbildung 18: Untersuchte T-DNA-Insertionen im Gen *PECPI* auf dem Chromosom 1.**

Die Darstellung wurde anhand der Informationen der einzelnen Institute zu den *pecp1*-T-DNA-Mutantenlinien gefertigt. Der Ausschnitt des Arabidopsis-Chromosoms 1 zeigt die native *PECPI*-Promotorregion, das *Atlg17710*-Strukturgen mit jeweils 3 Introns zwischen den kodierenden Sequenzen und die Lage der T-DNA-Insertionen der drei Linien. Es ist die jeweilige Größe einer einfachen T-DNA-Insertion angegeben.

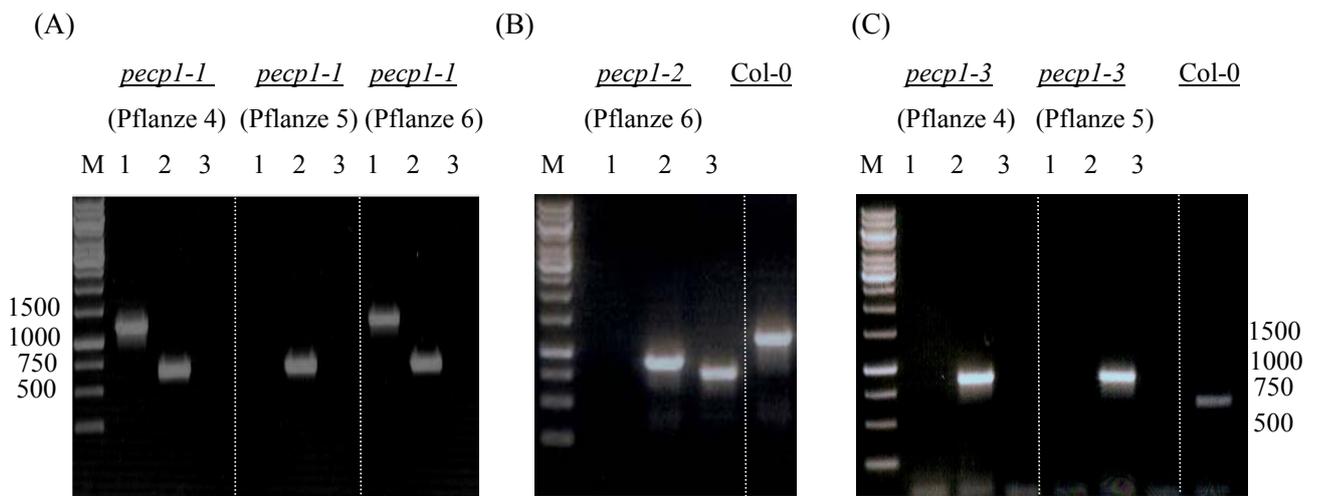
Zur Überprüfung der Angaben zu den T-DNA-Insertionen der Mutantenlinien wurden Pflanzen aus dem transgenen Samenmaterial angezogen. Zur Isolierung homozygoter Pflanzen wurden 10 dieser Pflanzen mit Hilfe einer *PCR* analysiert (siehe Abb. 19). Alle Arbeitsschritte, die zur Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinien nötig waren, wurden zusammen mit Daniela Ditfe in der Arbeitsgruppe durchgeführt. Um zu prüfen, ob die gewonnenen Pflanzen homo- bzw. heterozygot sind und in welcher Orientierung die T-DNA-Insertionen vorlagen, wurden *PCRs* zur Genotypisierung durchgeführt (siehe 5.3.12). Die *PCR*-Ansätze wurden so gestaltet, dass mit Hilfe von verschiedenen *Primer*-Kombinationen unterscheidbare Produkte entstehen konnten. Die *Primer*-Kombinationen wurden für die jeweilige Linie mit 1, 2 und 3 bezeichnet, auch wenn die *Primer* variierten (siehe Tabelle 7).

Mit der *Primer*-Kombination 1 konnten nur Produkte amplifiziert werden, wenn in mindestens einem der zwei Chromosomen keine T-DNA-Insertion in der *Atlg17710*-Sequenz vorlag, die Gensequenz somit dem Wildtyp entsprach. Für den Nachweis der T-DNA-Insertion und die Einschätzung der Orientierung der T-DNA wurde *Left-Border-Primer* in Kombination mit einem der genspezifischen *Primer* eingesetzt. Die *Left-Border-Primer* binden am linken Rand der T-DNA und amplifizieren einen Teil der Insertionssequenz. Diese Wahl der *Primer* entspricht der Kombination 2 und 3 in der Tabelle 7. Die Abbildungen 19 A, B und C zeigen das Ergebnis dieser *PCR*-Analyse.

**Tabelle 7: PCR-Primer-Kombinationen und erwartete Produktgrößen.**

Linie	Primer-Kombination*	Primer forward	Primer reverse	PCR-Produkte	Hinweis auf
Col-0	1	At1-2f	At1-2rDD	663 bp	Wildtyp
	2	A.thaliana-1f	A.thaliana-1r	1213 bp	Wildtyp
<i>pecp1-1</i>	1	A.thaliana-1f	A.thaliana-1r	1213 bp	Wildtyp
	2	A.thaliana-1f	GABI	663 bp	T-DNA
	3	GABI	A.thaliana-1r	945 bp	T-DNA
<i>pecp1-2</i>	1	A.thaliana-1f	A.thaliana-1r	1213 bp	Wildtyp
	2	A.thaliana-1f	WiscDsLox	910 bp	T-DNA
	3	WiscDsLox	A.thaliana-1r	845 bp	T-DNA
<i>pecp1-3</i>	1	At1-2f	At1-2rDD	663 bp	Wildtyp
	2	At1-2f	LBa1	946 bp	T-DNA
	3	LBa1	At1-2rDD	390 bp	T-DNA

\*Die jeweiligen Primersequenzen sind in der Tabelle 16 hinterlegt.



**Abbildung 19 (A, B und C): Nachweis der Homozygotie der Arabidopsis T-DNA-Insertionslinien.**

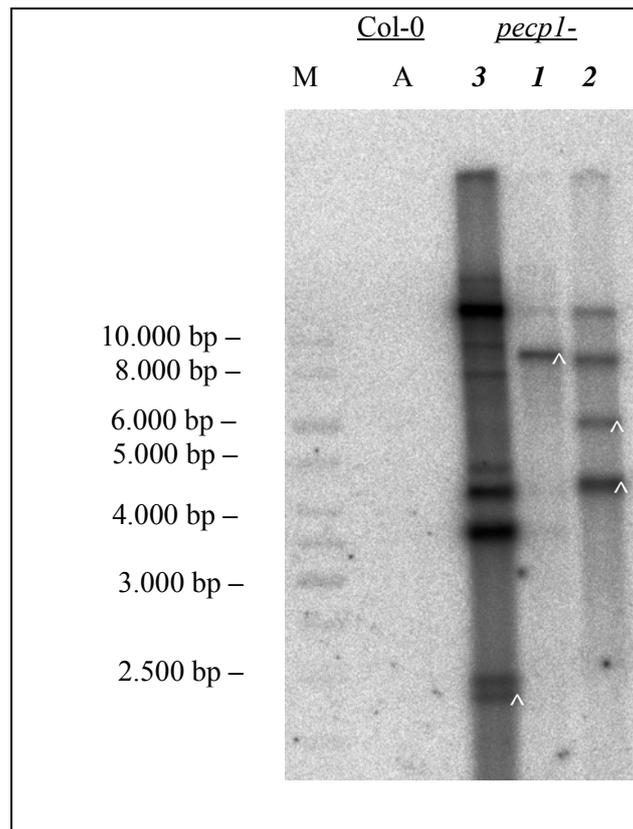
Dargestellt sind die PCR-Produkte im 1%igen Agarosegel. Die angegebene Zahlenfolge 1, 2 und 3 kennzeichnet die verwendeten Primer-Kombinationen der jeweiligen Mutantenlinien (Bild A – *pecp1-1*, Bild B – *pecp1-2* und Bild C – *pecp1-3*) entsprechend der in der Tabelle 7 angegebenen Reihenfolge. Für die AtCol-0-Pflanzen im Bild B) wurde die Primer-Kombination: 2 und im Bild (C) die Primer-Kombination 1 verwendet (siehe Tab. 7). Größenstandard (M): *GeneRuler 1kb DNA Ladder*.

Das Bild (A) zeigt das Ergebnis von drei getesteten *pecp1-1*-Pflanzen. Es sind bei den Pflanzen 4 und 6 Produktbanden der Größe von ~ 1213 bp (Primer-Kombination 1) und ~ 663 bp (Primer-Kombination 2) amplifiziert worden. Diese Pflanzen sind heterozygot. Die getestete Pflanze 5 zeigt mit den genspezifischen Primern keine Produktbande. Es ist eine Bande der Größe ~ 663 bp amplifiziert worden (Primer-Kombination 2), welche dem Produkt bei T-DNA-Insertion entspricht.

Diese Pflanze ist homozygot. Eine zusätzliche T-DNA-Bande der Größe ~ 945 bp (*Primer-Kombination 3*) fehlt. Daraus ist abzuleiten, dass die T-DNA an dieser Stelle einfach integriert ist. Das Bild (B) zeigt das Ergebnis der getesteten *pecp1-2*-Pflanze 6 und einer getesteten Col-0-Kontrollpflanze. Die Pflanze 6 zeigt keine dem Wildtyp entsprechende Produktbande der Größe von ~ 1213 bp (*Primer-Kombination 1*). Es sind Banden der Größe ~ 910 bp (*Primer-Kombination 2*) und ~ 845 bp (*Primer-Kombination 3*) vorhanden, welche den T-DNA-Produkten entsprechen. Die Pflanze 6 ist homozygot. Da jedoch beide möglichen T-DNA-Produkte existieren, liegt eine doppelte T-DNA-Insertion vor. Die Col-0 Kontrollpflanze zeigt die dem Wildtyp entsprechende Produktbande der Größe von ~ 1230 bp (Col-0 *Primer-Kombination 2*). Das Bild (C) zeigt das Ergebnis von zwei getesteten *pecp1-3*-Pflanzen und einer getesteten Col-0-Kontrollpflanze. Beide *pecp1-3*-Pflanzen enthalten jeweils nur ein T-DNA-Insertionsprodukt der Größe von ~ 946 bp (*Primer-Kombination 2*). Eine dem Wildtyp entsprechende Produktbande von ~ 1213 bp konnte nicht nachgewiesen werden. Beide *pecp1-3*-Pflanzen (4 und 5) sind demzufolge homozygot. Da das mögliche T-DNA-Produkt von ~ 390 bp fehlt (*Primer-Kombination 3*), ist die T-DNA hier ausschließlich einfach integriert. Die Col-0 Kontrollpflanze zeigt die dem Wildtyp entsprechende Produktbande der Größe von ~ 663 bp (Col-0 *Primer-Kombination 1*).

Im Anschluss an diese Prüfung sollte durch die Sequenzierung der *PCR*-Produkte die Position der T-DNA-Insertionen in allen drei Linien bestimmt werden. Die vollständigen Sequenzen zeigten, dass die T-DNA-Sequenzen in *pecp1-1*, *pecp1-2* und *pecp1-3* im offenen Leseraster der *Atlg17710*-Sequenz integriert sind. Als Bezugspunkt diente die 1. Base (+1) des ATG-Startcodons (siehe Abb. 18). Die T-DNA-Insertion von *pecp1-1* befindet sich demzufolge zwischen bp 461 und 462 am Ende des 2. Introns. Die T-DNA-Insertion von *pecp1-2* liegt zwischen den Basenpaaren 639 und 640 im 3. Intron des Chromosoms 1. Die T-DNA-Insertion von *pecp1-3* befindet sich zwischen bp 676 und 677, im 4. kodierenden Bereich des Chromosoms 1.

Die Charakterisierung der T-DNA-Insertionslinien umfasste, neben der Testung auf Homozygotie und der Überprüfung des Integrationsortes im Gen, auch eine Analyse der Anzahl der Kopien der T-DNA-Insertionen. Mit Hilfe eines *Southern Blots* sollte die Kopienanzahl in den drei *pecp1*-Mutantenlinien bestimmt werden (siehe 5.3.11). Jede untersuchte Probe enthielt 10 µg genomische DNA, welche zuerst mit dem Restriktionsenzym *HindIII* geschnitten und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt wurde. Anschließend hybridisierte die geschnittene DNA mit einer α-[<sup>32</sup>P]-dCTP markierten DNA-Sonde. Die Sonde war gegen den in allen T-DNA-Insertionslinien enthaltenen 35S-Promotor gerichtet. In der Abbildung 20 ist das Ergebnis der *Southern Blot*-Analyse zu sehen.



**Abbildung 20: Southern Blot-Analyse der T-DNA-Insertionslinien.**

Die exponierte und ausgelesene *Imagerplatte* zeigt die hybridisierten Spaltprodukte in den T-DNA-Insertionslinien *pecp1-3*, *pecp1-1* und *pecp1-2*. Jede Probe enthält 10 µg Spaltprodukte der isolierten genomischen DNA, welche gelelektrophoretisch getrennt und anschließend mit einer  $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ -dCTP markierten DNA-Sonde hybridisiert wurden. Die Sonde war gegen den in allen T-DNA-Insertionen enthaltenen 35S-Promotor gerichtet. Die Größenangaben sind rechts im Bild gezeigt. Die erwarteten Produktbanden sind mit dem Symbol ^ gekennzeichnet.

Die Untersuchung der Homozygotie der *pecp1-1*-Pflanze zeigte, dass die T-DNA einfach integriert ist (Abb. 19). Demzufolge ist der 35S-Promotor einmal vorhanden und im *Southern Blot* eine Produktbande zu erwarten. Die *Imager*-Abbildung zeigt eine entsprechende Produktbande (Abb. 20, Spur: *pecp1-1*, mit ^ markiert). Durch Bindung an den 35S-Promotor detektierte die radioaktive Sonde die erwartete T-DNA-Insertion. Es gibt keine weiteren T-DNA-Insertionen im Genom der Pflanze. Weitere sehr schwache Schattenbanden resultieren aus unspezifischen Bindungen der Sonde, die durch abschließende Waschschrte nicht vollständig entfernt werden konnten.

Das Genom der *pecp1-2*-Pflanze enthält eine doppelte T-DNA-Insertion im Gen *PECP1* (Abb. 19). Demzufolge sind zwei DNA-Produkte der Größen von etwa 5.900 bp und 4.450 bp zu erwarten, da der 35S-Promotor doppelt integriert ist und das verwendete Restriktionsenzym *HindIII* zwischen den Promotorsequenzen der beiden T-DNAs schneidet. Der Film zeigt die zwei entsprechenden Produkte. Demzufolge sind die doppelten T-DNA-Insertionen vorhanden (Abb. 20, Spur: *pecp1-2*, mit ^ markiert). Es gibt jedoch noch zwei weitere Banden im Bereich von > 8.000 bp. Sie sind auf Bindungen der Sonde an den 35S-Promotor von weiteren T-DNA-Sequenzen zurückzuführen.

Der *PCR*-Test der *pecp1-3*-Pflanze auf Homozygotie hatte schon gezeigt, dass die T-DNA- nur einmal vorhanden ist (Abb. 19). Demzufolge war im *Southern-Blot* nur eine Produktbande der Größe von etwa 2.000 bp zu erwarten. Das *Imager*-Bild zeigt eine Bande der erwarteten Produktgröße (Abb. 20, Spur: *pecp1-3*, mit ^ markiert). Es gibt weitere charakteristische Banden, die eine Bindung der radioaktiven Sonde an die 35S-Promotorsequenz der T-DNA zeigen. Die Pflanze enthält somit, neben der gewünschten T-DNA-Insertion im 4. Exon, weitere unerwartete T-DNA-Insertionen an nicht bekannten Positionen im Genom.

Als Kontrolle des Experiments wurde genomische DNA einer Col-0-Pflanze untersucht. Es konnte keine T-DNA-Insertion und auch keine unspezifischen Bindungen der Sonde an die DNA detektiert werden (Abb. 20, Spur: A).

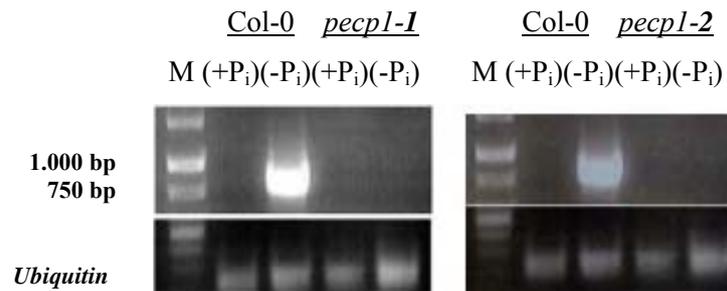
Die isolierten und charakterisierten T-DNA-Mutantenpflanzen *pecp1-1*, *pecp1-2* und *pecp1-3* enthalten die T-DNA-Insertionen an den Positionen, welche in der Abbildung 18 dargestellt sind. Die Pflanzen *pecp1-2* und *-3* enthalten weitere T-DNA-Integrationen. Die nachfolgenden Untersuchungen zur *PECP1* in den mutierten Pflanzen erfolgten mit allen drei analysierten T-DNA-Insertionslinien.

### 2.2.1 Transkriptgehalte des Gens *PECP1* in T-DNA-Insertionslinien

Um der Frage nachzugehen, ob die Insertion der verschiedenen T-DNA-Moleküle im Genom der Arabidopsis-Mutantenpflanzen tatsächlich zur Inaktivierung des Gens *PECP1* am Locus *At1g17710* führen, sollte der Transkriptgehalt des Gens in den Linien *pecp1-1*, *pecp1-2* und *pecp1-3* analysiert werden. Es war davon auszugehen, dass durch die Insertion im Gen keine mRNA mehr gebildet wird. Es besteht jedoch auch die Möglichkeit, dass eine verkürzte mRNA vorliegt, die die korrekte Proteintranslation hemmen könnte. Da die Wildtyp-Pflanzen nur unter  $P_i$ -Mangel hohe Mengen an *PECP1*-mRNA enthielten (siehe Abb. 7), mussten die Mutantenlinien ebenfalls unter Phosphatmangel-Bedingungen angezogen werden. Die Kultivierung erfolgte wiederum unter submersen Bedingungen. Die Proben, welche unter Phosphatversorgung angezogen wurden, dienten zur Kontrolle des Experiments.

Die Analysen erfolgten mit quantitativer *Real Time-PCR* (qRT-PCR, 5.3.5) und mit semiquantitativer *PCR* (sq-PCR, 5.3.6). Um vergleichende Aussagen zur Expressionsstärke des Gens treffen zu können, wurden sowohl bei der qRT-PCR als auch bei der sq-PCR jeweils äquivalente Mengen cDNA als *Template* eingesetzt. Bei der sq-PCR-Methode diente das Amplifikat des *House-keeping*-Gens *Ubiquitin* als Standard. Bei der qRT-PCR wurde anhand der Transkriptmenge des *PECP1* der unter (+ $P_i$ )-angezogenen Wildtyp-Proben kalibriert.

Für die sq-PCR-Studien wurden die *Primer* 1 und 2 (siehe Tab. 16) eingesetzt, welche den gesamten kodierenden Bereich (840 bp) umspannen. Die Abbildung 21 zeigt die Ergebnisse der sq-PCR-Studien der Mutantenlinien *pecp1-1* und *-2*.

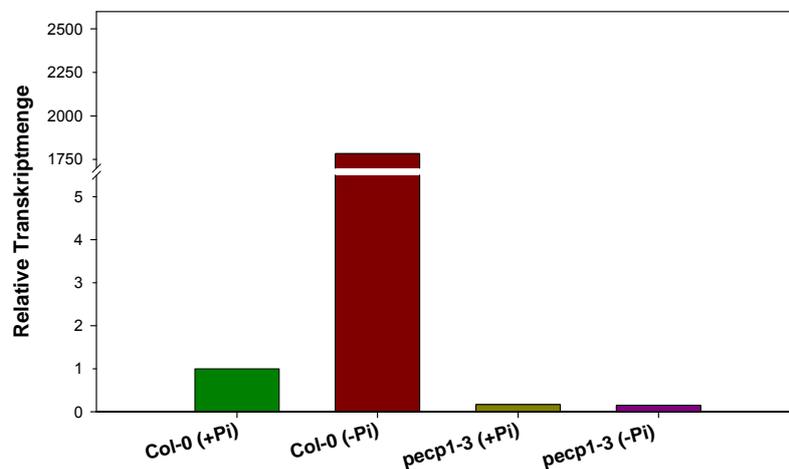


**Abbildung 21: sq-PCR-Analyse der Transkripte des *PECPI* in *pecp1-1* und *pecp1-2*-Pflanzen.**

Die Agarosegele zeigen ausschließlich PCR-Produkte von *PECPI* (~ 840 bp) in Spuren der Col-0-Proben unter (-P<sub>i</sub>). Im unteren Teil des Gels sind die PCR-Produkte des *Ubiquitin* zu sehen. Als Marker wurden der *GeneRuler* 1kb DNA Ladder (oben) und der *Quick-Load* 100 bp Ladder (unten) verwendet.

Bei der Analyse der Proben der Mutantpflanzen konnten keine *PECPI*-Transkripte unter induzierenden Bedingungen nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis belegt, dass die T-DNA-Insertionen in diesen Mutantenlinien *pecp1-1* und *pecp1-2* zum vollständigen Verlust der mRNA führten. In den Agarosegelen sind ausschließlich die PCR-Produkte von *PECPI* (~ 840 bp) der Col-0-Proben nach Phosphatmangel nachweisbar.

Die Analyse der relativen *PECPI*-Transkriptmengen in der *pecp1-3*-Linie erfolgte mit einer qRT-PCR-Studie. Die Abbildung 22 zeigt das Ergebnis dieser Analyse.



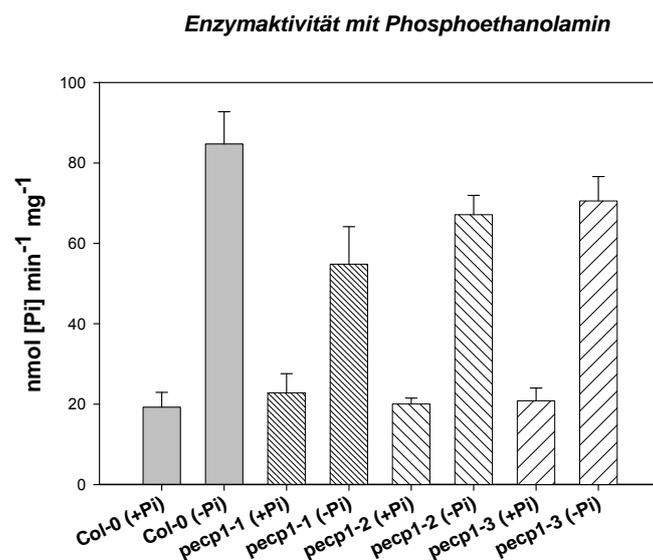
**Abbildung 22: qRT-PCR-Analyse der relativen Transkriptmengen des *PECPI* in *pecp1-3* im Vergleich zu Col-0.** In der Abbildung sind die Transkripte des *PECPI* der *pecp1-3*-Pflanze (4) unter (+P<sub>i</sub>) und unter (-P<sub>i</sub>) gezeigt. Zur Kalibrierung wurde die Transkriptmenge des *PECPI* der (+P<sub>i</sub>)-Col-0-Proben verwendet.

Der Vergleich der relativen Transkriptmengen der Wildtyp-Proben belegt eine 1750fache Erhöhung der Transkriptmengen unter Phosphatmangel-Bedingungen gegenüber der Transkriptmenge unter Phosphatversorgung. Wie bereits im Abschnitt 2.1.2 (Abb. 7) gezeigt, wird *PECPI* unter P<sub>i</sub>-Defizit

transkriptionell stark induziert. Die T-DNA-Insertion in der Mutantenlinie *pecp1-3* führt zur totalen Inaktivierung des Gens in den Pflanzen, da keine Transkripte mehr nachgewiesen werden konnten. Die basale mRNA-Menge, welche in den unter Phosphatversorgung angezogenen Col-0-Pflanzen vorhanden ist, wird in der T-DNA-Insertionslinie praktisch auf Null reduziert.

### 2.2.2 Phosphatase-Aktivität in den Extrakten der *pecp1*-Mutantenlinien

Nachdem gezeigt werden konnte, dass in allen drei Mutantenlinien keine *PECPI*-Transkripte mehr vorhanden sind, sollte im nächsten Schritt die Phosphoethanolamin/Phosphocholin-Phosphatase-Aktivität in Extrakten dieser Pflanzen untersucht werden. Die zur Quantifizierung der *PECPI*-Aktivität benötigten Wildtyp- und Mutantenpflanzen wuchsen submers unter Phosphatversorgung bzw. unter Phosphatmangel heran, bevor sie nach der unter 5.5.3 beschriebenen Methode extrahiert wurden. Die Enzymaktivitäten wurden auf die Proteinkonzentrationen der Extrakte bezogen. Die Protein-konzentrationen wurden nach der Bradford-Methode bestimmt (5.5.4). Die Enzymaktivität wurde wiederum anhand der Freisetzung von Phosphat bestimmt (5.5.5, nach Zilversmit & Davis). Die kinetische Charakterisierung der Phosphatase-Reaktion erfolgte nach der im Abschnitt 5.5.6 angegebenen Methode. Da die *in vitro*-Umsatzgeschwindigkeiten der rekombinanten *PECPI* mit Phosphoethanolamin als Substrat höher waren als mit Phosphocholin (2.1.5), wurde zunächst dieses Substrat in dem Enzymtest eingesetzt. Zur Absicherung aller Ergebnisse wurden jeweils zwei Durchläufe aller Experimente durchgeführt. Das Diagramm (Abb. 23) zeigt die Ergebnisse zur Untersuchung mit dem Substrat Phosphoethanolamin.

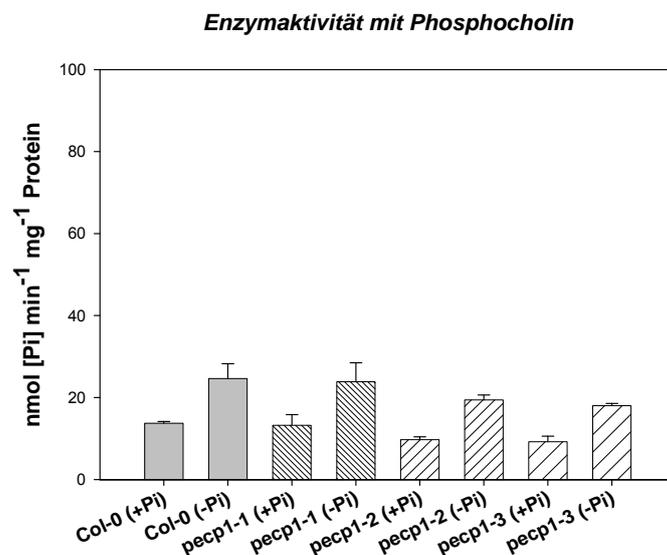


In  
den  
un-

**Abbildung 23: Phosphatase-Aktivitätstest mit Phosphoethanolamin als Substrat.** Untersucht wurden Extrakte der Wildtyp- und der Mutanten-Pflanzen, welche sowohl unter (+P<sub>i</sub>) als auch unter (-P<sub>i</sub>) heranwuchsen. Es wurden jeweils 3 biologische Proben \* 2 technische Replikate untersucht.

tersuchten Proben der Col-0-Pflanzen, welche unter Phosphatmangel wuchsen, konnte eine stark erhöhte  $P_i$ -Freisetzung von etwa  $85 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  aus Phosphoethanolamin bestimmt werden. Dagegen ist die Phosphat-Freisetzung von etwa  $20 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  in den Extrakten der Col-0-Pflanzen, welche unter Phosphatversorgung wuchsen, um mehr als das 4fache geringer. In den Proben der unter Phosphatmangel angezogenen Mutantpflanzen konnte eine  $P_i$ -Freisetzung von etwa  $60 - 75 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  bestimmt werden. Vergleicht man die Werte mit den Werten der (- $P_i$ )-Col-0-Pflanzen, so kann festgestellt werden, dass die  $P_i$ -Freisetzung in den *pecp1*-Proben um etwa  $15 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  geringer ist. Diese geringere Phosphat-Freisetzung resultiert aus dem Verlust der PECP1-Aktivität. Vergleicht man nun die Werte der *pecp1*-Linien, die unter (+ $P_i$ ) wuchsen, mit denen der (+ $P_i$ )-Col-0-Proben, ist festzustellen, dass sie annähernd gleich sind. Der Ausfall des *PECP1*-Gens hat unter Phosphatversorgung keinen Einfluss auf den Umsatz von Phosphoethanolamin. Dieses Ergebnis steht in Übereinstimmung mit der nachgewiesenen, geringen Transkriptmenge von *PECP1* und *PECP2* bei Phosphatversorgung (Abb. 6 und 7). Die Abbildung 23 zeigt aber auch, dass in PECP1-defizienten Mutantpflanzen unter Phosphatmangel eine erhöhte Phosphoethanolamin-Hydrolyse gefunden wurde. Daraus folgt, dass neben PECP1 weitere Phosphatase-Spezies vorliegen müssen, deren Synthese ebenfalls auf Phosphatmangel anspricht.

Im nächsten Teil des Experiments wurden 3 mM Phosphocholin im Phosphatase-Assay eingesetzt. Alle anderen Bedingungen blieben unverändert. Die Konzentration des Phosphocholins war auf 3 mM begrenzt, da in Voruntersuchungen mit Rohextrakten Substratüberschuss-Hemmungen der Phosphatasereaktion in Gegenwart von Phosphocholinkonzentrationen über 3 mM auftraten. Diese Einschränkung sollte die Aussagekraft des Experiments nicht stark beeinträchtigen, da diese Phosphocholin-Konzentration noch immer dem 6.8fachen  $K_m$ -Wert von PECP1 gegenüber PCho entspricht. Die Abbildung 24 zeigt das Ergebnis dieser Studie.



**Abbildung 24: Phosphatase-Aktivitätstest mit Phosphocholin als Substrat.** Untersucht wurden Extrakte der Wildtyp- und der Mutanten-Pflanzen, welche sowohl unter (+ $P_i$ ) als auch unter (- $P_i$ ) heranwuchsen. Es wurden jeweils 3 biologische Proben \* 2 technische Replikate untersucht.

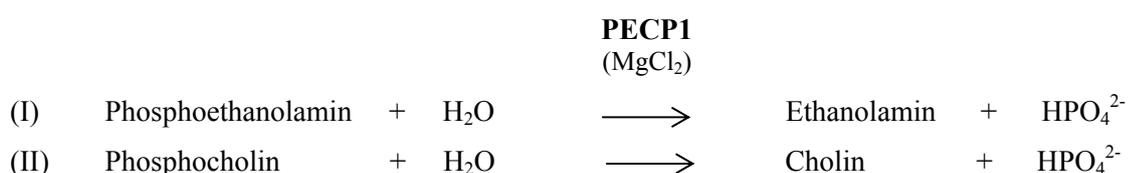
Grundsätzlich wurde für Phosphocholin mit allen Extrakten eine niedrigere Aktivität bestimmt als für Phosphoethanolamin. Darüber hinaus wurden für alle Extrakte deutliche Aktivitätssteigerungen infolge von Phosphatmangel beobachtet. Allerdings wirkt sich Phosphatmangel auf den Umsatz von Phosphocholin quantitativ nicht so stark aus wie auf den Umsatz von Phosphoethanolamin. Bemerkenswert ist jedoch vor allem, dass der Einfluss des Phosphatmangels auf den Phosphocholin-Verbrauch durch die Extrakte für die Wildtyp- und die Mutantenpflanzen nahezu gleich ist. Daraus folgt, dass der Phosphocholin-Umsatz durch die Extrakte nicht hauptsächlich auf PECP1 zurückgeführt werden kann, da die Synthese des Enzyms durch Phosphatmangel stark begünstigt wird. Es muss jedoch berücksichtigt werden, dass die spezifische Aktivität von PECP1 gegenüber Phosphocholin ohnehin um mehr als eine Größenordnung unter der gegenüber Phosphoethanolamin liegt (siehe Tab. 2), was einen Nachweis des Phosphatmangel-Einflusses anhand des Phosphocholin-Verbrauchs erheblich erschwert.

Zusammenfassend kann abgeleitet werden, dass der Verlust der PEA-spaltenden Enzymaktivität auf den Ausfall der PECP1 zurückzuführen ist. Dagegen zeigten die Untersuchungen mit dem Substrat Phosphocholin, dass eine Reduktion der PCho-spaltenden Aktivität in den *pecp1*-Mutantenlinien nicht nachweisbar ist. Es kann somit festgestellt werden, dass vorrangig Phosphoethanolamin das Substrat der PECP1-Reaktion in den Pflanzenextrakten ist. Zur Überprüfung dieser Annahme wurden Überexpressionspflanzen generiert, die zusätzlich das rekombinante PECP1-Myc<sub>10</sub>-Protein enthielten. Auf diese Ergebnisse wird später eingegangen (siehe Abschnitt 2.3).

### 2.2.3 Quantifizierung von Metaboliten der PECP1-Reaktion

Um die physiologische Rolle der PECP1 und die Auswirkungen der PECP1-Reaktion in den Pflanzen genauer zu erfassen, sollte der endogene Spiegel der an der enzymatischen Reaktion beteiligten Metabolite Phosphoethanolamin, Phosphocholin, Ethanolamin und Cholin in Pflanzenextrakten bestimmt werden. Diese Untersuchungen wurden in Kooperation mit Herrn Dr. Frank Hirche (Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften der MLU Halle-Wittenberg, Abt. Frau Prof. Stangl) durchgeführt.

Die Mg<sup>2+</sup>-abhängige PECP1 setzt die Substrate Phosphoethanolamin und Phosphocholin entsprechend der Stöchiometrie der Reaktionsgleichungen I und II um.



Es stellte sich die Frage, welche Auswirkungen der Ausfall der Enzymfunktion auf die Metabolitgehalte in den Mutantepflanzen unter Phosphatversorgung und unter Phosphatmangel hat.

Das Produkt Phosphat wurde über die Phosphataseaktivitäts-*Assays* in Pflanzenextrakten quantifiziert (siehe 2.2.2). Phosphoethanolamin ist im Zellextrakt (mit 1% Anteil am gesamten Pool der phosphorylierten Verbindungen der Zelle) in geringen Mengen vorhanden (Martin & Tolberg, 1998; Plaxton & Carswell, 1999). Mit der im Abschnitt 5.6 beschriebenen Methode konnte in der vorliegenden Arbeit in Arabidopsis-Extrakten Phosphoethanolamin nur in Spuren nachgewiesen werden, eine sichere Quantifizierung war aber nicht möglich. Dagegen gelang die quantitative Bestimmung der Verbindungen Phosphocholin, Cholin und Ethanolamin in Col-0- und *pecp1-1*, *-2*, *-3*-Pflanzenextrakten. Die Pflanzen wurden im Vollmedium und im P<sub>i</sub>-Mangel-Medium der Flüssigkultur angezogen (siehe 5.2.5) und mittels Methanol-Wasser-(2:1)-Lösung extrahiert (5.6). Die Tabelle 8 enthält die Messergebnisse zum Phosphocholin-, Cholin- und Ethanolamin-Spiegel in den Extrakten der Col-0- und *pecp1-1*, *-2*, *-3*-Pflanzen, welche unter Phosphatversorgung oder unter Phosphatmangel heranwuchsen.

**Tabelle 8: Bestimmung von Phosphocholin, Cholin und Ethanolamin in *knock out*-Pflanzen.**

(+P <sub>i</sub> ) – Anzucht			
Pflanzenlinie	Phosphocholin [nmol/100 mg FG]	Cholin [nmol/100 mg FG]	Ethanolamin [nmol/100 mg FG]
Col-0	14 ± 1.0	134 ± 3.0	29 ± 11.7
<i>pecp1-1</i>	10 ± 0.8	127 ± 9.0	37 ± 7.4
<i>pecp1-2</i>	16 ± 0.8	145 ± 1.9	19 ± 0.9
<i>pecp1-3</i>	14 ± 0.9	143 ± 5.3	25 ± 5.8
(-P <sub>i</sub> ) – Anzucht			
Pflanzenlinie	Phosphocholin [nmol/100 mg FG]	Cholin [nmol/100 mg FG]	Ethanolamin [nmol/100 mg FG]
Col-0	3 ± 0.6	136 ± 5.3	25 ± 9.7
<i>pecp1-1</i>	2 ± 0.2	136 ± 8.1	16 ± 12.1
<i>pecp1-2</i>	3 ± 0.8	158 ± 11.1	26 ± 10.1
<i>pecp1-3</i>	3 ± 0.7	152 ± 5.1	28 ± 6.6

Phosphocholin, der Ausgangsmetabolit zur Freisetzung des Cholins, ist in den Extrakten aller Proben in relativ geringen Konzentrationen nachweisbar. Dennoch ist ein deutlicher Trend in den untersuchten Proben vorhanden. In unter Phosphatmangel-Bedingungen angezogenen Pflanzen wird ein deutlich niedriger Gehalt an Phosphocholin gefunden als in unter Phosphatversorgung angezogenen Pflanzen. Das bedeutet, dass Phosphocholin in der P<sub>i</sub>-Mangel-Situation als Metabolit verstärkt umgesetzt wird und dadurch sein Spiegel sinkt. Dieser Befund trifft sowohl für Wildtyp- als auch für Mutantepflanzen zu, die keine PECP1-Synthese zeigen. Daraus folgt, dass der beobachtete Unterschied im Phosphocholin-Niveau nicht vorrangig auf die PECP1-Synthese unter Phosphatmangel-

Bedingungen zurückführbar ist. Dies steht mit dem in Abschnitt 2.2.2 beschriebenen Ergebnis zur enzymatischen Aktivität in Pflanzenextrakten in Übereinstimmung (siehe Abb. 24).

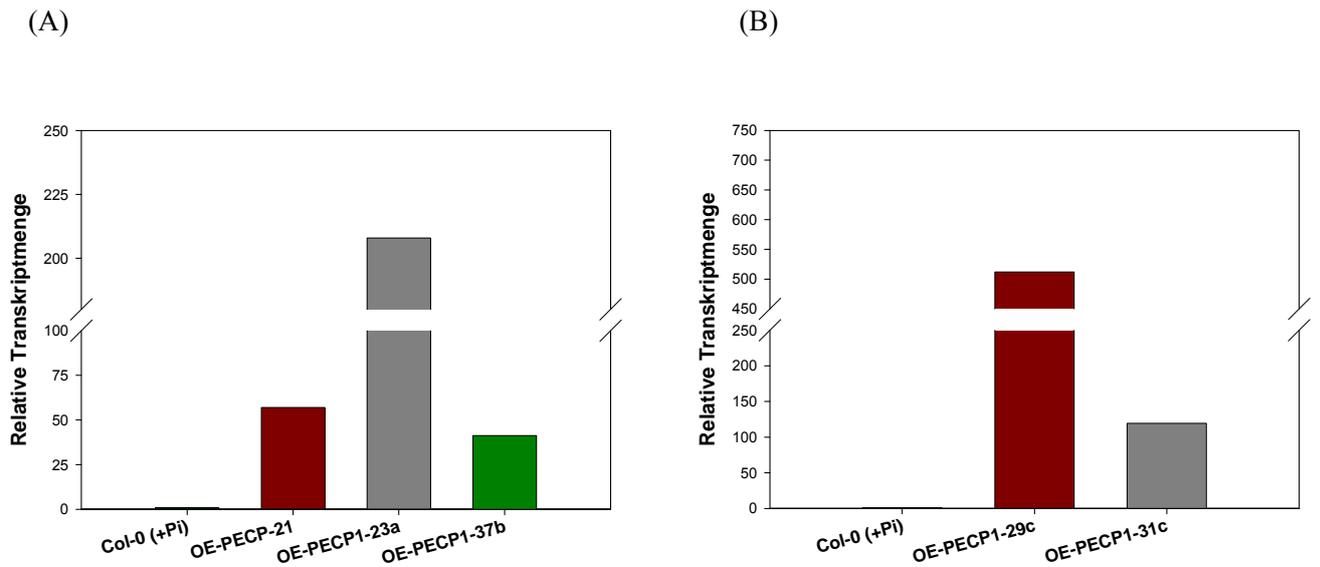
Beim Vergleich der Cholin-Spiegel ist kein signifikanter Unterschied zwischen unter Phosphatversorgung und unter Phosphatmangel erhaltenem Pflanzenmaterial festzustellen. Auch diese Feststellung trifft gleichermaßen auf Wildtyp- und Mutantpflanzen zu. Prinzipiell wäre unter Phosphatmangel eine Erhöhung des Cholinpiegels zu erwarten gewesen. Vergleicht man die entsprechenden Werte ohne Berücksichtigung der angegebenen Standardabweichung miteinander, so ist eine entsprechende Tendenz vorhanden. Sie tritt jedoch quantitativ hinter die Schwankungsbreiten der Messwerte innerhalb der jeweiligen Mutantenlinie zurück. Daher ist die beobachtete Tendenz sehr vorsichtig zu bewerten. Da der Unterschied der Phosphocholin-Spiegel in Hinblick auf Phosphatversorgung und Phosphatmangel quantitativ viel stärker ausgeprägt ist, ist davon auszugehen, dass unter Phosphatmangel-Bedingungen auch der Verbrauch von Cholin erhöht ist. Auch dieser Befund steht jedoch nicht mit der durch Phosphatmangel induzierten Synthese von PECP1 in Zusammenhang.

Der Ethanolamin-Spiegel liegt in allen Extrakten deutlich niedriger als der entsprechende Cholin-Spiegel, wobei der Faktor zwischen 5 und 7 liegt. Eine einheitliche Tendenz zur Verschiebung des Ethanolamin-Spiegels in Folge von Phosphatmangel ist nicht feststellbar. Als Erklärungsmöglichkeit dafür bietet sich ein rascher Verbrauch zusätzlich anfallenden Ethanolamins unter Phosphatmangel-Bedingungen an. Da in Abschnitt 2.2.2 gezeigt werden konnte, dass Arabidopsis-Extrakte, die aus unter Phosphatmangel angezogenen Pflanzen gewonnen wurden, Phosphoethanolamin deutlich schneller umsetzen als Extrakte aus normalversorgten Pflanzen, wäre unter Phosphatmangel-Bedingungen ein verringerter Phosphoethanolamin-Spiegel zu erwarten. Es war jedoch nicht möglich, unter den vorliegenden Bedingungen entsprechende Daten zu erhalten. Allein unter dieser Voraussetzung wäre eine abschließende Bewertung der physiologischen Rolle von PECP1 denkbar gewesen.

### 2.3 Generierung von Überexpressionspflanzen

Ziel der Generierung dieser transgenen Pflanzenlinien war die zusätzliche stabile Integration des *PECP1*-Gens in das Genom der Arabidopsis Col-0-Pflanzen. Die nachfolgende konstitutive Expression des Gens durch einen vorgeschalteten 35S-Promotor ermöglicht weitere enzymatische und metabolische Untersuchungen der Pflanzen auch unter Phosphatversorgung. Somit können metabolische Veränderungen in der Pflanze direkt nachvollzogen werden, die auf die PECP1-Reaktion zurückzuführen sind. Unter Phosphatmangel-Bedingungen werden gleichzeitig das endogene vorhandene Gen und das zusätzlich eingebrachte Gen exprimiert.





**Abbildung 26: qRT-PCR-Analyse der relativen *PECPI*-Transkriptmengen in Überexpressionspflanzen unter Phosphatversorgung.**

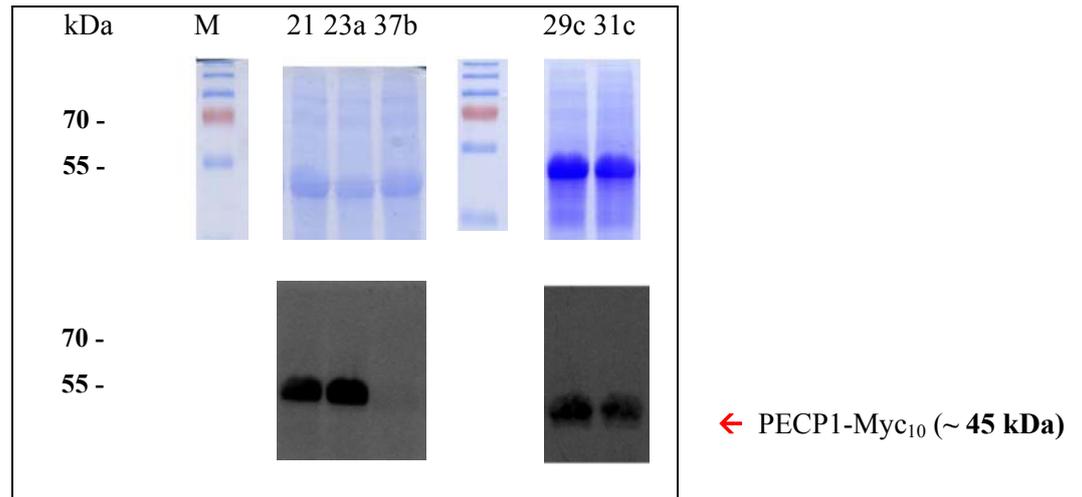
Die Diagramme zeigen relative Transkriptmengen der Linien OE-PECPI-21, -23a und 37b (A) sowie der Linien OE-PECPI-29c und 31c (B) jeweils zum Vergleich zum Wildtyp Col-0.

Die unter Phosphatversorgung angezogenen Überexpressionspflanzen enthalten eine vielfach erhöhte Transkriptmenge des *PECPI*-Gens im Vergleich zu den unter (+Pi) angezogenen Col-0-Pflanzen. Zwischen den Überexpressionslinien schwanken die Werte jedoch erheblich. Die OE-PECPI-29c-Pflanze enthält eine 500fach erhöhte relative Transkriptmenge im Vergleich zum Wildtyp unter gleichen Kultivierungsbedingungen, wobei die restlichen Linien zwischen 50 – 220fach erhöhte Werte aufweisen. Es ist allerdings zu bedenken, dass die Transkription des endogenen Gens unter normalen Bedingungen sehr gering ist, so dass von der relativen Transkriptmenge nicht automatisch auf die daraus resultierende *PECPI*-Proteinkonzentration in den OE-Linien geschlossen werden kann.

### **Western Blot-Analysen**

Im nächsten Schritt der Charakterisierung der Überexpressionspflanzen sollte deshalb das rekombinante OE-*PECPI*-Protein mittels *Immunoblot* in den Extrakten nachgewiesen werden. Mit Hilfe der submersen Kultivierung wurden die Pflanzen angezogen (5.2.5). Die Gesamt-Proteinmenge wurde aus den Keimlingen extrahiert (5.5.3) und die Proteinkonzentration nach Bradford (5.5.4) bestimmt. Der Nachweis erfolgte mittels *SDS-PAGE* und *Western Blot* (5.5.2).

Das native Protein besitzt ein Molekulargewicht von etwa 31.5 kDa. Das rekombinante Protein hat aufgrund des Myc<sub>10</sub>-tags ein Molekulargewicht von etwa 45 kDa. Die *SDS-PAGE* und *Western Blot* Ergebnisse sind in der nachfolgenden Abbildung 27 dargestellt.



**Abbildung 27: SDS-PAGE und Western Blot-Analyse der Arabidopsis Überexpressionspflanzen.**

Die Gelbilder und die darunter angeordneten Filme zeigen die Proben der Überexpressionslinien **21**, **23a** und **37b** und die Proben der Überexpressionslinien **29c** und **31c**. Die Detektion der PECP1 mittels *Immunoblot* erfolgte mit einem primären Myc-Antikörper. Zur Einschätzung der Produktgrößen wurde bei der SDS-PAGE der Standard (M) SM1811 von Fermentas verwendet.

Im Immunoblot konnte das rekombinante PECP1-Protein mit deutlichem Signal in den getesteten OE-Linien **21**, **23a**, **29c** und **31c** nachgewiesen werden. Die Probe der Pflanze **37b** zeigte kein entsprechendes Signal im *Western Blot*. Da die Linie 37b im Vergleich mit den anderen getesteten Linien die geringste relative Transkriptmenge enthält, ist möglicherweise auch die Proteinsynthese am niedrigsten und liegt in diesem Versuch unter der Nachweisgrenze.

Um die Frage der Substratpräferenz der PECP1 in den Pflanzen beantworten zu können, ist es notwendig, die Phosphataseaktivität in den Extrakten der OE-Linien zu bestimmen. Dazu wurden die vier Überexpressionslinien ausgewählt, die das entsprechende rekombinante Protein enthielten.

### 2.3.2 Phosphatase-Aktivität in den Extrakten der Überexpressionspflanzen

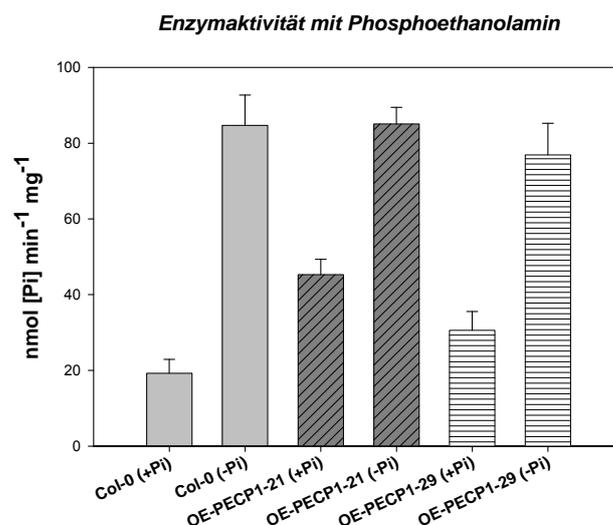
Der Ablauf des Experiments folgte der Prozedur, die bereits zur Analyse der Enzymaktivität der Mutantpflanzen angewendet wurde (2.2.2). Die Keimlinge der vier positiv getesteten Pflanzen wurden angezogen, die Gesamt-Proteinmenge extrahiert und die Phosphatase-*Assays* mit dem Rohextrakt gestartet. Parallel dazu wurden Wildtyp-Pflanzen unter Phosphatversorgung angezogen und ebenfalls auf enzymatischen Umsatz getestet. Es wurden zunächst 5 mM PEA im Phosphatase-*Assay* eingesetzt. Die Tabelle 9 zeigt die Phosphatase-Aktivitäten dieses Experiments.

**Tab. 9: Phosphatase-Aktivität mit PEA in Extrakten der Überexpressionspflanzen.**

Pflanzenlinie	Phosphatase-Aktivität [nmol P <sub>i</sub> min <sup>-1</sup> mg <sup>-1</sup> ]
Col-0 (+P <sub>i</sub> )	16 ± 7.00
OE-PECP1-21 (+P <sub>i</sub> )	32 ± 12.1
OE-PECP1-29 (+P <sub>i</sub> )	31 ± 4.99
OE-PECP1-23 (+P <sub>i</sub> )	28 ± 7.25
OE-PECP1-31 (+P <sub>i</sub> )	27 ± 7.65

Im Vergleich der Phosphatase-Aktivitäten ist erkennbar, dass die P<sub>i</sub>-Freisetzungen in den Extrakten der Überexpressionspflanzen in etwa doppelt so hoch sind wie in den Wildtyp-Proben. Das lässt den Schluss zu, dass das in den Extrakten nachgewiesene rekombinante Protein aktiv ist und PEA umsetzt. Die enzymatischen Umsetzungen des Phosphoethanolamins sind zwischen den OE-Proben etwas verschieden (± 5 nmol P<sub>i</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>). Aufgrund dieses Ergebnisses wurden für weitere Experimente die beiden Linien mit den höchsten Aktivitäten ausgewählt: die Linien 21 und 29.

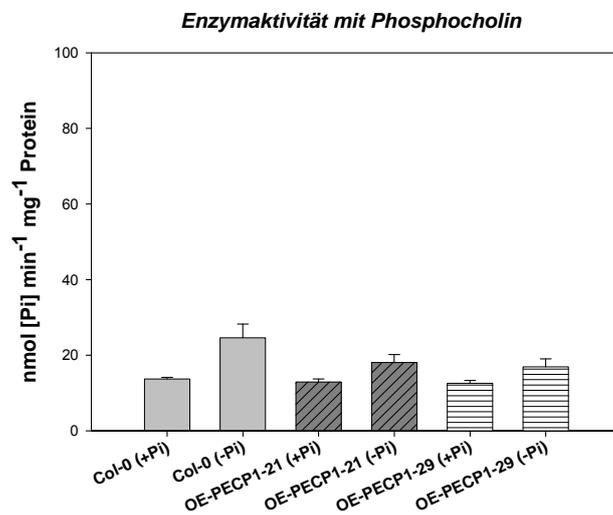
Ziel der nächsten Untersuchung war herauszufinden, wie sich die Enzymaktivitäten in den OE-Pflanzenlinien, welche unter P<sub>i</sub>-Mangel heranwuchsen, im Vergleich zur Wildtyp-Situation unterscheiden. Man könnte annehmen, dass das zusätzlich integrierte *PECP1*-Gen zu einer höheren Proteinmenge führt und somit zusätzliche PEA- bzw. PCho-Umsätze auftreten. Dazu wurden im nächsten Phosphatase-Assay 5 mM Phosphoethanolamin und anschließend 3 mM Phosphocholin eingesetzt und die Aktivitäten bestimmt (nach Zilversmit & Davis, 1950). Die Abbildung 28 zeigt das Ergebnis des Enzym-Assays mit Phosphoethanolamin als Substrat.



**Abbildung 28: P<sub>i</sub>-Freisetzungen nach Phosphatase-Reaktion mit Phosphoethanolamin.** Untersucht wurden die Extrakte der OE-PECP1-21- und -29- und Col-0-Pflanzen. Die Pflanzen wuchsen unter (+P<sub>i</sub>) oder unter (-P<sub>i</sub>) an. Es wurden jeweils 3 biologische Proben und davon 2 technische Replikate untersucht und zur Absicherung aller Ergebnisse wurden die Experimente einmal wiederholt.

Die in Gegenwart von PEA erhaltene Enzymaktivität in den Extrakten der Wildtyp-Pflanzen, die unter Phosphatmangel herangezogen wurden, war vierfach höher als in den Extrakten der vollversorgten Pflanzen. Das stimmt mit dem Ergebnis der Abbildung 23 überein.

Die Phosphataseaktivität in den Extrakten der OE-PECP1-21- und -29-Pflanzen war in den (+P<sub>i</sub>)-Proben höher als in den Col-0-Extrakten unter gleicher Anzucht. Es konnte eine zusätzliche Freisetzung von etwa 15 – 25 nmol P<sub>i</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> aus Phosphoethanolamin nachgewiesen werden. Diese P<sub>i</sub>-Freisetzung ist auf die Phosphatase-Aktivität der rekombinanten OE-PECP1 zurückzuführen und bestätigt die vorangegangenen Ergebnisse. Andererseits sind die Enzymaktivitäten der OE-Linien bei P<sub>i</sub>-Mangel ebenso hoch wie die in den Wildtyp-Pflanzen bei P<sub>i</sub>-Mangel. Das weist darauf hin, dass es keinen additiven Effekt zwischen erhöhter Enzymaktivität unter Normalbedingungen und der P<sub>i</sub>-Mangel-induzierten Aktivität des endogenen Gens gibt.



**Abbildung 29: P<sub>i</sub>-Freisetzungen nach Phosphatase-Reaktion mit Phosphocholin.** Es wurden jeweils 3 biologische Proben und davon 2 technische Replikate der OE-Linien: -21, -29 und des Wildtyps untersucht, welche wiederum unter beiden P<sub>i</sub>-Bedingungen heranwuchsen. Zur Absicherung aller Ergebnisse wurden die Experimente einmal wiederholt.

Um auch die Auswirkungen des zusätzlich produzierten PECP1-Proteins auf den Umsatz von Phosphocholin zu prüfen, wurden in einem weiteren Experiment 3 mM Phosphocholin als Substrat eingesetzt. Das Diagramm (Abb. 29) zeigt das Ergebnis zu dieser Untersuchung.

Wie im Falle der *knock out*-Pflanzen (siehe Abb. 24) ist die Enzymaktivität mit Phosphocholin im Vergleich zu den mit Phosphoethanolamin erhaltenen Werten generell niedriger. Dies betrifft sowohl die Extrakte der OE-Pflanzen als auch der Wildtyp-Pflanzen. Die gemessenen P<sub>i</sub>-Freisetzungen lagen in jedem Falle zwischen 15 bis 25 nmol P<sub>i</sub> min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> Protein. Dieser Befund bestätigt, dass die Extrakte Phosphoethanolamin erheblich schneller hydrolysieren als Phosphocholin. Für alle Extrakte wurde, unabhängig von ihrer Herkunft aus Wildtyp- oder OE-Pflanzen, eine moderate Steigerung der Phosphocholin-Hydrolyseaktivität infolge von Phosphatmangel festgestellt. Bemerkenswert ist, dass in

den OE-Pflanzen kein erhöhter Phosphocholinsatz beobachtet wurde. Daher ist die durch Phosphatmangel hervorgerufene Steigerung des Phosphocholin-Umsatzes durch die Pflanzenextrakte nicht ursächlich auf die in den OE-Pflanzen zusätzlich synthetisierte PECP1 zurückzuführen. Als Schlussfolgerung ergibt sich, dass die OE-PECP1 bevorzugt Phosphoethanolamin in den Extrakten umgesetzt. Auf der Grundlage dieses Ergebnisses wurden anschließend die Auswirkungen der erhöhten PECP1-Enzymaktivität in Überexpressionspflanzen auf die Metabolitgehalte bestimmt.

### 2.3.3 Quantifizierung von Metaboliten in Überexpressionspflanzen

Zur Quantifizierung der an der PECP1-Reaktion beteiligten Verbindungen (siehe 2.2.3) wurden ausschließlich Extrakte der P<sub>i</sub>-vollversorgten OE-PECP1-21- und -29-Pflanzen untersucht, da eine Anzucht der Pflanzen unter Phosphatmangel das endogene *PECP1*-Gen transkriptionell aktivieren würde. Die Konsequenzen einer Anzucht unter Phosphatmangel-Bedingungen würden weitgehend der Wildtyp-Situation entsprechen.

Die Tabelle 10 zeigt die Analyse der Metabolite in den Extrakten dieser Pflanzen im Vergleich mit dem Wildtyp.

**Tab. 10: Bestimmung von Phosphocholin, Cholin und Ethanolamin in Überexpressionspflanzen.**

Pflanzenlinie	(+P <sub>i</sub> ) – Anzucht		
	Phosphocholin [nmol/100 mg FG]	Cholin [nmol/100 mg FG]	Ethanolamin [nmol/100 mg FG]
Col-0	14 ± 1.0	134 ± 3.0	29 ± 11.7
OE-PECP1-21	13 ± 3.0	133 ± 8.2	42 ± 13.9
OE-PECP1-29	11 ± 3.9	142 ± 8.8	<b>140 ± 16.0</b>

Im Vergleich zu den Wildtyp-Proben, welche im Abschnitt 2.2.3 ausgewertet worden sind, konnte in den Extrakten der OE-PECP1-29-Pflanzen ein sehr hoher Gehalt an Ethanolamin bestimmt werden. Auch in den OE-PECP1-21-Pflanzen zeichnet sich diese Tendenz zur Erhöhung des Ethanolamin-Spiegels ab. Dieses Resultat verweist auf die Fähigkeit von PECP1 bevorzugt Phosphoethanolamin umzusetzen (siehe Tab. 1). Der Phosphocholin-Spiegel ist durch die zusätzliche Synthese von PECP1 nur geringfügig betroffen, was mit dem im Abschnitt 2.2.2 beschriebenen Ergebnissen übereinstimmt.

2.4 Darstellung der PECP-Enzymfamilie

2.4.1 Identifizierung Arabidopsis-verwandter P<sub>i</sub>-Mangel induzierter pflanzlicher Phosphatasen

In Arabidopsis werden bei P<sub>i</sub>-Mangel intrazelluläre Phosphatasen der HAD-Superfamilie produziert, die durch die Hydrolyse von Phosphomonoestern Phosphat freisetzen und somit den P<sub>i</sub>-Spiegel der Zelle stabilisieren können. Die bisherigen Analysen in dieser Arbeit ergaben, dass es in Arabidopsis zum einen eine Pyrophosphatase und zum anderen die Phosphoethanolamin/Phosphocholin-Phosphatase gibt. Obwohl sie sich in ihrer Aminosäuresequenz und in ihrer Sekundärstruktur kaum unterscheiden, besitzen sie unterschiedliche Konformationen in ihrer Tertiärstruktur. Dieser Unterschied weist darauf hin, dass die Substratpräferenz der Phosphatasen nicht anhand ihrer Aminosäuresequenz vorhergesagt werden kann, sondern experimentell ermittelt werden muss.

Aus anderen Pflanzen sind weitere Gene bekannt, deren Sequenzen homolog zu den Genen *PPsPase1*, *PECP1* und *PECP2* in Arabidopsis und zur *LePS2*-Genfamilie in Tomate sind. Für die Genprodukte dieser Gene liegen bisher keine oder nur unvollständige enzymatische Untersuchungen vor. Wie in der Einleitung beschrieben, ist bezüglich ihrer Substratspezifität bis heute wenig bekannt (siehe 1.2.4.2). Es ist zu anzunehmen, dass die Proteine ebenfalls in die PHOSPHO1-Subfamilie der Phosphoserin-Phosphatasen gehören. Diese Hypothese soll im Rahmen dieser Arbeit geprüft werden. Da die unterschiedlichen *Cap*-Module verschiedenartige Substratspezifitäten ermöglichen, ist es notwendig zu testen, ob die Aminosäuresequenzen aus Tomate, Kartoffel, Bohne und Reis für weitere Pyrophosphatasen, für Phosphoethanolamin/Phosphocholin-Phosphatasen oder für Enzyme mit einer ganz anderen Substratpräferenz kodieren. Zunächst sollen hier die Verwandtschaftsverhältnisse der putativen pflanzlichen Phosphatasen anhand ihrer Primärsequenzen dargestellt werden. Dazu wurde ein multiples *Alignment* (ClustalW) durchgeführt. Eine reduzierte Zusammenstellung ist in der Abbildung 30 dargestellt. Es sind ausschließlich die konservierten Bereiche der *Motiv 1 – 3* gezeigt.

	<i>Motiv 1</i>	<i>Motiv 2</i>	<i>Motiv 3</i>	
AtPECP1	7 - VVVE <u>DFDKT</u> IIIDV - 68	LGCELRIVSDAN - 52	NMCKGLIIDRIQASLTKEGKTSKMIYLGDGAGDYCPSL - 88	
AtPPsPase1	14 - VVVE <u>DFDKT</u> IIIDV - 68	LGCELRIVSDAN - 54	NMCKGLIITERIQSSLAKEGKK-KMIYLGDGAGDYCPSL - 96	(80%)
StPPP	4 - VVVE <u>DFDKT</u> IIIDV - 68	LGCDLRVISDAN - 52	NMCKGRIVKRIQAILAKEGKK-RMIYLGDGIGDFCPSL - 85	(66%)
LePS2;1	4 - VVVE <u>DFDKT</u> IIIEV - 68	LGCDLRVISDAN - 52	NMCKGMIVERIQ---AKEGKK-RMIYLGDGIGDFCPSL - 85	(67%)
PvHAD1	4 - VVVE <u>DFDKT</u> IIVDV - 68	SGCDLRVISDAN - 52	NMCKGLVIKRMQDSISEEDKR--LIYLGDGSGDYCPSL - 84	(66%)
PvPS2	4 - VVVE <u>DFDKT</u> IIVDV - 68	LGCDLRVISDAN - 52	NMCKGLVIKRIQDSISEEDKR--LIYLGDGSGDYCPSL - 84	(66%)
OsACP1	4 - VVVE <u>DFDKT</u> IIIDV - 68	LGCDLRILSDAN - 55	NMCKGQVLDRIRASAGAAGKR--VIYLGDGGRGDYCPSL - 84	(55%)

DxDx(T/V)
(S/T)
K - x(18-30)
- (G/S;D/S)x3(D/N)

**Abbildung 30: Sequenzvergleich der homologen P<sub>i</sub>-Mangel induzierten pflanzlichen Phosphatasen der HAD-Superfamilie.** Das multiple Sequenz-Alignment wurde mit dem Programm ClustalW gefertigt. Es zeigt nur die Regionen des aktiven Zentrums, welche stark konserviert sind und die *Motiv 1 – 3* der HAD-Superfamilie umfassen. Die wichtigsten Aminosäuren sind schwarz hervorgehoben und unterstrichen. Das erste katalytisch aktive Aspartat (D) des *Motivs 1*, ist mit einem Stern markiert. Die an der rechten Seite in Klammern platzierten Angaben sind die prozentualen Übereinstimmungen der Sequenzen der Phosphatasen mit der AtPECP1. Folgende Sequenzen wurden verwendet (Angabe der *accession number* und/oder der Phosphatase-Bezeichnung): AtPECP1 (Q9FZ62), AtPPsPase1 (Q67YCO), StPPP (*Solanum tuberosum phosphate starvation- and pathogen-induced phosphatase*), LePS2;1 (*Lycopersicon esculentum phosphatase2;1*, Q9FPR1), PvHAD1 (*Phaseolus vulgaris HAD phosphatase1*, ADQ85984), PvPS2 (*Phaseolus vulgaris phosphate starvation-induced-2*, ABP52095), OsACP1 (*Oryza sativa acid phosphatase1*, Q06C47).

## 2.4.2 Synthese der neuen P<sub>i</sub>-Mangel induzierten pflanzlichen Phosphatasen

Das in Abbildung 30 gezeigte Sequenz-Alignment belegt die Verwandtschaft der putativen Phosphatasen aus verschiedenen Pflanzenspezies mit den Arabidopsis-Enzymen. Innerhalb der untersuchten Gruppe besteht eine hohe Sequenzhomologie von etwa 55 – 80 %. Alle gezeigten Sequenzen besitzen die drei charakteristischen Motive der HAD-Superfamilie und haben dadurch im katalytischen Zentrum die funktionell aktiven konservierten Aminosäuren. Die Abstände zwischen diesen Motiven sind annähernd gleich. Aufgrund dieser Eigenschaften können sie als verwandte Phosphatasen der HAD-Superfamilie eingeordnet werden.

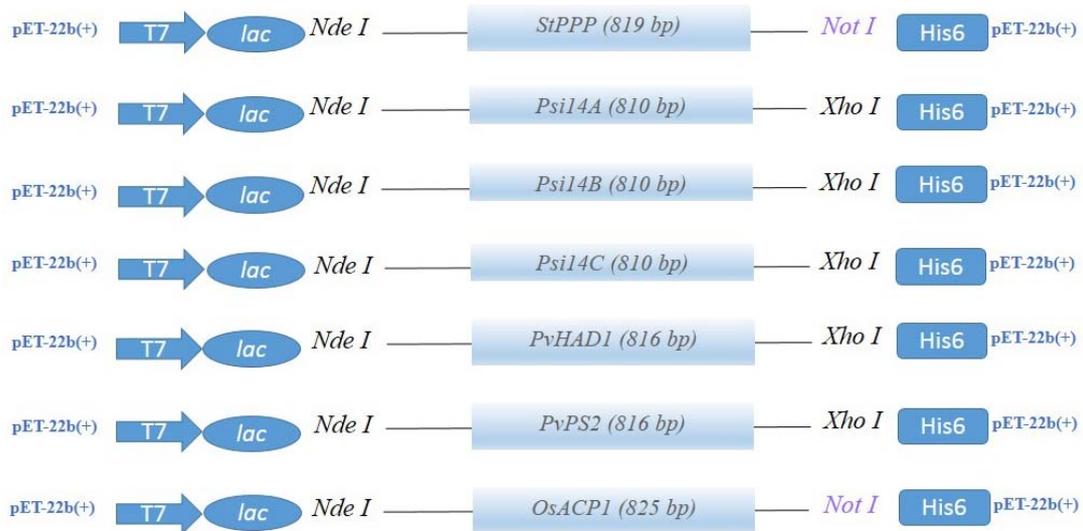
### Klonierungen der Gene: *StPPP*, *Psi14A*, *Psi14B*, *Psi14C*, *PvHAD1*, *PvPS2* und *OsACPI*

Zur Ermittlung der Substratspezifität der Phosphatasen sollten die Gensequenzen in geeignete Expressionsvektoren kloniert werden. Die aus der Tomate stammenden cDNA-Sequenzen der Gene *Psi14A*, *Psi14B* und *Psi14C* (entspricht *LePS2;1*) und die cDNA des aus der Kartoffel stammende Gens *StPPP*, lagen zu Beginn dieser Arbeit jeweils im Plasmid *pBluescript SK* – vor. Zur Gewinnung der kodierenden Sequenzen der Bohnen-Gene *PvHAD1*, *PvPS2* und des Reis-Gens *OsACPI*, wurden Pflanzen angezogen, geerntet und die Gesamt-RNA isoliert. Die Bohnenpflanzen (*Phaseolus vulgaris*, Sorte: ‚Redland Greenleaf B‘) wurden nach der Methode 5.2.6 angezogen. Die sechs Wochen alten Reispflanzen (*Oryza sativa japonica group*) wurden vom Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie zur Verfügung gestellt (5.2.7). Aus der isolierten Gesamt-RNA der jungen Bohnen- und Reisblätter (5.4.1) konnten die cDNAs mit Hilfe der *Reversen Transkriptase* synthetisiert werden (5.4.2). Über den Einsatz einer *proof-reading*-DNA-Polymerase konnten von allen cDNA-Sequenzen Amplifikate gewonnen werden. Alle Amplifikate der beschriebenen Pflanzengene wurden in den pJET1.2/blunt-Vektor zwischenkloniert und selektiert. Sequenzierungsanalysen bestätigten die Fehlerfreiheit der Amplifikate (Ergebnisse nicht gezeigt, siehe auch 5.3.13).

### Heterologe Expressionen und rekombinante Proteinsynthesen der pflanzlichen Phosphatasen

Aufgrund der vorausgegangenen Prüfung auf interne Restriktionsschnittstellen der kodierenden Sequenzen der pflanzlichen Gene, konnte das Expressionsplasmid pET-22b(+) für alle Phosphatasen als Zielvektor gewählt werden. Mit dieser Vektorwahl konnten Fusionsproteine mit einem His<sub>6</sub>-tag generiert werden.

Die Abbildung 31 zeigt vereinfachte Schemata der fertigen pET-22b(+)/Phosphatase-Konstrukte auf Vektorebene.



**Abbildung 31: Schemata zur Struktur der pET-22b(+)/Phosphatase-Konstrukte.** Die Abbildung zeigt schematisch den Zielvektor pET-22b(+) mit integrierter Gen-Kasse der pflanzlichen Phosphatasen StPPP, LePS2;1-3 (*Psi14 A-C*), PvHAD1, PvPS2 und OsACP1 und His<sub>6</sub>-tag. Die Expression der Gene steht unter der Kontrolle eines T7-Promotors (T7) und kann durch IPTG induziert werden. Die vorhandenen Restriktionsschnittstellen *NdeI* und *NotI* bzw. *XhoI* dienen der jeweiligen Integration der Gen-Sequenz in das Plasmid pET-22b(+).

Nach der erfolgreichen Klonierung und der Fusion des C-terminalen His<sub>6</sub>-tags an die kodierenden Regionen der Gene, konnten die heterologen Expressionen in *E. coli* erfolgen und die einzelnen Phosphatasen synthetisiert werden. Die Standard-Induktion mit IPTG (5.2.2.) führte bei allen rekombinanten Proteinen zur Bildung von *inclusion bodies*. Umfangreiche Tests unter Variation der Parameter IPTG-Konzentration und Temperatur führten letztendlich zur Unterdrückung dieser Aggregationen, wobei der lösliche Proteinanteil jeder Phosphatase im Rohextrakt > 50 % betrug (Daten nicht gezeigt). Die Tabelle 11 zeigt als Übersicht die Bedingungen zur löslichen Synthese der Phosphatasen.

**Tabelle 11: Parameter zur löslichen Synthese der rekombinanten Proteine aus Pflanzen.**

Rekombinantes Protein	IPTG-Konzentration [µM]	Kultivierungstemperatur [° C]
StPPP1	300	20
LePS2;1	400	24
LePS2;2	400	24
LePS2;3	400	24
PvHAD1	200	20
PvPS2	200	20
OsACP1	400	28

Die Bakterienrohextrakte wurden affinitätschromatographisch gereinigt (5.5.1). Pro Präparation erhielten die eluierten Fraktionen sehr unterschiedliche Mengen an Protein, im Durchschnitt etwa 1.5 - 10 mg Protein/Reinigung (Daten nicht gezeigt).

### 2.4.3 Substratspektrum der neuen pflanzlichen Phosphatasen

Die Analyse der Substratpräferenz der rekombinanten Proteine wurde mit dem Phosphatsetest nach Zilversmit & Davis (4.5.5) vorgenommen. Zunächst wurden unter Einsatz von 10 mM para-Nitrophenylphosphat verschiedene Reaktionsansätze getestet, die im Puffer und im pH-Wert differierten (Tris/HCl-Puffer: pH 7.3-7.5, Hepes/NaOH-Puffer: pH 6.5-7.0, NaAc/Essigsäure-Puffer: pH 5.5-6.3). Die kinetischen Messungen erfolgten wiederum nach der in Abschnitt 5.5.6. beschriebenen Methode. Im Ergebnis hierzu konnte bei allen Enzymen eine Phosphatase-Aktivität im sauren Reaktionsmilieu nachgewiesen werden (Progresskurven nicht gezeigt). Es sind somit saure Phosphatasen. Neben den Substraten Natrium-Pyrophosphat, Phosphoethanolamin und Phosphocholin wurden weitere Substrate der bereits bekannten Phosphatasen der HAD-Superfamilie untersucht werden (siehe auch 2.1.4 und 2.1.5). Unter den gewählten Reaktionsbedingungen konnte ausschließlich mit Phosphoethanolamin und Phosphocholin eine  $P_i$ -Freisetzung mit allen rekombinanten Enzymen bestimmt werden (siehe Tab. 12). Nur die LePS2;1 zeigte einen geringfügigen Umsatz von  $< 0.1 \mu\text{mol } P_i \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  mit den Substraten Phospho-L-Serin und Phospho-L-Tyrosin. Inwieweit das ein Hinweis auf eine mögliche erweiterte Proteinphosphatase-Aktivität sein könnte, bleibt zu untersuchen. Phosphoethanolamin und Phosphocholin wiesen jedoch mit Abstand die höchsten Umsatzgeschwindigkeiten auf.

**Tabelle 12: Aktivität mit p-NPP, pH-Wert der Reaktion und spezifische Aktivität mit den Substraten PEA und PCho der neuen pflanzlichen Phosphatasen.**

Phosphatase	Aktivität p-Nitrophenylphosphat [ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ]	pH-Wert der Reaktion	Spezifische Aktivität	
			Phosphoethanolamin [ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ]	Phosphocholin [ $\mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ]
StPPP	1.0	5.8	$16.2 \pm 0.023$	$4.64 \pm 0.004$
LePS2;1	0.17	6.3	$1.24 \pm 0.002$	$0.64 \pm 0.007$
LePS2;2	0.18	6.3	$0.79 \pm 0.018$	$0.37 \pm 0.086$
LePS2;3	0.16	6.5	$0.63 \pm 0.079$	$0.06 \pm 0.044$
PvHAD1	0.001	6.0	$0.02 \pm 0.029$	$0.01 \pm 0.015$
PvPS2	0.15	6.0	$0.38 \pm 0.055$	$0.28 \pm 0.019$
OsACP1	0.19	6.0	$0.3 \pm 0.044$	$0.29 \pm 0.018$

Aufgrund der Präferenzen der untersuchten Enzyme für Phosphoethanolamin und Phosphocholin sind alle neu charakterisierten pflanzlichen Phosphatasen aus Kartoffel, Tomate, Bohne und Reis den *Phosphoethanolamin/Phosphocholin Phosphatasen* (PECP-Spezies) zuzuordnen und können ebenfalls in die Enzymklasse EC 3.1.3.75 eingruppiert werden. Neben der PECP1 und der PECP2 gibt es bislang neun charakterisierte Enzyme in fünf verschiedenen Pflanzenarten.

#### 2.4.4 *Steady state*-Parameter der PEA/PCho-Phosphatasen-Reaktionen

Zur Bestimmung der kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  der durch die verschiedenen PECP-Spezies katalysierten Hydrolysereaktionen wurden die Reaktionsgeschwindigkeiten in Abhängigkeit von den Substratkonzentrationen bestimmt. Der Konzentrationsbereich für die Substrate Phosphoethanolamin und Phosphocholin umfasste 0.1 – 5 mM. Die Reaktionen liefen unter den in Abschnitt 4.5.6 angegebenen Bedingungen ab. Die Berechnung der Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  erfolgte mit Hilfe nichtlinearer Regressionen nach der Michaelis-Menten-Gleichung (siehe auch 2.1.4.1). Die Diagramme der einzelnen  $v/S$ -Charakteristiken der Phosphatasen sind im Anhang 7.4 beigefügt. Die Tabelle 13 fasst die *steady state*-Parameter der Gleichgewichtsreaktionen der verschiedenen PECP-Spezies mit den beiden Substraten Phosphoethanolamin und Phosphocholin zusammen.

**Tabelle 13: *Steady state*-Parameter für die Kinetik der PECP-Hydrolysereaktionen.**

Enzyme	Substrate	$K_m$ (mM)	$k_{cat}$ (s <sup>-1</sup> )	$k_{cat}/K_m$ (M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> )
LePS2;1	PEA	1.5	10.40	$7.067 \times 10^3$
	PCho	0.5	3.00	$6.482 \times 10^3$
LePS2;2	PEA	0.5	4.90	$9.989 \times 10^3$
	PCho	0.2	2.28	$11.077 \times 10^3$
LePS2;3	PEA	1.0	5.59	$5.471 \times 10^3$
	PCho	0.4	1.23	$3.237 \times 10^3$
PvHAD1	PEA	0.3	0.10	$0.297 \times 10^3$
	PCho	0.5	0.05	$0.098 \times 10^3$
PvPS2	PEA	0.2	0.63	$3.092 \times 10^3$
	PCho	0.5	0.66	$1.213 \times 10^3$
OsACP1	PEA	2.8	1.71	$0.604 \times 10^3$
	PCho	1.3	1.01	$0.755 \times 10^3$

Anhand der  $v/S$ -Charakteristiken (7.4) konnte gezeigt werden, dass bei allen untersuchten PECP-Hydrolysereaktionen die Abhängigkeit der Geschwindigkeit von der Substratkonzentration einem hyperbolischen Zusammenhang folgt. Es liegen keine typischen Abweichungen vom Michaelis-Menten-Verhalten vor. Es konnten  $K_m$ -Werte für Phosphoethanolamin im Bereich von 0.2 – 2.8 mM und für Phosphocholin im Bereich von 0.2 – 1.3 mM bestimmt werden. Somit sind die  $K_m$ -Werte für PEA in der Regel geringfügig höher als für PCho. Aus den Maximalgeschwindigkeiten der  $v/S$ -Charakteristiken wurden unter Berücksichtigung der jeweiligen Proteinkonzentration im Ansatz (Daten nicht gezeigt)  $k_{cat}$ -Werte errechnet (Tab. 13). Anhand der  $k_{cat}/K_m$ -Werte manifestiert sich bei

den untersuchten Enzymspezies keine eindeutige Tendenz, welche eine Bevorzugung von PEA bzw. PCho belegen würde. Aufgrund der geringen Ausbeute an löslichem StPPP-Protein, konnte für die Phosphatase aus Kartoffel keine v/S-Charakteristik aufgenommen werden. Daher entfällt für diese Enzymspezies die Angabe der *steady state*-Parameter.

#### 2.4.5 Phosphatasen der PHOSPHO1-Subfamilie in weiteren Pflanzenspezies

Im Rahmen dieser Dissertation konnten drei Phosphatasen aus *A. thaliana* strukturell in die PHOSPHO1-Subfamilie eingeordnet werden, die eine kleine Genfamilie bilden. Zwei dieser Gene kodieren für PECP-Isoenzyme. Das dritte Gen besitzt eine andere enzymatische Funktion und kodiert für PPsPase1. Die in dieser Arbeit untersuchten Gene aus Tomate, Kartoffel, Bohne und Reis kodieren ebenfalls für PECP-Spezies. Deshalb sollte im nachfolgenden Schritt überprüft werden, welche Verbreitung die Enzyme der PHOSPHO1-Subfamilie im Pflanzenreich haben. Es ist wichtig darauf hinzuweisen, dass eine Vollständigkeit dieser Analyse nicht angestrebt wurde, sondern nur ein erster Überblick über die Verbreitung dieser homologen Gene gegeben werden sollte.

Um Kandidaten-Gene zu finden, wurden zunächst veröffentlichte Gensequenzen mit Hilfe der Strukturdatenbank *InterPro* ([www.ebi.ac.uk/interpro/](http://www.ebi.ac.uk/interpro/)) geprüft und eine Vorauswahl getroffen. Die *InterPro*-Datenbank erstellt funktionelle Analysen über die Klassifizierung von Proteinen und kann wichtige strukturelle Elemente, wie Protein-Domänen und aktive Zentren, darstellen. Dabei wird eine Vielzahl von Informationen anderer Datenbanken verknüpft und miteinander kombiniert, was schließlich in einer strukturellen und funktionellen Proteinvorhersage resultiert. Durch die Übersetzung der Nukleotidsequenzen in die Aminosäuresequenzen der daraus resultierenden Proteine, ist die Voraussetzung für funktionelle Vorhersagen gegeben. Alle im Folgenden diskutierten funktionellen Eigenschaften sind jedoch nur als Ausgangspunkte neuer experimenteller Studien zu werten, sofern sie nicht die in der vorliegenden Arbeit empirisch charakterisierten Enzymspezies betreffen. Das Resultat des Vergleichs stellt im Wesentlichen einen Versuch zu einer Klassifizierung der Vertreter der PHOSPHO1-Subfamilie dar. Da die in dieser Arbeit untersuchten PECP-Spezies zytosolische Phosphatasen sind, wurden Aminosäuresequenzen ausgeschlossen, die putative Transportsequenzen enthielten oder unvollständig waren. Des Weiteren wurden Sequenzen, die in die engere Auswahl kamen, auf ihre Expression hin geprüft. Aminosäuresequenzen aus einer Pflanzenart, die in einer oder wenigen Aminosäuren differierten und vermutlich Allele darstellten, wurden nicht mit einbezogen. Durch die Kenntnisse der *Psi14*-Gene der LePS2-Familie, konnten in weiteren Datenbanken durchsequenzierter Genome [*Phytozome* (<http://phytozome.net/>), *Rice Genome* (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>), *Sol Genomics Network* (<http://solgenomics.net/>), und andere] weitere homologe Gene gefunden und diese ebenfalls auf Expression geprüft werden. Letztendlich standen aus über 100 möglichen Kandidaten-Genen 63 Aminosäuresequenzen aus 22 Pflanzenarten zur Verfügung, die weiter analysiert wurden. Darunter befanden sich auch die in dieser Dissertation untersuchten PECP-

Sequenzen. Zur Verwandtschaftsanalyse herangezogen wurden Gene eines Mooses (*Physcomitrella patens*), eines Moosfarns (*Selaginella moellendorffii*), sowie Gene aus folgenden Pflanzenfamilien: Kreuzblütengewächse (*Arabidopsis thaliana*, *Arabidopsis lyrata*), Kieferngewächse (*Picea sitchensis*), Nachtschattengewächse (*Solanum lycopersicum*, *Solanum tuberosum*), Schmetterlingsblütler (*Glycine max*, *Medicago truncatula*, *Lotus japonicus*, *Phaseolus vulgaris*), Süßgräser (*Brachypodium distachyon*, *Hordeum vulgare*, *Oryza brachyantha*, *Oryza glaberrima*, *Oryza sativa*, *Setaria italica*, *Sorghum bicolor*, *Zea mays*), Weidengewächse (*Populus trichocarpa*), Weinrebengewächse (*Vitis vinifera*) und Wolfsmilchgewächse (*Ricinus communis*). Zum Vergleich aller Proteine wurde ein multiples *Alignment* (Clustal-W2, [www.ebi.ac.uk/](http://www.ebi.ac.uk/)) durchgeführt. Das vollständige *Alignment* ist im Anhang 7.5 beigefügt. Die Abbildung 32 zeigt eine Zusammenstellung konservierter Bereiche der PHOSPHO1-Subfamilie in den verschiedenen Pflanzenproteinen.

		<i>Motiv 1</i>	<i>Motiv 2</i>	<i>Motiv 3</i>	<b>AS (<math>\Sigma</math>)</b>	
A. thaliana (Q67YC0)	<b>AtPPsPase1</b>	14 VVVFDFDKTIIDV	72 LRIVSDANMFFI	51 NMCKGLIIERIQQSLA	5 KMIYLGDGAGDY	100 (295)
A. lyrata (D7KR62)		13 VVVFDFDKTIIDV	72 LRIVSDANMFFI	51 NMCKGLIIERIQQSLA	5 KMIYLGDGAGDY	100 (294)
A. thaliana (Q9FZ62)	<b>AtPECP1</b>	7 VIVFDFDKTIIDV	72 LRIVSDANTLFI	49 NMCKGLIIDRIQASLT	6 KMIYLGDGAGDY	92 (279)
A. lyrata (D7KFI6)		7 VIVFDFDKTIIDV	72 LRIVSDANTLFI	49 NMCKGLIIERIQASLT	6 KMIYLGDGAGDY	97 (284)
P. trichocarpa (B9HM85)		5 VVVFDFDKTIIDV	72 LRIVSDANMFFI	49 NMCKGLIIERIQASIS	5 KIIYLGDGAGDY	93 (277)
P. trichocarpa (B9MWQ6)		11 VVVFDFDKTIIDV	72 LRIVSDANMFFI	49 NMCKGLIIERIQASIS	5 KIIYLGDGAGDY	93 (283)
R. communis (B9SN55)		4 LVVFDFDNTIIDV	72 LRIVSDANVFFI	49 NMCKGHIIERIQASMS	6 KIIYLGDGAGDY	90 (274)
R. communis (B9T693)		6 VVILDFYKTIIDV	72 LRIVSDANTFFI	45 NMCKGRIIE--NPNIF	6 RIIYLGDGAGDY	83 (263)
G. max (C6TBH9)		4 VIVFDFDKTIVDV	72 LRIVSDANVFFI	49 NMCKGLIIDRIQDSIS	5 RMIYLGDGSGDY	89 (272)
G. max (1KGE6)		4 VVVFDFDKTIVDV	72 LRIVSDANMFFI	49 NMCKGLIIDRIQDSIL	5 RMIYLGDGSGDY	89 (272)
G. max (11KUW2)		4 VVVFDFDKTIVDV	72 LRIVSDANVFFI	49 NMCKGLIIDRIQDSIS	5 RMIYLGDGSGDY	79 (262)
P. vulgaris (D7PEX6)	<b>PvHAD1</b>	4 VVVFDFDKTIVDV	72 LRIVSDANLFFI	49 NMCKGLVIKRMQDSIS	4 RLIYLGDGSGDY	89 (271)
P. vulgaris (A4ZVI5)	<b>PvPS2</b>	4 VVVFDFDKTIVDV	72 LRIVSDANTYFI	49 NMCKGLVIKRIQDSIS	4 RLIYLGDGSGDY	89 (271)
L. japonicus (I3S8Y2)		4 VVVFDFDKTIIDI	72 LRIVSDANMFFI	49 NMCKGLIIDRIQDSFS	5 KIIYLGDGAGDY	110 (293)
M. truncatula (I3SND6)		5 VIIFDFDKTIIDC	72 LRIVSDANMFYI	50 NMCKGLIIDKIKNTIY	5 RFIYLGDGAGDY	89 (274)
M. truncatula (A2Q3B8)		4 VVVFDFDKTIEEC	72 LRIVSDANTFFI	49 NMCKGLIIKRIQDSIS	5 RFIYLGDGSGDY	89 (272)
M. truncatula (G7ZWH8)		4 VVVFDFDKTIVEC	72 LRIVSDANTFFI	48 NMCKGLIINRIQESIS	5 RFIYLGDGSGDY	89 (271)
G. max (11MCY1)		4 VVVFDFDKTIVDC	72 LRIVSDANTFFI	49 NMCKGIIERIQDSIS	5 RVIYLGDGSGDY	85 (268)
L. esculentum (Q9FPR1)	<b>LePS2;1</b>	4 VVVFDFDKTIIIEV	72 LRIVSDANVFFI	49 NMCKGMIVERIQA---	5 RMIYLGDGIGDF	89 (269)
L. esculentum (Q8GRL8)	<b>LePS2;2</b>	4 VVVFDFDKTIIDV	72 LRIVSDANVFFI	49 NMCKGMIVERIQA---	5 RMIYLGDGIGDF	89 (269)
L. esculentum (Q8GUC1)	<b>LePS2;3</b>	4 VVVFDFDKTIIDV	72 LRIVSDANVFFL	49 NMCKGMIVERIQA---	5 RMIYLGDGIGDF	89 (269)
S. tuberosum (PGSC000DMT40001234)*		4 VVVFDFDKTIIDV	72 LRIVSDANVFFI	49 NMCKGMIVERIQAAILA	5 RMIYLGDGIGDF	86 (269)
S. tuberosum (PGSC000DMT40001234)*		4 VVVFDFDKTIIDV	72 LRVTSDANVFFI	49 NMCKGMIVERIQAASMT	5 RMIYLGDGIGDF	89 (272)
S. t. (PGSC0003DMG4020048)*	<b>StPPP</b>	4 VVVFDFDKTIIDV	72 LRIVSDANVFFI	49 NMCKGRIVKRIQAAILA	5 RMIYLGDGIGDF	89 (272)
L. esculentum (K4BMU1)		4 VVVFDFDKTIIDL	72 LRIVSDANLFYI	51 NMCKGLVIEKIQASLA	5 RMIYLGDGAGDY	89 (274)
S. tuberosum (SGN-U278474)#		4 VVVFDFDKTIIDL	72 LRIVSDANLFYI	51 NMCKGLVIERIQASLA	5 RMIYLGDGAGDY	89 (274)
V. vinifera (D7U028)		4 VVVFDFDKTIIDV	72 LKIVSDANLFFI	49 NMCKGMVIKRIQAS--	4 KFIYLGDGSGDF	93 (273)
G. max (C6THU3)		4 VVVFDFDSTIIEC	72 LKIVSDANIFFI	49 NMCKGMITERIQNSVD	5 -FIYLGDGSGDF	95 (277)
G. max (K7M947)		4 VVVFDFDSTIIEC	72 LKIVSDANIFFI	50 NICKGMIIERIQNSVD	5 -FIYLGDGSGDF	79 (262)
P. vulgaris (E5D6S8)	<b>PvPS2-2</b>	4 VVVFDFDSTIIEC	72 LKIVSDANSFFI	49 NMCKGLVIERIQN-DG	5 -YIYLGDNNGDF	98 (279)
G. max (C6SZJ1)		4 VVVFDFDSTIIEC	72 LKIVSDANIFFI	49 NMCKGLVIERIQNSLA	5 -LIYLGDNNGDF	94 (276)
G. max (11KGE5)		21 VVVFDFDSTIIEC	72 LKIVSDANIFFI	49 NMCKGLVIERIQNSLA	5 -LIYLGDNNGDF	94 (293)
G. max (11KUW1)		4 VVVFDFDSTIIEC	72 LKIVSDANIFFI	49 NMCKGLVIERIQNSLA	5 -IIYLGDNNGDF	94 (276)
L. japonicus (I3T6F3)		4 VVVFDFDSTIIEC	74 LKIVSDANIFFI	49 NMCKGLVMDRIQNSLD	6 FMIYLGDGSGDF	96 (282)
M. truncatula (B7FI56)		4 VVVFDFDSTIIEC	72 LRIVSDANIFFI	49 NMCKGKVMEMFNQSLD	6 -IIYLGDGSGDF	93 (276)
P. trichocarpa (B9INJ1)		4 VVVFDFDKTIIDC	72 LRIVSDSNYFFI	50 NMCKGLVMKRIQASVS	5 QFIYVGDGKNDF	91 (275)
V. vinifera (D7STM9)		3 VVVFDFDKTIIDC	72 LRIVSDANAFFI	49 NMCKGLVMERVRTSVS	5 RFIYLGDGSAF	87 (269)

HAD-Superfamilie Konsens:

DxDx (T/V)

(S/T)

K - x(16-30)

- (G/S;D/S)x3(D/N)

		<i>Motiv 1</i>	<i>Motiv 2</i>	<i>Motiv 3</i>		AS ( $\Sigma$ )
R. communis (B9RKA9)	4	VVVFDFDR <sup>*</sup> TLIDG	72 LRIISDANQFFI	49 NLCKGLVINQICASTA	5 RFIYLG <sup>*</sup> DGSGDF	70 (253)
S. tuberosum (PGSC0003DMP4000642)	6	VIVDFDFR <sup>*</sup> TLIDD	70 LKVVSDANQFYI	48 NLCK-----IQASMS	5 RFIYLG <sup>*</sup> DERG DY	49 (225)
A. thaliana (Q9SU92) <i>AtPECP2</i>	4	VILDFDFR <sup>*</sup> TLIDG	72 LKIVSDANQFFI	49 NLCKGLVMDHLRASSS	6 RFIYLG <sup>*</sup> DGGGDF	61 (245)
A. lyrata (D7MCK8)	4	VIIFDFDR <sup>*</sup> TLIDG	72 LKIVSDANQFYI	49 NLCKGLVMDHIRASSS	6 RFIYLG <sup>*</sup> DGGGDF	58 (242)
V. vinifera (D7TBA2)	4	VVLFDFDR <sup>*</sup> TIIDG	72 LKVVSDANNFYI	49 NMCKGLVIEQIRAAAS	5 RFIYVGD <sup>*</sup> GKGF	84 (267)
G. max (C6SZJ9)	6	VVVLDFDR <sup>*</sup> TIIDD	72 LRIISDTNTFSI	49 NMCKGLVIDQIRSSLL	9 RFIYIGD <sup>*</sup> GAGDY	57 (246)
M. truncatula (G7LJK6)	2	IVVLD <sup>*</sup> DFDR <sup>*</sup> TIIDD	73 LRIISDANLFYI	50 NMCKGLVIDRIRGSLP	4 RFIYVGD <sup>*</sup> GAGDY	56 (238)
P. patens (A9RMS9)	3	LIIFDFD <sup>*</sup> W <sup>*</sup> SLIDC	72 LQIISDANSHFI	49 NMCKGLILDSVRLGSS	5 RVIYIGD <sup>*</sup> GGG DY	54 (236)
S. moellendorffii (D8SBA0)	4	IVVDFDFD <sup>*</sup> W <sup>*</sup> SLINC	72 LQIISDANTLFI	48 NMCKGLILD--RILSS	5 RVVYIGD <sup>*</sup> GRGDI	57 (237)
P. sitchensis (A9NLR1)	3	VIMDFDFR <sup>*</sup> TLIDC	72 LRIVSDANSFYI	49 NMCKGAIVDGIQRCFP	5 RFIYLG <sup>*</sup> DGRGDF	54 (236)
B. distachyon (I1HR17)	4	VVVFDFDR <sup>*</sup> TIIDV	72 LRVLSDANGFFI	48 NMCKGQVLD <sup>*</sup> RIR--AS	4 RVIYLG <sup>*</sup> DGRG DY	91 (270)
H. vulgare (F2DKT3)	4	VVVFDFDR <sup>*</sup> TIIDV	72 LRVLSDANRFFI	51 NMCKGQVLD <sup>*</sup> RIR--AS	8 RFIYLG <sup>*</sup> DGRG DY	88 (274)
O. glaberrima (I1NRA5)	4	VVVFDFDR <sup>*</sup> TIIDV	72 LRILSDANRFFI	52 NMCKGQVLD <sup>*</sup> RIR--AS	6 RVIYLG <sup>*</sup> DGRG DY	89 (274)
O. sativa (Q8W0E7) <i>OsACP1</i>	4	VVVFDFDR <sup>*</sup> TIIDV	72 LRILSDANRFFI	51 NMCKGQVLD <sup>*</sup> RIR--AS	6 RVIYLG <sup>*</sup> DGRG DY	89 (274)
O. brachyantha (J3L3K4)	4	VVVFDFDR <sup>*</sup> TIIDV	72 LRILSDANRFFI	51 NMCKGQVLD <sup>*</sup> RIR--AS	5 RVIYLG <sup>*</sup> DGRG DY	95 (278)
S. bicolor (C5XID0)	4	VVVFDFDR <sup>*</sup> TIIDV	72 LRVLSDANAFFI	48 NMCKGLVLD <sup>*</sup> RILREAA	9 RVIYLG <sup>*</sup> DGRG DY	92 (278)
Z. mays (B6TXH8)	4	VVVFDFDR <sup>*</sup> TIIDV	72 LRVLSDANAFFI	49 NMCKGQVLD <sup>*</sup> RILREAS	7 RVVYLG <sup>*</sup> DGRG DY	91 (276)
S. italica (K3XQG7)	4	IVVDFDFR <sup>*</sup> TIIDV	72 LRVLSDANAFFI	48 NMCKGQVLD <sup>*</sup> RILREAA	6 RVIYLG <sup>*</sup> DGRG DY	90 (273)
Z. mays (B4F825)	4	VVVFDFDR <sup>*</sup> TIIDV	72 LRVLSDANAFFI	51 NMCKGLVLD <sup>*</sup> RILREAE	11 RVIYLG <sup>*</sup> DGRG DY	94 (285)
O. glaberrima (I1NYN4)	10	VVVFDFDR <sup>*</sup> TIIDC	72 LRVLSDANAFFI	49 NMCKGKVMERIIDELS	12 RVVYVGD <sup>*</sup> GRG DY	100 (296)
O. sativa (Q6H6J4)	10	VVVFDFDR <sup>*</sup> TIIDC	72 LRVLSDANAFFV	49 NMCKGKVMERIIDELS	12 RVVYVGD <sup>*</sup> GRG DY	100 (296)
S. italica (K3YUH3)	8	LVVDFDFR <sup>*</sup> TIVDC	72 LRVLSDANAFFV	53 NMCKGKVMERIILQEE	11 AVVYLG <sup>*</sup> DGRG DY	104 (301)
Z. mays (C4JC34)	11	LVVDFDFR <sup>*</sup> TIVDC	72 LRILSDANAFFV	53 NMCKGKVMERIILLQEE	16 AVVYLG <sup>*</sup> DGRG DY	87 (292)
O. sativa (A2ZV38)	19	VVVFDFDR <sup>*</sup> TIIEW	72 LRVASDANAFFI	50 NMCKGKIIERIQTAN	3 HFIYIGD <sup>*</sup> GRG DY	87 (284)
S. bicolor (C5XQ80)	11	VVVFDFDR <sup>*</sup> TIIDW	72 LKVVSDANAFFI	49 NMCKGKIIERIQTAS	4 HFIYIGD <sup>*</sup> GKGDY	85 (276)
B. distachyon (I1HP49)	5	VVVFDFDR <sup>*</sup> TIIEW	72 LKVVSDANTFFI	49 NMCKGKIIERIQTDS	4 HFIYIGD <sup>*</sup> GKGDY	89 (272)

HAD-Superfamilie Konsens: DxDx (T/V) (S/T) K - x(16-30) - (G/S;D/S)x3(D/N)

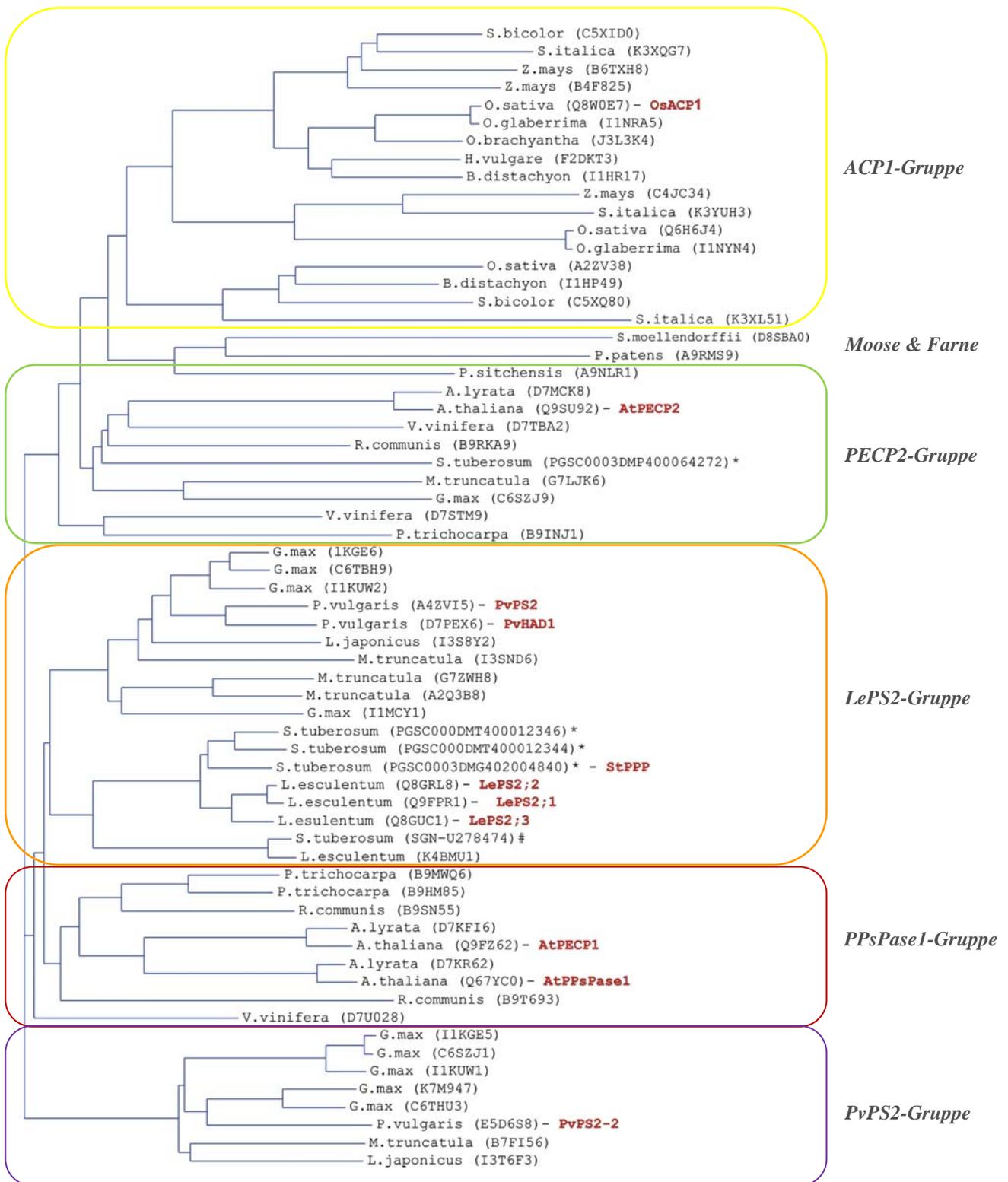
Abbildung 32: Sequenzvergleich homologer pflanzlicher Phosphatasen der PHOSPHO1-Subfamilie verschiedener Pflanzenspezies.

Das multiple Sequenz-Alignment wurde mit dem Programm Clustal-W2 gefertigt. Es sind 63 Proteinsequenzen von 22 verschiedenen Pflanzenarten gezeigt, die die charakteristischen *Motive 1, 2 u. 3* der HAD-Superfamilie beinhalten. Diese sind mit grauer Farbe unterlegt. Die an der Katalyse beteiligten Aminosäuren des aktiven Zentrums sind fett hervorgehoben. Die in allen Sequenzen übereinstimmenden Aminosäuren wurden mit einem Stern markiert. Jeder dieser Sequenz ist zur eindeutigen Identifizierung eine *InterPro*-Nummer zugeordnet. Sequenzen ohne *InterPro*-Nummer, wie beispielsweise aus Kartoffel, ist die *Phytozome*- (\*) oder die *Sol Genome Network* (#)-Nummer angegeben. Die Angabe in Klammern rechts im Bild gibt die Gesamtlänge der Aminosäuresequenz an. Die Zahlen zwischen den einzelnen Peptiden zeigen die Anzahl der ausgelassenen Aminosäuren der jeweiligen Sequenz. Die in dieser Arbeit diskutierten Enzyme sind rot hervorgehoben.

Aus den vorangegangenen Untersuchungen zur Sekundärstruktur der Phosphatasen der PHOSPHO1-Subfamilie (siehe 2.1.4.2) ist abzuleiten, dass die neuen Sequenzen hoch konserviert sind. Sie enthalten neben den charakteristischen Aminosäuren der **Motiv 1 – 3** fast identische Abstände zwischen den einzelnen Motiven. Des Weiteren besitzen die Proteine die drei Cysteine des kleinen C2-Cap-Moduls, wobei die Sequenzen D7KR62 aus *A. lyrata*, B9MWQ6 aus *P. trichocarpa*, B9T693 aus *R. communis* und I3S8Y2 aus *L. japonicus*, wie die PPsPase1, ein viertes Cystein aufweisen (siehe Anhang 7.5, gelb markiert). Daraus folgt, dass die untersuchten Sequenzen aus den verschiedenen Pflanzenspezies (Abb. 32) in die PHOSPHO1-Subfamilie gehören. Bei der Analyse konnte bei der Sequenz B9T693 aus *Ricinus communis* ein modifiziertes Motiv 1 festgestellt werden. Anstelle des katalytisch aktiven zweiten Aspartats (D14 bei PECP1, Abb. 14) ist ein Tyrosin vorhanden. Aufgrund der vorhandenen, strukturell äquivalenten –OH-Gruppe in der polaren Seitenkette könnte es die Funktion des fehlenden Aspartats übernehmen. Die Proteinsequenzen A9RMS9, *P. patens* und D8SBA0, *S. moellendorffii*, enthalten ebenfalls einen Aminosäure-Austausch im **Motiv 1**. Anstelle des konservierten Threonins ist ein Serin vorhanden. Der einzige Unterschied zwischen beiden Resten besteht darin, dass bei Serin die –CH<sub>3</sub>-Gruppe der polaren Seitenkette des Threonins, durch ein H<sup>+</sup> ersetzt ist. Dieser Threonin-Austausch im **Motiv 1**, zugunsten des Serins, wird bei beiden Proteinen keine grundlegenden katalytischen Veränderungen zur Folge haben, was experimentell überprüft werden müsste. Weitere Austausche in den **Motiven 1, 2** und **3** gibt es nicht.

Über einen weiteren bioinformatischen Vergleich der Proteinsequenzen sollte überprüft werden, ob es orthologe Gensequenzen zu den Sequenzen der PHOSPHO1-Genfamilie aus Arabidopsis gibt. Mit Hilfe des Distanzmatrixverfahren *Neighbour-Joining (NJ)* wurden die gruppierten Daten aus dem *Alignment* berechnet (Makarenkov, 2001). Die Darstellung der Verwandtschaftsanalyse entstand mit dem Programm *PHYLIP* (<http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html>) und ist in der Abbildung 33 gezeigt.

Der entstandene horizontale Baum gliedert sich in fünf große Bereiche, welche farblich umrandet sind. Die experimentell untersuchten Phosphatasen dieser Arbeit sind rot hervorgehoben. Die entstandenen Gruppen sind nach diesen Enzymen benannt (Abb. 33).



**Abbildung 33: Bioinformatische Verwandtschaftsanalyse der Subfamilie PHOSPHO1 der pflanzlichen HAD-Superfamilie.** Dieser Baum wurde mittels Aminosäuresequenzen der *InterPro*-Datenbank ([www.ebi.ac.uk/interpro/](http://www.ebi.ac.uk/interpro/)) rekonstruiert, die entsprechenden *InterPro*-Nummern sind in Klammern geschrieben. Die Daten für *S. tuberosum* entstammen von den Internet-Plattformen *Phytozome* und *Sol Genomics Network*. Sie sind mit einem \* bzw. einem # gekennzeichnet.

In der **PPsPase1-Gruppe** sind die homologen Arabidopsis-Sequenzen, AtPECP1 und AtPPsPase1, enthalten. Es ist die einzige Gruppe, in der eine Genduplikation mit anschließender Diversifizierung sehr wahrscheinlich ist. Die PPsPase1 enthält ein zusätzliches Cystein an Position 155 (Abb. 14). Drei weitere Sequenzen [*A. lyrata* (D7KR62), *R. communis* (B9T693) und *P. trichocarpa* (B9MWQ6)] besitzen ebenfalls ein weiteres Cystein im schmalen C2-Cap-Modul und befinden sich ebenfalls in dieser Gruppe (siehe 7.5). Es könnte durchaus möglich sein, dass es sich um AtPPsPase1-orthologe Enzyme in anderen Pflanzen handelt. Des Weiteren ist bemerkenswert, dass die beiden P<sub>i</sub>-Mangel aktivierten Arabidopsis-Phosphatasen gemeinsam gruppieren. Die AtPECP2, welche nicht unter Phosphatmangel exprimiert wird, gruppiert weit entfernt in der nach ihr benannten Gruppe. Es könnte ein Hinweis darauf sein, dass alle Gene der PPsPase1-Gruppe unter Phosphatmangel aktiviert werden. Die **PECP2-Gruppe** enthält Gene aus phylogenetisch entfernten Arten. Es ist sehr wahrscheinlich, dass sich die orthologen Gensequenzen evolutionär aus einem frühen Vorfahren ableiten. Die Sequenzen, die sich hier gruppieren, könnten Proteine sein, die ähnlich wie *AtPECP2* konstitutiv exprimiert werden. Diese Annahme könnte durch Expressionsstudien überprüft werden.

Die zur Arabidopsis-Familie homologe **LePS2-Gruppe** bildet die größte Gruppe des Baumes und enthält die vielen Sequenzen der *Solanaceae* und anderer Dikotyledonen. In dieser Gruppe befinden sich sechs der neun experimentell aufgeklärten PECP-Spezies. Die PECP aus Tomate und Bohne sind im jeweiligen Organismus Isoenzyme mit gleichen Funktionen, da sie aus paralogenen Genen entstammen. Es ist sehr wahrscheinlich, dass sich unter den putativen Phosphatasen-Sequenzen dieser Gruppe, weitere Phosphatasen befinden, die für Phosphoethanolamin bzw. Phosphocholin spezifisch sind. Die in dieser Arbeit charakterisierte OsACP1 aus Reis, ist in der nach ihr benannten **ACPI-Gruppe** eingeordnet, in der ausschließlich Monokotyledonen gruppieren. Diese Sequenzen entstammen orthologen Genen, deren Verwandtschaft auf dasselbe Vorläufergen im letzten gemeinsamen Vorfahren zurückzuführen ist (Storch *et al.*, 2007). Die **PvPS2-2-Gruppe**, enthält keine homologen Gene aus Arabidopsis sondern ausschliesslich Sequenzen aus Leguminosen (Sojabohne, Gartenbohne, Horn- und Schneckenklee) ein. Die PvPS2-2-Phosphatase, nach der diese Gruppe benannt ist, wurde im Verlauf dieser Arbeit ebenfalls charakterisiert. Diese Phosphatase ist aufgrund ihres sehr breiten Substratspektrums keine PECP (Daten nicht gezeigt). Es ist daher wahrscheinlich, dass sich keine weiteren PECP-Vertreter in dieser Gruppe befinden.

Die Aussagen zu Substratspezifitäten der gruppierten Sequenzen dieser bioinformatischen Analyse sind grundsätzlich theoretischer Natur. Über eine enzymatische Charakterisierung könnten die Annahmen geprüft werden. Als ein wichtiges Ergebnis ist festzuhalten, dass die homologen Gene der PHOSPHO1-Subfamilie einen hohen Grad an Sequenzidentität besitzen und sowohl in niederen als auch in höheren Pflanzen gleichermaßen vorkommen. Sie sind somit im gesamten Pflanzenreich verteilt. Daraus folgt, dass diese Proteine eine zentrale bzw. konservierte Funktion in den unterschiedlichen Pflanzenarten ausüben müssen.

### 3. Diskussion

Eine pflanzliche Strategie zur Bereitstellung von Orthophosphat ( $P_i$ ) unter Phosphatmangel-Bedingungen besteht in der Remobilisierung von organisch gebundenem Phosphat über die Synthese von intra- und extrazellulären PSR-Enzymen mit hydrolytischen Aktivitäten, wie zum Beispiel Nucleasen, Phosphatasen und Phospholipasen (Plaxton & Tran, 2011). Zur Bereitstellung der Phosphohydrolasen werden *phosphate-starvation-inducible*-(PSI)-Gene aktiviert, welche in eine komplexe Phosphatmangel-Antwort integriert sind und unter transkriptioneller Kontrolle stehen (Vance *et al.*, 2003; Ticconi & Abel, 2004; Lin *et al.*, 2009; Nilsson *et al.*, 2010).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Untersuchungen dienten dem Ziel, einige Vertreter dieser PSI-Gene hinsichtlich ihrer Expression und Funktion unter Phosphat-Limitierung zu charakterisieren. Dazu wurden verschiedene experimentelle Ansätze und Strategien verfolgt. Zum einen wurden die homologen Gene aus Arabidopsis, Tomate, Kartoffel, Bohne und Reis heterolog in *E. coli* exprimiert und deren Genprodukte enzymatisch als PECP-Spezies identifiziert und charakterisiert. Zum anderen konnte die enzymatische *in vivo*-Aktivität der AtPECP1 sowie die Mengen der Metabolite Phosphocholin, Cholin und Ethanolamin in T-DNA-Insertions- und Überexpressionspflanzen quantifiziert werden.

Außerdem existiert im Genom von *A. thaliana* ein weiteres Gen, *PECP2*, welches für eine weitere Phosphoethanolamin/Phosphocholin-Phosphatase, PECP2, kodiert. Bemerkenswert ist dabei, dass das Gen *PECP2* konstitutiv exprimiert wird. Das entsprechende Enzym PECP2 wurde ebenfalls enzymatisch charakterisiert.

Vergleichende Studien zu pflanzlichen Genen, deren Genprodukte homolog zu den experimentell untersuchten Phosphatasen dieser Arbeit sind, führten zu einer strukturellen Klassifizierung der Enzyme innerhalb der PHOSPHO1-Subfamilie. Die anschließende bioinformatische Verwandtschaftsanalyse erbrachte die Erkenntnis, dass diese homologen Gene sowohl in den Genomen niederer als auch höherer Pflanzen existieren und die dazugehörigen Proteine eine fundamentale Funktion in den Pflanzenarten ausüben müssen.

#### 3.1 Enzymatische Eigenschaften der PHOSPHO1-Subfamilie

Die enzymatischen Analysen zeigen, dass die  $Mg^{2+}$ -abhängige PECP1 spezifisch für Phosphoethanolamin und für Phosphocholin ist ( $K_m$ -Wert für PEA = 1.16 mM und für PCho = 0.44 mM). Die Phosphatase weist einen breiten pH-Optimumsbereich von pH 6 bis pH 8 auf. Die katalytische Effizienz ist für Phosphoethanolamin mit  $1.06 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$  wesentlich höher als für Phosphocholin mit  $2.34 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ . Literaturrecherchen zu weiteren Vertretern von Phosphoethanolamin/Phosphocholin-Phosphatasen in anderen Organismen zeigten, dass es nur zwei weitere enzymatisch charakterisierte PECP-Spezies gibt. Das Enzym der PHOSPHO1-Subfamilie, die humane PHOSPHO1, wurde im Verlauf dieser Dissertation in der Einleitung (siehe 1.2.4.3) und im Abschnitt zur Charakterisierung der Sekundärstruktur der *A. thaliana* PECP1 (2.1.4.2) vorgestellt. Die enzymat-

ischen Analysen der PHOSPHO1 ergaben, dass Phosphoethanolamin und Phosphocholin die bevorzugten Substrate dieser Phosphatase sind (Roberts *et al.*, 2004). Im Gegensatz zur stringenten Substratspezifität der *A. thaliana* PECP1, setzt die humane PHOSPHO1 zusätzlich auch die Verbindungen Ribose-5-Phosphat,  $\beta$ -Glycerin-Phosphat und Pyridoxal-5-Phosphat katalytisch um, wenn auch um ein Vielfaches langsamer als die bevorzugten Substrate (Roberts *et al.*, 2004). Die in dieser Arbeit bestimmten *steady state*-Parameter,  $K_m$  und  $k_{cat}$ , der *A. thaliana* PECP1 weichen stark von den entsprechenden Parametern der PHOSPHO1 ab. Beide Enzyme sind allerdings in einem breiten pH-Reaktionsbereich im leicht sauren bis leicht alkalischen Milieu aktiv, wobei die PHOSPHO1 ein pH-Optimum bei pH 7.5 (mit PEA) und bei pH 7.2 (mit PCho) besitzt. Die Untersuchung zur Verwendung eines weiteren Cofaktors beim Verlust des  $Mg^{2+}$  ergab, dass sowohl die PECP1 als auch die PHOSPHO1,  $Co^{2+}$  als weiteren Cofaktor bevorzugt für ihre enzymatische Katalyse verwenden (siehe 2.1.4). Die Nutzung von  $Co^{2+}$  als bevorzugten Cofaktor ist für einige metallabhängige Phosphatasen der HAD-Superfamilie anderer Substratspezifität typisch, beispielsweise für die bakterielle YZGD-Pyridoxal-Phosphatase (Tirell *et al.*, 2006). Die zweite bisher bekannte Phosphoethanolamin/Phosphocholin-Phosphatase ist im Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* aktiv und gehört strukturell zur PHOSPHO1-Subfamilie (Domenech *et al.*, 2011). Zuerst wurde das endogene Genprodukt in gereinigten Zellextrakten der Bakterien enzymatisch analysiert (Garrido *et al.*, 1990) und zu einem späteren Zeitpunkt das Gen PA5292 heterolog in *E. coli* exprimiert und die rekombinante PaPECP produziert (Massimelli *et al.*, 2005). Die enzymatischen Charakterisierungen zeigten übereinstimmend, dass die PaPECP ausschließlich Phosphocholin und Phosphoethanolamin hydrolysiert und ein pH-Optimum im sauren Reaktionsmilieu besitzt. (Massimelli *et al.*, 2005, Beassoni *et al.*, 2006). Des Weiteren wird das artifizielle Substrat p-Nitrophenylphosphat langsamer umgesetzt, wenn auch schlechter als Phosphocholin und Phosphoethanolamin. Dieses Ergebnis bestätigte die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, wobei alle experimentell untersuchten pflanzlichen PECP-Spezies das oft zum Nachweis einer Phosphatase-Aktivität eingesetzte artifizielle Substrat p-NPP nur relativ langsam umsetzten (siehe Tab. 14). Studien zum Cofaktor-Verhalten der PECP aus *Pseudomonas aeruginosa* zeigten, dass es eine starke Stimulierung der Enzymaktivität durch  $Mg^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  und  $Cu^{2+}$  gibt und zwar in dieser Reihenfolge (Beassoni *et al.*, 2008). Dieses Verhalten unterscheidet sich vom Cofaktor-Verhalten der magnesiumabhängigen *A. thaliana* PECP1. In Gegenwart von  $Zn^{2+}$  bzw.  $Cu^{2+}$  kommt es bei simultaner Abwesenheit von  $Mg^{2+}$  zu einem totalen Verlust der AtPECP1-Aktivität (siehe 2.1.4).

### **Die Einordnung der $K_m$ -Werte der PECP-Spezies innerhalb der HAD-Phosphohydrolasen**

Die in dieser Arbeit experimentell bestimmten  $K_m$ -Werte aller pflanzlichen PECP-Spezies liegen im Bereich von 0.2 mM bis 1.3 mM für das Substrat Phosphocholin und im Bereich von 0.3 mM bis 2.27 mM für das Substrat Phosphoethanolamin (siehe 2.1.4, 2.1.5 und 2.4.4), wobei es häufig keine ausgeprägte Präferenz für das eine bzw. das andere Substrat gibt. Um diese Werte einschätzen zu können

und um zu beurteilen, ob es typische  $K_m$ -Werte für Phosphatasen der HAD-Superfamilie sind, wurden Vergleichswerte aus der Literatur herangezogen. Die Tabelle 14 zeigt eine Zusammenstellung von  $K_m$ -Werten einiger Phosphatasen, die verschiedenen Familien der HAD-Superfamilie zugeordnet sind. Es wurden nur Enzyme ausgewählt, die  $Mg^{2+}$  als Cofaktor für ihre Katalyse benutzen. In den letzten vier Zeilen der Tabelle 14 sind die  $K_m$ -Werte der PECP-Spezies aus *Pseudomonas aeruginosa* und *Homo sapiens* für beide Substrate angegeben.

**Tabelle 14:  $K_m$ -Werte von Enzymspezies der HAD-Superfamilie Phosphohydrolasen.**

Enzym	Substrat*	$K_m$ -Wert	Organismen	Quelle ( $K_m$ -Werte)
HAD2 (YfbT)	Fruktose-1-Phosphat	1.0 mM	<i>E. coli</i>	Kuznetsova <i>et al.</i> , 2006
HAD5 (YjjG)	Uridinmonophosphat	2.4 mM	<i>E. coli</i>	Kuznetsova <i>et al.</i> , 2006
HAD9 (SerB)	Phosphoserin	0.1 mM	<i>E. coli</i>	Kuznetsova <i>et al.</i> , 2006
TON_0002	Pyrophosphat	0.4 mM	<i>Thermococcus onnurineus</i>	Lee <i>et al.</i> , 2009
MDP-1	p-Nitrophenylphosphat	1.7 mM	<i>Mus musculus</i>	Selengut, 2001
HsPHOSPHO1	Phosphoethanolamin	3.0 $\mu$ M	<i>Homo sapiens</i>	Roberts <i>et al.</i> , 2004
	Phosphocholin	11.4 $\mu$ M		
PaPECP	Phosphoethanolamin	0.7 mM	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Garrido <i>et al.</i> , 1990 Massimelli <i>et al.</i> , 2005
	Phosphocholin	0.2 mM		

\* zur Bestimmung des  $K_m$ -Wertes eingesetztes Substrat

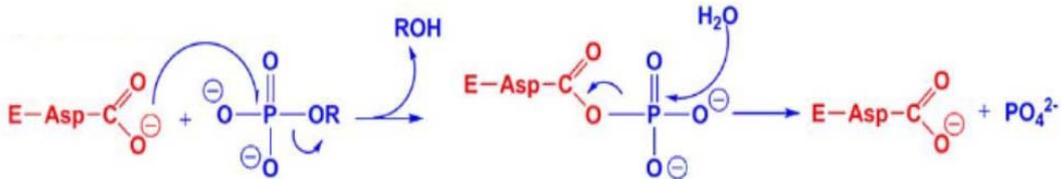
In der Tabelle 14 sind vorrangig Enzyme aus Bakterien aufgeführt, da Untersuchungen zu bakteriellen HAD-Phosphatasen am häufigsten publiziert sind. Abgesehen von der HsPHOSPHO1 weisen alle in Tab. 14 genannten Enzyme  $K_m$ -Werte im Bereich von 0.1 – 2.5 mM auf. Damit liegen die  $K_m$ -Werte der in der vorliegenden Arbeit untersuchten PECP-Spezies ebenfalls in diesem Bereich. Es handelt sich demzufolge um typische Werte der  $Mg^{2+}$ -abhängigen Phosphohydrolasen der HAD-Superfamilie. Eine Ausnahme bilden die  $K_m$ -Werte für PEA und PCho der HsPHOSPHO1-katalysierten-Reaktion. Für beide Substrate sind  $K_m$ -Werte deutlich niedriger und liegen im mikromolaren Bereich. Ein Erklärungsansatz hierfür besteht darin, dass art- und gewebespezifische Unterschiede in den Konzentrationen von PEA und PCho bestehen, welche mit der Ausprägung deutlich verschiedener Substrataffinitäten der am Umsatz der Substrate beteiligten Enzyme verbunden sind. Des Weiteren wäre es möglich, dass die HsPHOSPHO1 grundsätzlich anderen intrazellulären Regulationsmechanismen unterliegt als die übrigen Phosphatasen der HAD-Familie. Es zeichnet sich ab, dass die als Leitenzym der PHOSPHO1-Subfamilie angesprochene HsPHOSPHO1 in vieler Hinsicht ein untypisches Verhalten zeigt. Dies könnte in Zukunft terminologische Änderungen zur Folge notwendig machen.

### Der Katalysemechanismus der AtPECP1

In dieser Arbeit wurden durch Analyse des pH-Profiles der PECP1 die  $pK_a$ -Werte berechnet, um Aussagen zum Reaktionsmechanismus treffen zu können (siehe Abb. 12). Allen & Dunaway beschrieben 2009 den chemischen Reaktionsmechanismus im aktiven Zentrum des *Motivs 1* der HAD-Phosphatasen. Dabei ist der Reaktionsablauf in zwei Teilschritte gegliedert. Der erste Schritt ist der Phosphoryltransfer vom Substrat auf das erste nukleophile Aspartat des *Motivs 1*. Der zweite Schritt ist der Phosphoryltransfer vom Aspartylphosphat-Intermediat zu einem Wassermolekül. Das zweite Aspartat des *Motivs 1* hat eine generelle Säure/Base-Funktion, indem es die abgehende Gruppe des 1. Reaktionsschritts protoniert und das Wassernukleophil im 2. Reaktionsschritt deprotoniert. Das Phosphat wird anschließend freigesetzt (siehe Abb. 34).

1. Reaktionsschritt:

2. Reaktionsschritt:



**Abbildung 34: Genereller katalytischer Mechanismus der HAD-Phosphatasen.**

(Abbildung wurde aus Allen & Dunaway, 2009, entnommen)

1. Reaktionsschritt: Nukleophiler Angriff des Carboxylatgruppe auf das Phosphation,
2. Reaktionsschritt: Hydrolyse des enzymständigen Aspartylphosphat-Intermediats

Die in dieser Arbeit ermittelten  $pK_a$ -Werte der PECP1,  $pK_1 = 9.1$  und  $pK_2 = 5.1$ , könnten einen zwei-Basen-Reaktionsmechanismus charakterisieren. Der  $pK_2$ -Wert von 5.1 könnte prinzipiell dem Aspartat D12 des *Motivs 1* (siehe Abb. 14) zugeordnet werden, welches wahrscheinlich die Phosphorylgruppe des Substrats nukleophil angreift. Eine Protonierung der  $\alpha$ -Carboxylatgruppe dieser Seitenkette würde den nukleophilen Angriff unterbinden. Der  $pK_a$ -Wert der  $\alpha$ -Carboxylatgruppe von Aspartat in Wasser beträgt 3.9 (Schellenberger, 1989). Die Abweichung von etwa einer  $pK_a$ -Einheit vom kinetisch gemessenen  $pK_a$ -Wert des Enzyms kann durch Umgebungseffekte hervorgerufen sein. So würde eine relativ hydrophobe Umgebung der betreffenden Seitenkette eine solche Verschiebung erklären können. Der ebenfalls beobachtete  $pK_a$ -Wert von 9.1 steht mit einer Seitenkette in Verbindung, deren Deprotonierung zur Unterdrückung der katalytischen Aktivität führt. Die Wahrscheinlichkeit, dass es sich bei dieser Gruppe um D14 handelt, ist sehr gering, da in diesem Fall vorausgesetzt werden müsste, dass die  $\alpha$ -Carboxylatgruppe von D14 im gesamten pH-Optimalbereich deprotoniert vorläge. Dies würde eine außerordentlich starke Verschiebung des intrinsischen  $pK_a$ -Wertes implizieren. Dagegen könnte der beobachtete  $pK_a$ -Wert von 9.1 einer Lysin-Seitenkette zukommen. Der  $pK_a$ -Wert der  $\epsilon$ -Aminogruppe von Lysin in Wasser beträgt 10.3 (Schellenberger, 1989). Prinzipiell kämen zwei Lysin-Seitenketten als Träger des  $pK_a$ -Wertes in Frage, K15 und K157 (siehe

Abb. 14). Von diesen Seitenketten ist K157 am Aufbau des aktiven Zentrums von AtPECP1 beteiligt. Zu dieser Enzymspezies liegt jedoch keine Kristallstruktur vor. Nach kristallographischen Studien an der MDP-1 aus *Mus musculus* trägt die  $\epsilon$ -Aminogruppe dieses Lysins zur Koordination des Substrats bei (siehe Einleitung Abb. 3 und Peisach *et al.*, 2004). Grundlage dieser Interaktion ist die Ladungswechselwirkung zwischen der protonierten  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins und dem negativ geladenen Substratmolekül. Im Falle einer Deprotonierung der  $\epsilon$ -Aminogruppe wird die Bindung des Substrates geschwächt. Diese Interpretation beruht auf der Übertragbarkeit der strukturellen Befunde von Peisach *et al.*, 2004 auf die AtPECP1 und bleibt durch separate strukturelle Untersuchungen an AtPECP1 zu verifizieren.

### 3.2 Die putative Funktion der PECP-Enzymfamilie im $P_i$ -versorgten Metabolismus

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten zwei Phosphoethanolamin/Phosphocholin-Phosphatasen in Arabidopsis sowie sieben weitere Phosphatasen dieser Art in Tomate, Kartoffel, Bohne und Reis charakterisiert werden. Des Weiteren ergab die bioinformatische Verwandtschaftsanalyse der homologen Gene der Gefäßpflanzen, dass sich mit hoher Wahrscheinlichkeit weitere PECP-Spezies unter den Sequenzen befinden.

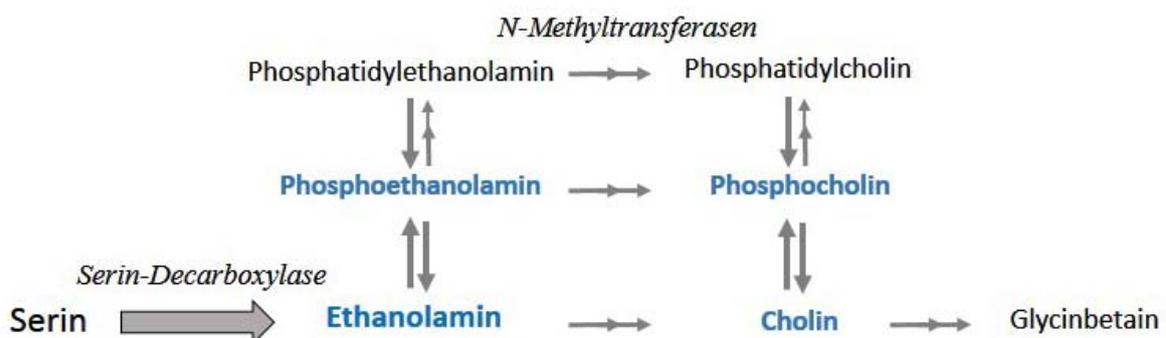
Daraus ergibt sich als zentrale Frage, welche Funktionen der PECP-Enzymfamilie im pflanzlichen Metabolismus zukommen. Zur Beantwortung dieser Frage werden die enzymatischen *in vitro*-Daten zur AtPECP2- bzw. der anderen charakterisierten PECP-Spezies sowie die Ergebnisse aus den *in vivo*-Analysen der transgenen AtPECP1-Linien (T-DNA-Insertionslinien und Überexpressionslinien) herangezogen. Nach den im Abschnitt 2.1.5 vorgestellten *in vitro*-Studien erweist sich AtPECP2 als Phosphoethanolamin-Phosphatase. Im Unterschied zu diesem Enzym setzen die anderen PECP-Spezies beide Substrate, PEA und PCho, um (siehe Tab. 2, 6 und 13). Welchen Anteil die PECP2 und die anderen PECP-Spezies in der Pflanze am Umsatz dieser Substrate haben, kann nur anhand von Mutantpflanzen in weiterführenden Studien geprüft werden. Die in dieser Arbeit durchgeführten *in vivo*-Studien an AtPECP1-T-DNA-Insertionslinien und Überexpressionslinien im Vergleich zum Wildtyp lassen folgende vorläufige Schlüsse zu.

Die Extrakte der Wildtyp-Pflanzen unter (+ $P_i$ )-Bedingungen zeigen eine basale Enzymaktivität für beide Substrate ( $\sim 15 - 25 \text{ nmol } P_i \text{ min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ ; vergl. Abb. 23, 24, 28, 29). Daher stellt sich die Frage, woher diese Grundaktivität ursächlich stammt. Prinzipiell könnte man vermuten, dass die basale Aktivität des PECP1 unter Phosphatversorgung (siehe Abb. 7 und 22) für diese Phosphatase-Aktivität verantwortlich ist. Das ist jedoch nicht der Fall, da in den Extrakten der *knock out*-Pflanzen keine PECP1-Transkripte mehr nachgewiesen werden konnten (siehe Abb. 21 und 22), obwohl in ihren Extrakten eine signifikante basale Enzymaktivität nachweisbar ist. Es ist daher nahe liegend, dass weitere Phosphatasen für diesen Substratumsatz verantwortlich sind. Die Hydrolyse des Phosphoethanolamins in den Extrakten könnte durch die konstitutiv exprimierte AtPECP2 erfolgen. Allerdings kann mit

dieser Annahme nicht der gesamte Befund erklärt werden. So konnte in den Extrakten  $P_1$ -versorgter Pflanzen auch eine Spaltung von Phosphocholin nachgewiesen werden, die nicht auf die AtPECP2-Reaktion zurückzuführen ist, da Phosphocholin kein Substrat der PECP2 darstellt.

In der Literatur wurden bisher keine spezifischen Phosphocholin-spaltenden Phosphatasen in Pflanzen beschrieben, die unter den Bedingungen der Phosphatversorgung aktiv sind. Für die Existenz solcher Enzyme sprechen jedoch die folgenden Beobachtungen. Tanaka und Kollegen wiesen eine langsame Hydrolyse von Phosphocholin in Extrakten verschiedener Pflanzen (Gerste, Weizen, Tabak, Spinat und Kürbis) nach, konnten aufgrund der geringen Proteinmengen aber keine weiteren Studien zur Substratspezifität und enzymatischen Charakterisierung durchführen (Tanaka *et al.*, 1966). In Zellen von *Acer pseudoplatanus* wurde gleichfalls die extrazelluläre Hydrolyse des Phosphocholin beobachtet, die vermutlich auf eine an der Zellwand lokalisierte unspezifische Phosphatase zurückzuführen ist (Gout *et al.*, 1990). In Hinblick auf die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten *in vivo*-Analysen der Phosphatase-Aktivität ist zu berücksichtigen, dass die Rohextrakte Material aller Zellkompartimente enthalten. Die in dieser Arbeit charakterisierten PECP-Spezies sind zytoplasmatisch lokalisiert, da Transportsignalsequenzen in den entsprechenden Genen fehlen (siehe 2.1.2). Darüber hinaus konnte in Lokalisierungsstudien zur AtPECP1 in *Nicotiana benthamiana* unter Verwendung eines AtPECP1-YFP-Fusionsproteins die zytoplasmatische Lokalisierung direkt gezeigt werden (Berger & Köck, unveröffentlicht). Außerdem sind für *Arabidopsis thaliana* 29 Purple Acid-Phosphatasen beschrieben, die eine weite Bandbreite phosphorylierter Substrate relativ unspezifisch umsetzen (siehe Einleitung 1.2.4.1). Dabei ist nicht auszuschließen, dass sie auch Phosphocholin katalytisch umsetzen können.

Im Folgenden soll der Metabolismus von Phosphoethanolamin und Phosphocholin unter Phosphatversorgung umrissen werden. Der Fokus liegt dabei auf Ethanolamin und seinen Derivaten. Ethanolamin ist eine wichtige Verbindung für die Synthese des Phosphatidylethanolamins und des Phosphatidylcholins, die beiden Hauptkomponenten der Phospholipide in den eukaryotischen Membranen (siehe auch Einleitung, 1.2.4). In der Abbildung 35 sind die grundlegenden Zusammenhänge zu diesen Metaboliten gezeigt.



**Abbildung 35: Synthese und Metabolismus des Ethanolamins und weitere Derivate in Pflanzen**  
(das Schema wurde stark modifiziert nach Rontein *et al.*, 2003)

Cholin ist unter anderem ein Präkursor für die Glycinbetainsynthese. Glycinbetain ist eine notwendige osmolytisch aktive Substanz, die unter verschiedenen abiotischen Stressbedingungen, beispielsweise Trockenstress (Nuccio *et al.*, 1998; Peel *et al.*, 2010; Chen & Murata, 2011) benötigt wird. In Pflanzen wird Ethanolamin hauptsächlich aus der Decarboxylierung von Serin oder Phosphatidylserin gewonnen. Dieser für Pflanzen spezifische enzymatische Schritt wird von einer Serin-Decarboxylase (SDC-1), die hoch spezifisch für L-Serin ist, katalysiert (Rontein *et al.*, 2003). Anhand von *sdc-1*-Mutantpflanzen in Arabidopsis konnte nachgewiesen werden, dass der Ausfall des Enzyms weitreichende Folgen hat. Die *sdc-1*-Pflanzen zeigten nekrotische Läsionen in Blättern, multiple Infloreszenzen, sterile Blüten und/oder blühten frühzeitig unter Kurztags-Lichtbedingungen. Diese Defekte verschwanden rasch unter Zufuhr von Ethanolamin und regenerierten sich bei normalen Ethanolamin-Spiegel (Kwon *et al.*, 2012). Der Ausfall der zytosolischen Serin-Decarboxylase ist offensichtlich durch die Arabidopsis-PECP-Spezies nicht kompensierbar, obwohl diese Enzyme Phosphoethanolamin spalten können. Gründe dafür wären, dass unter Phosphatversorgung zu geringe Mengen an PECP-Enzymen vorliegen oder der Phosphoethanolamin-Pool nicht ausreichend aus Abbau-Quellen beliefert wird. Die Studie von Kwon *et al.* (2012) zeigte, dass Ethanolamin eine entscheidende Rolle im Wachstum und in der Entwicklung der Pflanzen spielt. Die PECP-Enzymfamilie könnte potentiell einen Beitrag bei der Bereitstellung von Ethanolamin leisten. Um diese Funktion eingrenzen zu können, müssten zunächst die Serin- und Ethanolamin-Spiegel in vollversorgten PECP-Mutantpflanzen bestimmt werden.

Im katabolen Phospholipid-Stoffwechsel sind mehrere Funktionen für PECP-Spezies denkbar. So müssen die Phospholipid-Membranen kontinuierlich erneuert werden. Dabei wird Phosphoethanolamin aus Phosphatidylethanolamin mittels Phospholipasen C freigesetzt (Nakamura, 2013). Dieses Recycling der Membranen könnte zu einem Überschuss an Phosphoethanolamin führen, welcher nicht vollständig durch die Phosphomethylethanolamin-N-Methyltransferasen (BeGora *et al.*, 2010) zu Phosphocholin umgesetzt wird (siehe auch Abb. 35). Hier könnten die PECP-Spezies regulierend eingreifen und das anfallende Phosphoethanolamin abbauen.

Eine weitere Funktion der PECP-Spezies könnte sich auf die Schließzellen der Pflanzen beziehen. Phosphoethanolamin entsteht als Intermediat beim Abbau von Sphingosin-1-Phosphat des stomatären Komplexes (Spiegel & Milstien, 2003). Hier könnten die PECP-Spezies das anfallende Phosphoethanolamin beseitigen und Ethanolamin für weitere Synthesen freisetzen. Es ist allerdings bisher unbekannt, ob PECP-Spezies in Schließzellen lokalisiert sind.

Das zweite Reaktionsprodukt der PECP-Reaktion ist Phosphat. In der normalen Stoffwechselsituation, in der in den Pflanzen eine ausbalancierte  $P_i$ -Homöostase vorherrscht, wird das freigewordene Phosphat in der Vakuole deponiert bzw. steht zur Synthese von neuen Phosphomonoestern zur Verfügung. Außerdem kann es zur Konservierung des Phosphorylgruppenübertragungspotentials in Form von ATP genutzt werden.

### 3.3 Die Rolle der AtPECP1 im P<sub>i</sub>-verarmten Pflanzenmetabolismus

Im vorangegangenen Abschnitt 3.2 konnte die mögliche biologische Rolle der PECP-Enzymfamilie im vollversorgten Pflanzen-Metabolismus umrissen werden. Treten jedoch Phosphatmangel-Bedingungen ein, so werden die Phosphatasen der PECP-Familie, mit Ausnahme von AtPECP2, verstärkt synthetisiert. Die primäre Funktion der enzymatischen Umsetzung ihrer bevorzugten Substrate besteht darin, Orthophosphat zur Aufrechterhaltung der P<sub>i</sub>-Homöostase bereitzustellen. Es ist davon auszugehen, dass die PECP-Spezies in der Phosphatmangel-Antwort eine zentrale Rolle spielen. Dies soll anhand der Daten der AtPECP1 erläutert werden.

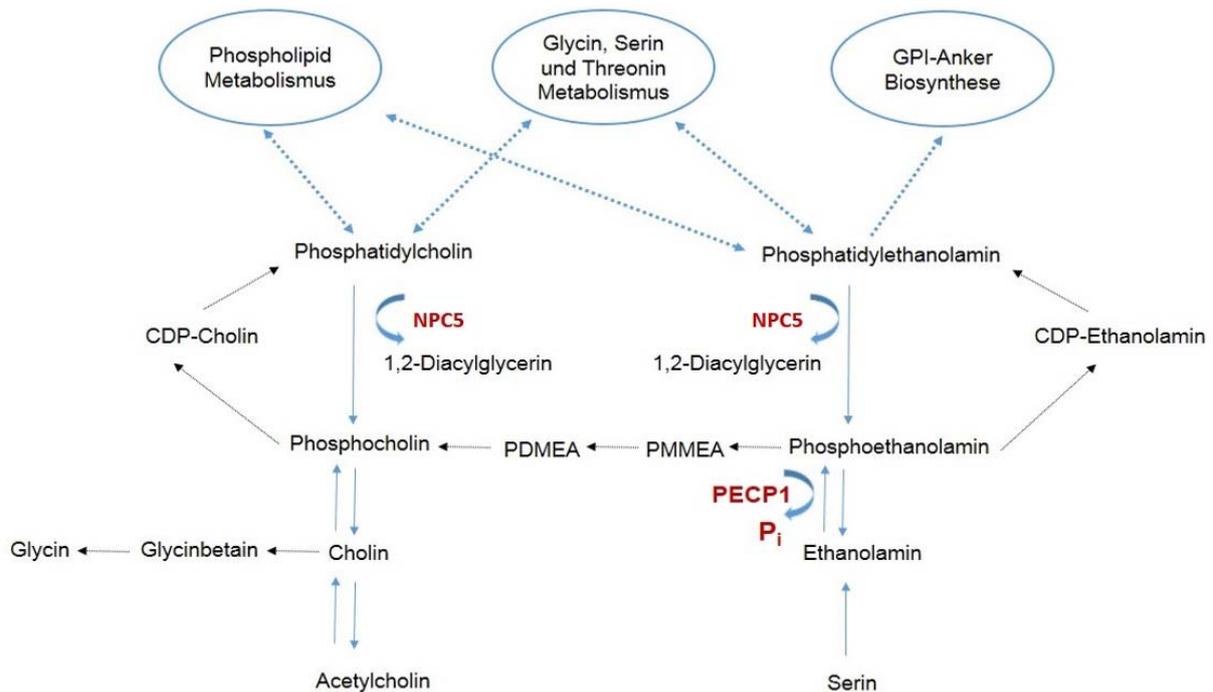
Eine kurzfristige Strategie zur Beseitigung des P<sub>i</sub>-Mangels ist die Spaltung von Phosphomonoestern zur Generierung von Orthophosphat. Die Phosphorylverbindungen, PEA und PCho, kommen intrazellulär in unterschiedlichen Mengen vor. Phosphocholin ist eine stark angereicherte Komponente (bis zu 30 % Anteil bezogen auf den gesamten P<sub>i</sub>-Pool der Zelle) und steht den Pflanzen zu Beginn der P<sub>i</sub>-Mangel-Situation als Phosphat-Quelle problemlos zur Verfügung. Dagegen ist der Anteil des Phosphoethanolamins mit etwa 1% am zellulären P<sub>i</sub>-Pool gering (Martin & Tolberg, 1998; Plaxton & Carswell, 1999). Die Quantifizierung der Metabolite in der vorliegenden Arbeit ergab, dass in den Arabidopsis-Extrakten bis zu 16 nmol PCho pro 100 mg Frischgewicht vorlag. Dagegen war der Anteil an PEA so gering, dass trotz mehrfacher Versuche die Bestimmung scheiterte.

Anders gestaltet sich die Situation bei anhaltender P<sub>i</sub>-Limitierung. Zahlreiche physiologische Studien zeigten, dass die P<sub>i</sub>-Reserve der extraplastidischen Membranen bei dauerhaftem Phosphatmangel angegriffen wird, indem der Anteil der Phospholipide reduziert und durch amphipathische Galacto- und Sulfolipide ersetzt wird (Dörmann & Benning 2002; Ticconi & Abel, 2004; Plaxton & Tran, 2011). Wie bereits in der Einleitung 1.2.4 kurz erläutert, werden unter P<sub>i</sub>-Mangel die unspezifischen Phospholipasen C, NPC4 (Nakamura *et al.*, 2005) und NPC5 (Gaude *et al.*, 2008), bereitgestellt. Sie werden benötigt, um den Abbau der Phospholipide zu regulieren (Nakamura, 2013). Die rekombinante NPC5-Expression in *E. coli* zeigte eine 40fach geringere Phosphatidylcholin-hydrolysierende Aktivität als NPC4. In den Extrakten der *npc5-1* Mutantenlinien aus Arabidopsis-Blättern, konnte unter P<sub>i</sub>-Mangel noch eine Restaktivität der NPC5 nachgewiesen werden (Gaude *et al.*, 2008). Dennoch ist eine signifikante Reduktion des Digalactosyldiglycerid (DGDG)-Spiegels in diesen Extrakten im Vergleich zu den Wildtyp-Extrakten beobachtet. Das deutet daraufhin, dass NPC5 in der P<sub>i</sub>-Mangel-Situation eine entscheidende Funktion für die Regulation des DGDG-Pools ausübt (Gaude *et al.*, 2008; Nakamura, 2013). Interessanterweise ist die subzelluläre Lokalisation der NPC4 und der NPC5 verschieden. Während die NPC4 ein membranständiges Enzym ist, wird die NPC5 als lösliches Enzym im Zytoplasma beschrieben (Nakamura *et al.*, 2005; Gaude *et al.*, 2008). Durch diese Lokalisierung könnte die NPC5 den DGDG-Pool unter P<sub>i</sub>-Limitierung regulieren. Die NPC5 besitzt somit einen Zugang zu den intrazellulären Membranen, einschließlich des Endoplasmatischen Retikulums, der Ort der ablaufenden Phospholipid-Biosynthese. Des Weiteren hat NPC5 einen Zugang zur dem Zytoplas-

ma zugewandten Oberfläche der plastiditären Membranen, an der die Galactolipid-Biosynthese stattfindet (Nakamura, 2013). Die physiologische Funktion von NPC4 konnte bisher nicht geklärt werden. Bei den enzymatischen Analysen zur AtPECP1 konnte mittels *Western Blot* die ektopische Expression des Proteins in den Extrakten der Überexpressionspflanzen nachgewiesen werden (Abb. 27). Das unter der Kontrolle des 35S-Promotors stehende zusätzlich eingebrachte *PECP1*-Gen wird konstitutiv exprimiert (Abb. 26) und die rekombinante AtPECP1-Myc<sub>10</sub> in den (+P<sub>i</sub>)-Pflanzen produziert. Zunächst sollte die Frage beantwortet werden, ob Phosphoethanolamin und Phosphocholin die Substrate der AtPECP1 in den Überexpressionspflanzen sind. Die Phosphocholin-spaltende Aktivität in den phosphatversorgten Überexpressionspflanzen war im Vergleich zum Wildtyp (siehe Abb. 29) nicht signifikant erhöht. Die Spiegel-Messungen der Metabolite in diesen Extrakten stützen dieses Ergebnis. Der Phosphocholin-Spiegel der Überexpressionspflanzen entsprach nahezu dem Spiegel der Wildtyp-Pflanzen (siehe Tab. 10). Da der Cholin-Spiegel in allen Proben annähernd gleich hoch ist, folgt daraus, dass Phosphocholin nicht das vorrangige Substrat der AtPECP1 in *Arabidopsis thaliana* ist.

Anders dagegen stellt sich die Situation in Hinblick auf die Spaltung von Phosphoethanolamin in diesen Pflanzenextrakten dar. Es kommt zu zusätzlicher Phosphat-Freisetzung aus PEA in den phosphatversorgten Überexpressionspflanzen, verglichen mit den entsprechenden Wildtyp-Proben (siehe Tab. 9 und Abb. 28). Dieses Ergebnis wird unterstützt durch die Analyse der Metabolite der Überexpressionslinien 21 und 29. Es konnten vielfach erhöhte Ethanolamin-Werte in den Pflanzen der Linie 29 bestimmt werden (siehe Tab. 10). Dagegen enthielten die Proben der Linie 21 nur leicht erhöhte Ethanolamin-Werte gegenüber dem Wildtyp. Die Ursachen hierfür könnten in einer unterschiedlichen Integration des stabil transformierten *PECP1*-Gens in das Genom der *Arabidopsis*-Pflanzen bestehen. Um die hohen Ethanolamin-Werte zu bestätigen, müssen in weiterführenden Arbeiten die Metabolite der Überexpressionslinien 23 und 31 analysiert werden, welche ebenfalls eine zusätzliche Phosphoethanolamin-spaltende Aktivitäten zeigten (siehe Tab. 9). Aus diesen Befunden kann geschlossen werden, dass Phosphoethanolamin das native Substrat der AtPECP1 in den Überexpressionspflanzen ist. Die Analysen der P<sub>i</sub>-verarmten T-DNA-Insertionslinien führten zum gleichen Ergebnis: AtPECP1 ist *in vivo* vorrangig als eine Phosphoethanolamin-Phosphatase aktiv und somit ein Isoenzym der AtPECP2 in *Arabidopsis thaliana*.

Die Funktion der PECP-Enzymfamilie im P<sub>i</sub>-versorgten Metabolismus wurde im Abschnitt 3.2 erläutert. Nachfolgend soll ein Modell entworfen werden, welches die spezifische Funktion der AtPECP1 unter P<sub>i</sub>-Limitierung eingrenzt (siehe Abb. 36).



**Abbildung 36: Modell zur Funktion der PECP1 im  $P_i$ -verarmten Metabolismus von *A. thaliana*.**

Folgende Abkürzungen wurden verwendet: GPI (Glycosylphosphatidylinositol), CDP (Cytidindiphosphat), PMMEA (Phosphomonoethylethanolamin), PDMEA (Phosphodimethylethanolamin).

Dieses Modell komplettiert das vereinfachte Schema der Abbildung 35. Es sind jetzt zusätzlich die Metabolite des biochemischen Stoffwechselweges von Cytidin-5'-diphosphoethanolamin (CDP-EA) und Cytidin-5'-diphosphocholin (CDP-Cho) dargestellt. Im Metabolismus sind beide Stoffe hauptsächlich in die Biosynthese des Phosphatidylethanolamins (PtdEA) und des Phosphatidylcholins (PtdCho) involviert (Bürgermeister *et al.*, 2004). Allgemein gibt es zwei Wege, PtdCho zu synthetisieren: einerseits über den sogenannten *Kennedy Pathway* (Gibellini & Smith, 2010) und andererseits über den Methylierungsweg (Rontein *et al.*, 2003; BeGora *et al.*, 2010). PtdEA ist weiterhin der Donor eines Ethanolaminrestes, welcher zur Verknüpfung des GPI-Ankers an ein Protein verwendet wird (Menon & Stevens, 1993). Beide Verbindungen, PtdCho und PtdEA, fließen als Stoffe in den Phospholipid-Metabolismus und in den Aminosäure-Stoffwechsel zur Synthese des Glycins, Serins und Threonins ein. Unter fortdauernder  $P_i$ -Limitierung, bei dem der Phospholipid-Pool in den einschichtigen Membranen reduziert wird, wird die unspezifische Phospholipase C, NPC5, aktiviert. Ihre Aufgabe ist, wie eingangs bereits erläutert, PtdCho und PtdEA zu hydrolysieren und 1,2-Diacylglycerin für die Synthese der Galactolipide bereitzustellen. Das hier vorgeschlagene Modell (siehe Abb. 36) setzt voraus, dass die Aktivierung der NPC5 der Reaktionsschritt ist, welcher der AtPECP1-Reaktion vorgeschaltet ist und ihr möglicherweise zeitlich vorausgeht. Die PECP1 spaltet nachfolgend das aus der NPC5-Reaktion entstandene Produkt Phosphoethanolamin, um daraus primär Phosphat und zusätzlich Ethanolamin freizusetzen. Dieses freigesetzte Phosphat wird den  $P_i$ -Pool in *Arabidopsis thaliana* anreichern und stabilisieren. Die Bereitstellung des Ethanolamins während der  $P_i$ -Stress-Situation könnte

sich begünstigend auf die *de novo*-Synthese des Cholins und seiner Derivate auswirken was wiederum für die pflanzliche Adaptation unter abiotischem Stress wichtig ist.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse und die daraus resultierenden Erkenntnisse tragen zur allgemeinen Beschreibung der pflanzlichen Adaptationsreaktionen unter Phosphatlimitierung bei. Die charakterisierte pflanzliche Enzymfamilie der PECPs leistet als Teil des *Phosphate Starvation Response*-Netzwerks einen entscheidenden Beitrag zur Aufrechterhaltung der  $P_i$ -Homöostase in den Pflanzen.

#### 4. Zusammenfassung

Innerhalb der letzten zwei Jahrzehnte konnten verstärkt die biochemischen und metabolischen Reaktionen in  $P_i$ -verarmten Pflanzen über die Identifizierung einer Anzahl Phosphatmangel-induzierter Gene aufgeklärt werden. Die unter  $P_i$ -Defizit aktivierte intrazelluläre PPsPase in *A. thaliana* kodiert für eine Pyrophosphatase der HAD-Superfamilie. Im Rahmen dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob das zweite homologe  $P_i$ -Mangel induzierte Gen *Atlg17710* für eine weitere Pyrophosphatase kodiert. Des Weiteren sollten die enzymatischen Eigenschaften, die Struktur und die biologische Funktion dieser Phosphatase charakterisiert werden.

Das Enzym ist die erste pflanzliche Phosphoethanolamin/Phosphocholin Phosphatase (EC 3.1.3.75) und wurde als AtPECP1 benannt. In vorangegangenen Analysen konnte die Existenz eines solchen spezifischen Enzyms in Pflanzen nicht nachgewiesen werden. Die aktuelle Studie zeigt, dass das  $Mg^{2+}$ -abhängige Enzym spezifisch für beide Substrate, PEA ( $K_m$  Wert = 1.16 mM) und PCho ( $K_m$  Wert = 0.44 mM), ist. Die Phosphatase nutzt für die Katalyse einen breiten pH-Optimumsbereich von pH 6 bis pH 8. Dabei ist die katalytische Effizienz für Phosphoethanolamin ( $1.06 \times 10^4 M^{-1} s^{-1}$ ) wesentlich höher als für Phosphocholin ( $34.0 \times 10^3 M^{-1} s^{-1}$ ). Die Untersuchung der Tertiärstruktur der PECP1 zeigte, dass die Phosphatase als funktionelles Dimer in einer schnellen Gleichgewichtsreaktion zwischen Monomer-Form und Dimer-Form enzymatisch aktiv ist. Das unterscheidet sie von der PPsPase1 welche ein funktionell aktives Tetramer ist. Dieses Ergebnis könnte einen Ansatz zur Erklärung der unterschiedlichen Enzymarten bieten. Weiterführende Studien zur gerichteten Mutagenese bzw. Kristallstrukturanalysen könnten diese Annahme bestätigen.

In Extrakten von Arabidopsis-Pflanzen (T-DNA-Insertionsmutanten und Überexpressionspflanzen) konnte kein Effekt aus der Spaltung des Phosphocholin beobachtet werden. In diesen Extrakten ist das native Substrat der AtPECP1-Reaktion ausschließlich Phosphoethanolamin. Die metabolischen Studien der an der PECP1-Reaktion beteiligten Substanzen erbrachten, dass in den Extrakten der Überexpressionspflanzen der Linie 29 stark erhöhte Ethanolamin-Werte nachweisbar waren. Dagegen konnte eine Anreicherung des Cholins in diesen Extrakten nicht gezeigt werden. Weiterführende metabolische Analysen der Extrakte der Überexpressionspflanzen der Linien 23 und 31, müssen dieses Ergebnis absichern. Aus diesen Befunden folgte die Erkenntnis, dass die AtPECP1 eine  $P_i$ -Mangel aktivierte Phosphoethanolamin-Phosphatase in *Arabidopsis thaliana* ist.

Über die „Heilung“ der *PECP1*-T-DNA-Insertionslinien, wobei die kodierende Sequenz des Gens stabil in die Pflanzen zurück transformiert wird, könnte die Phosphoethanolamin-spaltende Aktivität der AtPECP1 in diesen geheilten Pflanzen quantifiziert werden.

Die zweite homologe *A. thaliana* Phosphoethanolamin/Phosphocholin-Phosphatase, AtPECP2, gehört in die kleine Arabidopsis-Genfamilie. Im Unterschied zu den beiden anderen Phosphatasen wird dieses Enzym konstitutiv in Arabidopsis exprimiert. Die Ermittlung der katalytischen Parameter ergab, dass die PECP2 im sauren Milieu Phosphoethanolamin umsetzt ( $K_m = 2.27$  mM). An welcher Stelle

PECP2 im vollversorgtem Metabolismus regulierend eingreift und Phosphoethanolamin katalytisch umsetzt, könnte durch die Analyse von *AtPECP2*-T-DNA-Insertionslinien untersucht werden.

Die Phosphatasen der kleinen Arabidopsis-Genfamilie sind homolog zu einer Anzahl von Genen anderer Pflanzenspezies. Da diese homologen Gene der PHOSPHO1-Subfamilie im gesamten Pflanzenreich vorkommen, müssen sie eine bedeutende Funktion im pflanzlichen Metabolismus ausüben. Einige dieser Vertreter, die Phosphatasen LePS2;1, -2 und -3, StPPP, PvHAD1, PvPS2 und OsACP1, konnten in dieser Arbeit enzymatisch charakterisiert werden. Sie besitzen im sauren Milieu spezifische Aktivitäten für Phosphoethanolamin und Phosphocholin. Auch diese Enzyme sind Phosphoethanolamin/Phosphocholin-Phosphatasen (EC 3.1.3.75) und bilden mit ihren verwandten Arabidopsis-Spezies zusammen die pflanzliche PECP-Enzymfamilie.

## 5. Material und Methoden

### 5.1 Verwendete Materialien

#### 5.1.1 Geräte

Gerät	Hersteller*	Modell
<i>Blotting</i> Apparatur	BiotecFischer	-
Chromatographie-Säule	GE Healthcare	Nickel-NTA-Säule C10/10
Chromatographie-Säule	GE Healthcare	Nickel-NTA-Säule XK 16
Elektrophoresekammer	BiotecFischer	horizontal
FLUOstar Galaxy	BMG Labtechnologies	-
Hybridisierungssofen (1)	Heraeus Instruments	-
Hybridisierungssofen (2)	peqLab Biotechnologie GmbH	HB-1000 Hybridizer
Gel-Dokumentationsanlage	Pharmacia	ImageMaster <sup>R</sup> VDS
Gelfiltrationssäule	GE Healthcare	Superdex 200 HR10/30
Inkubator	New Brunswick Scientific	innova <sup>TM</sup> 4230
Magnetrührer	VARIOMAG	MAXI HP1P
pH-Meter	WTW	pH 526
Pipetten-Satz	Gilson	1000, 200, 100, 20 und 2 µL
Protein-Reinigungssystem	Pharmacia	ÄKTA <sup>TM</sup> purifier
<i>Real Time PCR</i> Detektionssystem	BioRad Laboratories	iCycler iQ
Rotationsverdampfer	Heidolph	Typ VV-Micro
Schüttler	ILKA Labortechnik	KS 250 basic
Spannungsquelle	Amersham Biosciences	EPS 301
Spektrometer	Amersham Bioscience	Ultrospec 3300 pro
Spektrometer	Pharmacia	Biotech Novaspec II
Thermomixer	Eppendorf	Thermomixer 5436
Ultraschall-Desintegrator	BANDELIN	electronic Sonoplus
Visiprep Spe Vacuum Manifold	Supelco	BATCH NA
Vortexer	Scientific Industries, INC.	Vortex-Genie2
Waage	Sartorius	PT 3100
Waage, fein	Sartorius	BP 211D
Waage, fein	CHYO	MJ-300
Wasseranlage (ddH <sub>2</sub> O)	TKA	MicroPure
Zentrifugen	Eppendorf	5415 R, 5415 C, 5415 D, 5403 R
Zentrifuge	Sorvall	SORVALL <sup>R</sup> RC-26 PLUS

## 5.1.2 Chemikalien

Reagenz	Vertrieb*
Aceton, C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O	Carl Roth GmbH
Adenosin-5'-monophosphat, AMP, C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>5</sub> O <sub>7</sub> P	Sigma-Aldrich
Adenosin-5'-triphosphat, ATP, C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>5</sub> O <sub>13</sub> P <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich
Agarose, (1→4)-3,6-Anhydro-α-L-galactopyranosyl- (1→4)-β-D-galactopyranan	Carl Roth GmbH
Agar Agar	Euler
Ammoniumheptamolybdat-Tetrahydrat, (NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> · 4 H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH
Ammoniummonovanadat, NH <sub>4</sub> VO <sub>3</sub>	Carl Roth GmbH
Ammoniumnitrat, NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	Carl Roth GmbH
Ammoniumperoxodisulfat, APS, H <sub>8</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> S <sub>2</sub>	Carl Roth GmbH
Biorex <sup>®</sup> 70	VWR
Bromphenolblau, C <sub>19</sub> H <sub>10</sub> Br <sub>4</sub> O <sub>5</sub> S	SERVA
Calciumchlorid Dihydrat, CaCl <sub>2</sub> · 2 H <sub>2</sub> O	Carl Roth GmbH
Coomasie <i>Brillant Blue</i> R250, G 250	SERVA
2-(Cyclohexylamino)-ethansulfonsäure, CHES, C <sub>8</sub> H <sub>17</sub> NO <sub>3</sub> S	Carl Roth GmbH
Dikaliumhydrogenphosphat, K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carl Roth GmbH
Dinatriumhydrogenphosphat, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Carl Roth GmbH
Dithiothreitol, DTT, C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> O <sub>2</sub> S <sub>2</sub>	Carl Roth GmbH
Ethidiumbromid, C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> BrN <sub>3</sub>	Carl Roth GmbH
Ethylendiamintetraacetat, EDTA, C <sub>10</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub>	Carl Roth GmbH
Essigsäure, CH <sub>3</sub> COOH	Carl Roth GmbH
Ethanol, EtOH, C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> O	Carl Roth GmbH
Ficoll, Saccharose-Epichlorhydrin-Copolymer, C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> O <sub>11</sub> - C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> ClO	Carl Roth GmbH
Glucose, C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Carl Roth GmbH
Glutamin, C <sub>5</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	Carl Roth GmbH
Glycerin, C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	Carl Roth GmbH
Glycerinaldehyd-3-Phosphat, C <sub>3</sub> H <sub>7</sub> O <sub>6</sub> P	Boehringer
Glycin, C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	Carl Roth GmbH
Harnstoff, Urea, H <sub>2</sub> NCONH <sub>2</sub>	Merck
Hefeextrakt	Carl Roth GmbH
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, Hepes, C <sub>8</sub> H <sub>18</sub> N <sub>2</sub> O <sub>4</sub> S	Carl Roth GmbH
Hexamminocobalt (III)-chlorid, Co(NH <sub>3</sub> ) <sub>6</sub> Cl <sub>3</sub>	Sigma-Aldrich
Imidazol, C <sub>3</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub>	MERCK
Isopropanol, C <sub>3</sub> H <sub>8</sub> O	Carl Roth GmbH
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid, IPTG, C <sub>9</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub> S	SERVA
Kaliumchlorid, KCl	Carl Roth GmbH
Kaliumhydroxid, KOH	Carl Roth GmbH

Reagenz	Vertrieb*
Kaliumdihydrogenphosphat, $\text{KH}_2\text{PO}_4$	Carl Roth GmbH
Kaliumnitrat, $\text{KNO}_3$	Carl Roth GmbH
Lithium Chlorid, $\text{LiCl}$	Carl Roth GmbH
Magnesiumchlorid, $\text{MgCl}_2$	Carl Roth GmbH
Magnesiumsulfat, $\text{MgSO}_4$	Carl Roth GmbH
Malachitgrün-Oxalat, $\text{C}_{46}\text{H}_{50}\text{N}_4 \cdot 2\text{HC}_2\text{O}_4 \cdot \text{C}_2\text{H}_2\text{O}_4$	Sigma-Aldrich
Manganchlorid Tetrahydrat, $\text{MnCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich
$\beta$ -Mercaptoethanol, $\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$	Carl Roth GmbH
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure, MES, $\text{C}_6\text{H}_{13}\text{NO}_4\text{S}$	Carl Roth GmbH
Methanol, $\text{MeOH}$ , $\text{CH}_4\text{O}$	Carl Roth GmbH
Natriumchlorid, $\text{NaCl}$	Carl Roth GmbH
Natriumhypochlorid, $\text{NaOCl}$	Carl Roth GmbH
Natriumdodecylsulphat, SDS, $\text{C}_{12}\text{H}_{25}\text{NaO}_4\text{S}$	Carl Roth GmbH
Natriumpyrophosphat Hexahydrat, $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich
Nickel-(II)-sulfat Hexahydrat, $\text{NiSO}_4 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$	Carl Roth GmbH
p-Nitrophenylphosphat, $\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_6\text{P} \cdot 2\text{Na} \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich Octyl-
phenyl-polyethylenglycol, IGEPAL CA 630	Sigma-Aldrich
Phenol, $\text{C}_6\text{H}_6\text{O}$	Carl Roth GmbH
Phosphocholinchlorid, $\text{C}_5\text{H}_{15}\text{NO}_4\text{P}^+ \text{Cl}^-$	Sigma-Aldrich
O-Phosphorylethanolamin, $\text{C}_2\text{H}_8\text{NO}_4\text{P}$	Sigma-Aldrich
Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure), PIPES, $\text{C}_8\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_6\text{S}_2$	Carl Roth GmbH
Polyvinylpyrrolidon, Poly[1-(2-oxo-1-pyrrolidinyl)ethylene	Carl Roth GmbH
Rinderserum-Albumin, BSA	Carl Roth GmbH
Rotiphorese Gel 30, flüssiges Acrylamid, $\text{C}_3\text{H}_5\text{NO}$	Carl Roth GmbH
Saccharose, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Carl Roth GmbH
Salzsäure, $\text{HCl}$	Carl Roth GmbH
Schwefelsäure, $\text{H}_2\text{SO}_4$	Carl Roth GmbH
Sepharose ( <i>Fast Flow</i> )	GE Healthcare
Stickstoff, $\text{N}_2$	Praxair
N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin, TEMED, $\text{C}_6\text{H}_{16}\text{N}_2$	Carl Roth GmbH
Trichlormethan, Chloroform, $\text{CHCl}_3$	Carl Roth GmbH
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, Tris, $\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$	Carl Roth GmbH
Trinatriumcitrat, $\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	Carl Roth GmbH
Triton X100, $\text{C}_{14}\text{H}_{22}\text{O} (\text{C}_2\text{H}_4\text{O})_n$ (n = 9-10)	SERVA
Trypton/Pepton aus Casein, pankreatisch verdaut	Carl Roth GmbH
Tween 20, $\text{C}_{58}\text{H}_{114}\text{O}_{26}$	Carl Roth GmbH
Vermiculit, $(\text{Mg}_{0,5}\text{Ca}_{0,5}\text{Na,K})_{0,7}(\text{Mg,Fe,Al})_3[(\text{OH})_2(\text{Al,Si})_2\text{Si}_2\text{O}_{10}] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	Kammlott

### 5.1.3 Analysesets und Enzyme

<u>Analysesets und Enzyme</u>	<u>Vertrieb*</u>
<i>CloneJET™ PCRcloning Kit</i>	MBI Fermentas
DNaseI- RNase <i>free</i> , 10 x DNaseI Reaktionspuffer	MBI Fermentas
ECL <i>Western Blotting Substrate Kit</i>	PIERCE
<i>GeneJET™ Plasmid Miniprep-Kit</i>	MBI Fermentas
<i>Gel Filtration Calibration Kits LMW</i>	GE Healthcare
<i>High Pure PCR Product Purification Kit</i>	Roche Diagnostics
Marker: <i>GeneRuler™ 1kbDNA Ladder, SM0661, SM1811/2</i>	MBI Fermentas
Marker: <i>Quick-Load™ 1 kb, 100 bp DNA Ladder</i>	BioLabs
Nukleotide (dATP, dCTP, dTTP, dGTP)	MBI Fermentas
<i>NucleoSpin® RNA Plant Kit</i>	Machery & Nagel
<i>pENTR™ Directional TOPO® Cloning Kit</i>	Invitrogen
Pfu-Polymerase, 10 x Pfu-Polymerase Puffer	MBI Fermentas
<i>Phusion™ High Fidelity DNA Polymerase Kit</i>	MBI Fermentas
<i>DecaLabel™ DNA Labeling Kit</i>	MBI Fermentas
Restriktionsenzyme: <i>NcoI, NdeI, NotI, XhoI, HindIII</i>	MBI Fermentas
<i>RevertAid™H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit</i>	MBI Fermentas
<i>RiboLock™ Ribonuclease Inhibitor</i>	MBI Fermentas
Roti® Quant (Bradford-Reagenz)	Carl Roth GmbH
Roti® Store Stammhaltungssystem für Mikroorganismen	MBI Fermentas
Taq-Polymerase, 10 x Standard Taq-Polymerase Puffer	MBI Fermentas

\*Alle (Labor)-Materialien, Laborchemikalien, Molekularbiologische *Kits* und Enzyme sind über folgende Firmen bezogen worden: Biozym Scientific GmbH, BioLabs, Bio-Rad Laboratories GmbH, Carl Roth GmbH & Co KG, Duchefa Biochemie, GE Healthcare, Invitrogen Corporation, Gärtnerei Kammlott, Hartmann Analytik GmbH, MBI Fermentas GmbH, metabion international AG, MoBiTec GmbH, Praxair Deutschland GmbH, Quiagen GmbH, Roche Diagnostics GmbH, SERVA Electrophoresis GmbH, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Thermo Fisher Scientific Germany Ltd. & Co. KG und VWR International GmbH.

### 5.1.4 Vektoren

**Tabelle 15: Verwendete Plasmide**

Bezeichnung	Größe	Resistenz	Quelle
pET-28b(+)	5369 bp	Kanamycin	Novagen
pET-22b(+)	5493 bp	Ampicillin	Novagen
pORF_At1/11 ( <i>At1g17710</i> in pGEMT-Easy)	3840 bp	Ampicillin	AG Köck
pORF_At3/37 ( <i>At4g29530</i> in pGEMT-Easy)	3740 bp	Ampicillin	AG Köck
pORFSiPPP <i>StPPP</i> in pBluescript	3253 bp	Ampicillin	Petters <i>et al.</i> , 2002

Psi14A (pLePS2A) ( <i>Psi14A</i> in pBluescript)	2960 bp	Ampicillin	Stenzel <i>et al.</i> , 2003
Psi14B (pLePS2B) ( <i>Psi14B</i> in pBluescript)	2960 bp	Ampicillin	Stenzel <i>et al.</i> , 2003
Psi14C (pLePS2C) ( <i>Psi14C</i> in pBluescript)	2960 bp	Ampicillin	Stenzel <i>et al.</i> , 2003
pJET1.2/blunt	2974 bp	Ampicillin	MBI Fermentas
pGWB20	17000 bp	Kanamycin Rifampicin Hygromycin	Nakagawa <i>et al.</i> , 2007
pENTR™/D-TOPO®	2580 bp	Kanamycin Hygromycin	Invitrogen

### 5.1.5 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma metabion International AG, Lena-Christ-Straße 44/1, 82152 Martinsried hergestellt.

**Tabelle 16: Verwendete Primer**

Primer Nummer	Oligonukleotid-Name	Sequenz 5' → 3' (*)
1	A.thaliana-1f	ATGGCTAAGAATAACAACATCGTG
2	A.thaliana-1r	TCACTTGACCAAATTTAAAGGAAC
3	NcoI-At1-28b-f	<u>CAAGCCATGGCT</u> AAGAATAACAACAT
4	At1-28b-XhoI-r	<u>GCCTCGAGCTT</u> GACCAAATTTAAAGG
5	At1_Promotor-1f	CAAATGTGTGACATAAAGCAACTATCC
6	At1(qRT-PCR)f	CGA AAG AAG GGA AGA CGA GCA AG
7	At1(qRT-PCR)r	CCA TCG GTC CAA TCT CTA ACG
8	At1-r	GCA CTT GAC CAA ATT TAA AGG
9	caccAt1-f	CAC CAT GGC TAA GAA TAA CAA CAT CG
10	At1-2f	CGA GCT GAG AAT AGT GAG CGA C
11	At1-2rDD	CTT GTC ATT CTC CTC TCC TTC CTC TG
12	A.thaliana-3f	ATG GCA AAA ATC GTG ATA TTA TTT GA
13	A.thaliana-3r	TTA TGA ATC TTC TTC TTT TGT TAT TGT G
14	fp-At3_4g29530	<u>GCCATATG</u> GCAAAAATCGTGATA
15	rp-At3_4g29530_new	<u>GCTCGAGT</u> GAAATCTTCTTCTTTTG
16	At3(qRT-PCR)f	GGA GAT GGA GGA GGT GAC TTC
17	At3(qRT-PCR)r	TCT CTG TTG TTC CTC TGC ACT AC
18	UBI-f	TGGACGTACTTTGGCCGACT
19	UBI-rr	AGAGGCTGTACATGGCCCCA
20	fp-LePS2ABC_StPPP1	<u>GCATATG</u> GCTGG AATTGTAGTG
21	rp-LePS2AB	<u>GCTCGAG</u> GTAAGGCACTGGAAGAG
22	rp-LePS2C	<u>GCTCGAG</u> GTAAGGTACTGGAAGAG
23	rp-StPPP1	<u>CGCGGCCG</u> CGTAAGGCACAGGAAGAGC
24	fp-PvHAD1	<u>GCATATG</u> TCTGAAATTGTT
25	rp-PvHAD1	<u>GCTCGAG</u> TGGTCTAACTGGGAG

26	fp-PvPS2	<b><u>GCATATG</u></b> TCTGGAATCGTGGTT
27	rp-PvPS2	<b><u>GCTCGAG</u></b> TGGGCGAAGTGTAG
28	f-OsACP1	<b><u>GCATATG</u></b> GCCGGGATCGTGGTG
29	r-OsACP1	<b><u>CGCGGCCGCG</u></b> TTCTTGATCCG
30	pJ_1.2for	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
31	pJ_1.2rev	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
32	T 7 Promoter	TAATACGACTCACTATAGG
33	T 7 Terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
34	LBa1	TGG TTC ACG TAG TGG GCC ATC G
35	WiscDsLox	CAT AAT AAT GTG TGA GTA GTT CCC
36	GABI	CGC TCA TAA ATA CGA CGG ATC

(\*) Die Basen, welche für Restriktionsschnittstellen kodieren, sind fett gedruckt und unterstrichen.

### 5.1.6 Bakterienkulturen

**Tabelle 17: Verwendete Mikroorganismen**

Mikroorganismen	Beschreibung	Quelle
<i>E. coli</i> DH5 $\alpha$	<i>supE44, lac, U169 <math>\lambda</math></i> ( $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15), <i>hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i>	Bethesda Research Laboratories (MD, U.S.A)
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	<i>F, ompT, hsdS (r<sub>BMB</sub>), gal, dcm<math>\lambda</math>(DE3)</i>	Stratagene Corporation (La Jolla, California, U.S.A)
<i>E. coli</i> TOP10	<i>F, mcrA <math>\Delta</math>(mrr-hsdRMS-mcrBC)</i> $\Phi$ 80 <i>lacZ</i> $\Delta$ M15 $\Delta$ <i>lacX74 recA1 araD139<math>\Delta</math> (araleu)7697 gal/U gal/K rpsL (Str<sup>R</sup>) endA1 nupG</i>	Invitrogen Corporation (Carlsbad)
<i>A. tumefaciens</i> GV3101	C58; Ti-Plasmid: pMP90 (pTiC58 $\Delta$ T-DNA)	Van Larebeke <i>et al.</i> , 1974

### 5.1.7 Antibiotika

**Tabelle 18: Verwendete Antibiotika**

Substanz	Konzentration/Medium	Hersteller
Ampicillin	100 $\mu$ g/ml	Carl Roth GmbH
Chloramphenicol	30 $\mu$ g/ml	Duchefa
Hygromycin	100 $\mu$ g/ml	Duchefa
Kanamycin	50 $\mu$ g/ml	Applichem
Rifampicin	50 $\mu$ g/ml	Duchefa

### 5.1.8 Antikörper

**Tabelle 19: Verwendete Antikörper**

Substanz	Stammlösung AK-Konzentration	Endvolumen (in TBS)	AK-Konzentration	Hersteller
anti-His Maus	3 µg/15µl	1µl/ml	200 ng/µl	Quiagen
anti-c-myc Maus	1 µg/µl	25 µl/25 ml	1 ng/µl	MobiTec
Ziege-anti Maus	5 µg/ml	0,625µl/25 ml	3,13 ng/µl	Sigma-Aldrich

### 5.1.9 Kommerziell erworbener gentechnisch veränderter Arabidopsis-Samen

**Tabelle 20: Verwendeter Samen der Mutantenlinien**

GABI-Kat350A04 (AtGABI, <i>atpecp1-1</i> )
WiscDsLox341C04 (AtWisconsin, <i>atpecp1-2</i> )
SALK_144195.56.00 ( AtSALK, <i>atpecp1-3</i> )

## 5.2 Allgemein angewandte Methoden

Alle verwendeten Kultivierungsmedien, mit Ausnahme der Hoagland Medien II, wurden durch Autoklavieren (20 min, 120°C) sterilisiert. Die Antibiotika wurden vor Verwendung oder nach der Abkühlung auf < 40°C zugegeben. Die Lagerung der Hoagland Medien II erfolgte bei 4 °C.

### 5.2.1 Kultivierung von E. coli Bakterien

Die Kultivierung der E. coli Bakterien erfolgte in LB-Flüssig-Medium, SOC-Medium sowie auf LB-Agar-Platten (Sambrook et al. 1989). Die Selektion der Klone mit dem entsprechenden Resistenzgen erfolgte unter Zusatz der Antibiotika Kanamycin (50 µg/ml) und Ampicillin (100 µg/ml). In jeweils 5 ml LB-Flüssig-Medium wurden etwa 0,1µL Bakterien überführt und über Nacht bei 37°C, 220 rpm geschüttelt. Am Folgetage wurden 500 ml dieser Vorkultur in Roti®Store-Gefäße überführt, der Überstand entnommen und bei -80°C gelagert. Die Bakterienkulturen, die nach DNA-Transformationen auf LB-Agar-Platten ausgestrichen wurden, bei 37°C über Nacht wuchsen und positive Klone enthielten, wurden erneut auf Selektionsplatten vereinzelt und gesichert.

#### Puffer & Lösungen

LB-Medium pH 7.0: 1 % (w/v) Trypton/Pepton aus Casein, 1 % (w/v) NaCl, 0.5 % (w/v) Hefeextrakt

LB-Platten: LB-Medium, 1,5 % (w/v) Agar

SOC-Medium pH 7.0: 2 % (w/v) Trypton/Pepton aus Casein, 0.5 % (w/v) Hefeextrakt, 0,4 % (w/v) Glucose, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>

### 5.2.2 Induktion und Ernte der Bakterienkultur

Entsprechend der Kultivierungsbedingung (5.2.1) wurde  $1/20$  einer Bakterien-Vorkultur in LB-Flüssig-Medium überführt und bei 37°C, 220 rpm bis zu einer OD von 1 geschüttelt. Danach erfolgte die Induktion mit entsprechender IPTG-Konzentration. Diese war abhängig von den optimalen Bedingungen zur löslichen Proteinsynthese und wurde vorher spezifisch für jedes Protein getestet. Die Ernte der Bakterien Hauptkultur erfolgte nach 4 Stunden durch Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 min.

### 5.2.3 Zellaufschluss der *E. coli* Bakterien

Die Bakterienzellen wurden mit Hilfe einer Ultraschallsonde aufgeschlossen. Dazu wurden Impulse von 5 x 30s, 20% Amplitude pro Bakterien-Pellet ausgesandt. Die Zelltrümmer wurden anschließend durch Zentrifugation bei 15.000 rpm (15 min) sedimentiert. Die Lagerung des gewonnenen Rohextraktes erfolgte bei 4°C.

### 5.2.4 Gerichtete pENTRTM/D-TOPO® Klonierung mittels *E. coli* TOP10

Als universelle Klonierungsmethode zur Generierung des Überexpressions-Zielvektors pGWB20, welcher einen 10fachen myc-tag enthält (Nakagawa *et al.*, 2007), wurde das Gateway® System von Invitrogen Corporation gewählt. Nach der TOPO® Klonierungsreaktion mit blunt-end Produkten, erfolgte die Transformation in die One Shot® chemisch kompetenten *E. coli* TOP10 Bakterien. Zur Selektion der positiven Klone wurden Kanamycin/Hygromycin-LB-Platten und Chloramphenicol-LB-Platten eingesetzt.

### 5.2.5 Submerse Anzucht von Arabidopsis-Keimlingen

Zur Gewinnung von 9 Tage alten Pflanzen-Keimlingen wurden sterile 250 ml Kolben mit jeweils 30 ml Flüssigmedium unterschiedlichster P<sub>i</sub>-Konzentration befüllt und 2.5 – 3.0 mg sterile Samen hinzugegeben. Die Kultivierung erfolgte bei Dauerlicht, 22 °C, 30 rpm (1. – 4. Tag) und 80 rpm (5. – 9. Tag). Nach jeweils dem 7. und 8. Tag wurden die entsprechenden Medien erneuert bzw. durch Phosphat freies Medium ersetzt. Die Keimlinge wurden am 9. Tag geerntet, indem sie mit ddH<sub>2</sub>O abgespült, gewogen, portioniert in flüssigen N<sub>2</sub> schockgefroren und anschließend bei –80 °C gelagert wurden.

#### Puffer & Lösungen

*A. thaliana* (+Pi) u. (-Pi)-Medium:

3 mM Phosphatpuffer pH 5.8, 3 mM MES pH 5.8,  
20 ml Spurenelemente-Lösung 1\* pro Liter  
0.5 % (w/v) Saccharose, 10 mM Glutamin,  
4 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM KNO<sub>3</sub>, 2 mM KSO<sub>4</sub>,  
1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>

*A. thaliana* Medium ohne (Pi):

3 mM MES pH 5.8, 28 mM KCl,  
20 ml Spurenelemente-Lösung 1\* pro Liter  
0.5 % (w/v) Saccharose, 10 mM Glutamin,  
4 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM KNO<sub>3</sub>, 2 mM KSO<sub>4</sub>,  
1 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>

*Spurenelemente-Lösung 1: (50fach)	60 $\mu\text{M}$ $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 40 $\mu\text{M}$ EDTA, 14 $\mu\text{M}$ $\text{MnSO}_4$ , 1 $\mu\text{M}$ $\text{ZnSO}_4$ , 0.6 $\mu\text{M}$ $\text{CuSO}_4$ , 0.4 $\mu\text{M}$ $\text{NiSO}_4$ , 0.3 $\mu\text{M}$ $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 20 nM $\text{CoCl}_2$
---------------------------------------	--

### 5.2.6 Anzucht von Bohnenpflanzen

Der vom Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung (IPK) Gatersleben zur Verfügung gestellte Bohnensamen (*Phaseolus vulgaris L. subsp. vulgaris var. nanus Asch.*, Redland Greenleaf B', PHA 6019) wurden zwischen sterile Filterpapierblättchen mit phosphatreicher und phosphatarmer Hoagland II-Nährlösung gelegt. Die Keimung erfolgte im Dunkeln bei 28 °C. Danach wuchsen die Keimlinge in Gläsern mit sterilem Vermiculit® und entsprechender Nährlösung bei 28 °C und 12 h Licht/12 h Dunkelheit an und wurden täglich mit Wasser gegossen. Die Blätter, Stängel und Wurzelteile der 14 Tage alten Pflanzen wurden geerntet, portioniert, gewogen, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

#### Puffer & Lösungen

(+Pi) - Hoagland Nährlösung II:	3 mM $\text{KNO}_3$ , 2 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ , 1 mM $\text{MgSO}_4$ , 0.5 mM $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ , 0.18 $\mu\text{M}$ $\text{FeSO}_4$ , 0.16 $\mu\text{M}$ EDTA, 20 ml Spurenelemente-Lösung 2* pro Liter
(-Pi) - Hoagland Medium II:	gleiche Zusammensetzung wie (+Pi) – Hoagland Nährlösung II, anstelle des $(\text{NH}_4)_2\text{H}_2\text{PO}_4$ wurde 0.5 mM $\text{NH}_4\text{NO}_3$ eingesetzt
*Spurenelemente-Lösung 2: (50fach)	23 mM $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 7 mM $\text{MnCl}$ , 0.38 mM $\text{ZnSO}_4$ , 0.25 mM $\text{Na}_2\text{MoO}_4$ , 0.16 mM $\text{CuSO}_4$

### 5.2.7 Ernte von Reispflanzen

Die Ernte der sechs Wochen alten Reispflanzen (*Oryza sativa japonica group*) erfolgte nach Übergabe vom Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie, Abteilung Stoff- und Zellbiologie, PD Dr. Michael Walter. Alle Pflanzen wuchsen unter verschiedenen  $\text{P}_i$ -Konzentrationen (0 %, 4 %, 20 % und 100 %) an. Die Pflanzen wurden in Blatt-, Stängel- und Wurzelteile portioniert, gewogen, in flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

## 5.3 DNA molekularbiologische Methoden

### 5.3.1 Plasmidpräparation aus *E. coli*

Die Isolierung von Plasmid DNA erfolgte aus einer Bakterien-Vorkultur (5.2.2). Die Aufreinigung der Plasmide erfolgte mit Fermentas *GeneJETTM Plasmid Miniprep-Kit*, nach dem Standardprotokoll. Die DNA Quantifizierung und Reinheitskontrolle erfolgte spektroskopisch bei Wellenlängen von 260nm und 280nm. Nach jeder Präparation wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (5.3.5) zur Analyse der gewonnenen Plasmide durchgeführt. Für nachfolgende Analysen konnte die gereinigte Plasmid-DNA in *E. coli* retransformiert und erneut isoliert werden.

### 5.3.2 Ligation von DNA-Fragmenten in Vektorsysteme

Die Verknüpfung von DNA-Fragmenten mit Vektor-DNA erfolgte durch eine Ligation mittels T4-DNA-Ligase. Um die intra- und intermolekulare Ligation des Vektors zu reduzieren, wurden die DNA-Fragmente in dreifachen Überschuss im Vergleich zur Vektor-DNA eingesetzt (I). Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C oder für 30 min bei Raumtemperatur (nach dem *CloneJET<sup>TM</sup> PCR cloning Kit* Standard-Protokoll).

$$(I) \quad \frac{3 \times \text{Masse [ng]} (\text{Vektor})^* \times \text{Fragment Länge (bp)}}{\text{Vektorlänge (bp)}}$$

Die 20 µl Ansätze enthielten folgende Komponenten: 10x T4 DNA-Reaktionspuffer, ATP, PCR-Amplifikat, Vektor-DNA, ddH<sub>2</sub>O und T4-DNA-Ligase (5U/µl). \*(Standard-Vektormenge betrug 50 ng)

### 5.3.3 Transformation von Plasmid-DNA

Die Transformation der Plasmid-DNA in chemisch kompetente *E. coli* Zellen erfolgte mittels Hitzeschock. Dabei wurden zuerst 1 µl Plasmid bzw. 2.5 µl des Ligationsansatzes mit 50 µl *E. coli* DH5α-Zellen vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 50s bei 42°C. Der Ansatz wurde 2 min im Eis abgekühlt, mit 450 µl SOC-Medium versetzt und 1 h unter Schütteln bei 37°C kultiviert. Es folgte die Ausplattierung auf LB-Agarplatten mit entsprechendem Antibiotikum zur Selektion der Klone und die Inkubation über Nacht bei 37°C. Die Transformation in *A. tumefaciens* erfolgte nach der Methode nach Höfgen & Willmitzer (1988), nach dem Standardprotokoll.

### 5.3.4 Standard-Polymerasekettenreaktionen (PCR)

Die Amplifizierung von DNA-Fragmenten erfolgte unter Verwendung rekombinanter *Pfu*- und *Taq*-DNA Polymerasen nach Standardprotokollen. Die verwendeten *Primer*sequenzen sind unter 5.1.4 aufgeführt. Eine durchgeführte Methode zur Gewinnung von Amplifikaten mittels PCR unter Einsatz einer *Phusion<sup>TM</sup> High Fidelity DNA Polymerase* ist in Tabelle 21 dargestellt. Bei der Kolonie-PCR wurde anstelle von gereinigter DNA 20µl Bakteriensuspension eingesetzt, welche vorher 5' bei 95 °C gekocht wurde. Die entsprechende Wassermenge wurde im Reaktionsansatz reduziert.

**Tabelle 21: PCR-Ansatz und PCR-Amplifikationsschritte**

Reaktionsansatz	(50 µl)	Amplifikationsschritte	(min)	(°C)
7.5 ng <i>Template</i> -DNA	1.0 µl	1. Initiale Denaturierung (1 x)	0.5	98
<i>Primer forward</i> (10 µM)	2.4 µl	2. Amplifikation (35 x)		
<i>Primer reverse</i> (10 µM)	2.5 µl	2.1 Denaturierung	0.1	98
5 x HF <i>Phusion</i> Puffer	10.0 µl	2.2 <i>Annealing</i>	0.6	60
10 mM dNTPs	1.0 µl	2.3 <i>Elongation</i>	0.5	62
<i>Phusion HF Polymerase</i>	0.5 µl	3. <i>final Elongation</i> (1x)	5.0	72
ddH <sub>2</sub> O	32.6 µl	4. Ende	∞	4

### 5.3.5 Quantitative *Real-Time* RT-PCR (qRT-PCR)

Die *Real-Time* RT-PCR Studien wurden mit dem Gerät *iCycler iQ Real Time PCR*-Detektionssystem von BioRad Laboratories GmbH durchgeführt. Zuerst wurde die RNA nach dem Protokoll 5.4.1 aus Pflanzenmaterial isoliert. Die Synthese der cDNA erfolgte nach dem Protokoll 5.4.2. Die gewonnene cDNA diente als *Template*. Als Referenzgen wurde das *House-keeping-Gen Ubiquitin* gewählt (*Primer* UBi-f, UBi-rr). Als *forward-Primer* diente der At1(qRT-PCR)f und als *reverse-Primer* der At1(qRT-PCR)r. Es wurde nach Standardprotokoll gearbeitet. Der Amplifikationsschritt wurde 30-45fach wiederholt. In dieser Phase konnte nach dem 3. Stopp Daten abgerufen und der Verlauf der *Real-Time-PCR* überprüft werden. Diese Methode wurde durch Daniela Ditfe in der Arbeitsgruppe durchgeführt.

### 5.3.6 Semiquantitative-PCR (sq-PCR)

Für eine Transkriptmengen-Analyse der zu untersuchenden Gene aus Pflanzen wurde eine semiquantitative *PCR* unter Einsatz sequenzspezifischer *Primer* und mit einer *Taq-DNA Polymerase* durchgeführt. Als Ladekontrolle wurden *Primer* für das *housekeeping-Gen Ubiquitin* eingesetzt.

### 5.3.7 Agarose-Gelelektrophorese

Die durch die Plasmidpräparation gewonnene Vektor-DNA sowie die amplifizierten DNA-Fragmente nach den *PCR*-Reaktionen, konnten mittels verschieden konzentrierter Agarosegele (0.5 - 2 % Agarose) elektrophoretisch aufgetrennt werden. Durch Zusatz von 0.005 % Ethidiumbromid in 1 x TAE-Puffer erfolgte im Anschluss daran die Detektion der im Gel aufgetrennten DNA-Banden mittels UV-Licht. Zum Größenvergleich dienten Marker von Fermentas und BioLabs (5.1.3). Die zu analysierenden Proben wurden mit  $\frac{1}{5}$  6x Ladepuffer versetzt.

#### Puffer & Lösungen

1 x TAE-Puffer: 40 mM Tris/Acetate, 1.14 ml/l Eisessig, 1 mM EDTA pH 8.0

6 x Ladepuffer: 0.25 % (w/v) Bromphenolblau, 0.25 % (w/v) Xylenecyanol FF, 40 % (w/v) Saccharoselösung

### 5.3.8 Restriktionsverdau von DNA

Die Gewinnung von DNA-Fragmenten und der Verdau von Vektor-DNA erfolgte durch den Einsatz von Restriktionsenzymen von Fermentas (5.1.3). Dabei wurden 10 ng/ $\mu$ l DNA mit 5 U/ $\mu$ l Enzym geschnitten. Der Ansatz wurde 1 h bei 37°C inkubiert. Zur Fällung wurden  $\frac{1}{10}$  einer 3 M Natriumacetat-Lösung (pH 5.2) und 2.5 Vol. 99,8 % (v/v) Ethanol eingesetzt. Zentrifugationsschritte (10 min, 13.000 rpm, RT) und Waschschrte mit 70%igem Ethanol schlossen sich an. Nach dem 10-minütigen Trocknen des DNA-Pellets wurde dieses in 20  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 5.3.9 DNA-Aufreinigung aus dem Gel

Die Isolierung und die Aufreinigung der durch die Agarose-Gelelektrophorese getrennten DNA-Banden erfolgten nach dem Standard-Protokoll des *High Pure PCR Product Purification Kits* von Roche Diagnostics. Abweichend zu diesem Protokoll wurde anstelle von Elutionspuffer mit sterilem ddH<sub>2</sub>O eluiert, um die Ionenkonzentration der Probe möglichst gering zu halten.

### 5.3.10 Isolierung genomischer DNA aus Arabidopsis-Blättern

Nach Pulverisierung von 70 – 100 mg gefrorenen Blattmaterials in flüssigen Stickstoff wurde die Probe mit 1330 µl vorgewärmten (65 °C) Extraktionspuffer vermischt und 15 Minuten bei 65 °C erhitzt, wobei mehrmals invertiert wurde. Nach 1-minütigem Abkühlen der Suspension wurde 650 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) zugegeben und das Gemisch fünf Minuten leicht geschüttelt. Nach einer Zentrifugation (2 min, 13.000 rpm, RT) wird die Oberphase in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Danach wurde 10 µg/µl RNase dazugeben. Die Inkubation der RNase erfolgte 10 Minuten bei 37 °C. Anschließend wurde zur Fällung (2 min, RT) 700 µl Isopropanol dazugeben, mehrmals invertiert und erneut zentrifugiert (2 min, 13.000 rpm, RT). Das gewonnene DNA-Pellet wurde mit 1 ml 70 %igem EtOH für 5 min gewaschen. Der Überstand wurde sorgfältig abgenommen, das Pellet in der *speed vac* ~ 5 min bei 45 °C getrocknet und danach in 100 µl sterilem ddH<sub>2</sub>O gelöst. Die Quantifizierung der DNA-Konzentration erfolgte photometrisch durch Messung der Absorption bei 260nm. Bis zur weiteren Verwendung wurde die DNA bei –20 °C gelagert.

#### Puffer & Lösungen

Extraktionspuffer: 100 mM Tris/HCl pH 8,0, 700 mM NaCl, 50 mM EDTA

### 5.3.11 Bestimmung der Kopienzahl der T-DNA Insertionen

Um die Anzahl der T-DNA Insertionen der Mutantenlinien zu bestimmen, wurde genomische DNA aus jungen Arabidopsis-Blättern isoliert (Doyle & Doyle, 1990). Das Zerschneiden von 10 µg genomischer DNA erfolgte mit den 10 U *Hind*III über Nacht bei 37 °C. Am Morgen danach wurde mit zusätzlich 10 U Enzym/Ansatz für weitere 3 h geschnitten. Anschließend wurden die Ansätze gefällt und das Pellet mit EtOH gewaschen. Nach dem Trocknen der DNA-Fragmente wurden diese in 20 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Eine Agarose-Gelelektrophorese (5.3.7) trennte die Fragmente nach Größe. In einem alkalischen, aufwärts gerichteten Kapillartransfer wurde die DNA 10 Stunden auf eine „Biodyne B/Plus“-Membran (Pall Gelman Laboratory GmbH, Dreieich) übertragen. Nach dem DNA-Transfer wurde die Membran im Stratalinker (Stratagene, La Jolla, California, U.S.A) mit UV-Licht bestrahlt. Nach einer Prähybridisierung der Membran mit Hybridisierungslösung erfolgte die Hybridisierung mit einer α-[<sup>32</sup>P]-dCTP markierten DNA-Sonde über Nacht. Die Herstellung der DNA-Sonde erfolgte mittels *DecaLabel*<sup>TM</sup> *DNA Labeling Kit* (5.3.1) nach Standardprotokoll. Es wurden 60 µCi α-[<sup>32</sup>P]-dCTP eingesetzt. Über *ProbeQuant*<sup>TM</sup> *G-50 Micro* Säulen (GE Healthcare Freiburg) konnten die nicht eingebauten Nukleotide entfernt werden. Der Hybridisierung folgten mehrere Waschschrte. Die Membran wurde in Saran<sup>TM</sup>-Folie (Dow Deutschland, Inc., Schwalbach) verpackt und in eine *Imager*-Kassette überführt. Die Detektion erfolgte mit dem *Phospho-Imager* (BIO-IMAGING ANALYZER BAS1500, Fuji Photo Film Co Ltd, Japan).

#### Puffer & Lösungen

Transferpuffer: 0,4 NaOH, 1 M NaCl

Neutralisierungspuffer: 0,5 M Tris pH 7,8, 1 M NaCl

20 x SSC-Lösung: 0,34 M Trinatriumcitrat · 2H<sub>2</sub>O, 3 M NaCl (pH ~ 7,8)

50 x Denhardts-Lösung: 1 % Ficoll, 1 % PVP, 1 % BSA

Hybridisierungslösung: 5x Denhardts, 0.5 % SDS, 5x SSC, 100 µg/ml Heringssperma-DNA

### 5.3.12 Genotypisierung der T-DNA-Insertionslinien

Zur Überprüfung der erfolgreichen Insertion der T-DNA in die kodierende Sequenz des Gens *AtPECP1* wurde eine Genotypisierung mittels *PCR* durchgeführt. Mit spezifischen *Primer*-Kombinationen (Tab.7) wurde getestet, ob in den Mutantenlinien *atpecp1-1*, *-2* u. *-3*, die T-DNA Insertion in beiden Allelen des Gens vorlag. Zur Bestimmung des genauen Integrationsortes der T-DNA erfolgte anschließend eine Sequenzierung (5.3.13) des DNA-Materials.

### 5.3.13 Sequenzierung von DNA-Material

Die Sequenzierungen der Plasmide bzw. der Klonierungsprodukte übernahm in Dienstleistung die Firma Eurofins MWG GmbH, Anzinger Straße 7a, D-85560 Ebersberg.

### 5.3.14 Sequenzanalysen mit Hilfe von Datenbanken

Für die Bereitstellung von Datenmaterial und für die Durchführung von Sequenzanalysen wurden folgende Datenbanken genutzt:

BRENDA	( <a href="http://www.brenda-enzymes.org/index.php4">http://www.brenda-enzymes.org/index.php4</a> )
ClustalW2	( <a href="http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/">http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/</a> )
EMBL-EBI	( <a href="http://www.ebi.ac.uk/">http://www.ebi.ac.uk/</a> )
ExPASy Bioinformatics Resources Portal	( <a href="http://www.expasy.ch/tools/">http://www.expasy.ch/tools/</a> )
Interpro-Datenbank	( <a href="http://www.ebi.ac.uk/interpro/">http://www.ebi.ac.uk/interpro/</a> )
NCBI	( <a href="http://www.ncbi.nih.gov/">http://www.ncbi.nih.gov/</a> )
PHYLIP	( <a href="http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html">http://evolution.genetics.washington.edu/phylip.html</a> )
Proteus Structure Prediction Server	( <a href="http://web.expasy.org/protparam/">http://web.expasy.org/protparam/</a> )
SALK Institut für genomische Analysen	( <a href="http://signal.salk.edu">http://signal.salk.edu</a> )
SignalP3.0	( <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/">http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-3.0/</a> )
TAIR	( <a href="http://www.arabidopsis.org/">http://www.arabidopsis.org/</a> )

## 5.4 RNA molekularbiologische Methoden

### 5.4.1 Isolation von RNA aus Pflanzen

Die Gewinnung von RNA aus Pflanzen erfolgte durch das Mörsern von Frostmaterial in flüssigem Stickstoff. Anschließend wurde mit dem Nucleo Spin® RNA Kit von Machery & Nagel nach Herstellerprotokoll gearbeitet. Die Quantifizierung erfolgte zum einen mittels Agarose-Gelelektrophorese (5.3.5) und zum anderen mittels Spektrometer bei einer Wellenlänge von 260nm /280nm. Zur Entfernung von DNA wurden die isolierten RNA Proben mit 1U/µL DNaseI RNase free

und 40 U/ $\mu$ L RiboLock<sup>TM</sup> Ribonuclease-Inhibitor laut Standardprotokoll behandelt und erneut spektroskopisch quantifiziert. Der Ansatz wurde bei 37 °C, 1 h inkubiert und mit 25 mM EDTA versetzt und zur Deaktivierung weitere 10 min bei 65 °C inkubiert.

#### Puffer & Lösungen

Reaktionsansatz (80  $\mu$ L): RNA Isolierung 60  $\mu$ L, 10 x DNaseI-Puffer 8  $\mu$ L, 40 U/ $\mu$ L Ribolock 2  $\mu$ L, RNase-freies ddH<sub>2</sub>O 2  $\mu$ L, 1 U/ $\mu$ L DNaseI 8  $\mu$ L

### 5.4.2 cDNA Synthese mit Hilfe der *Reversen Transkriptase*

Die isolierten RNA Proben aus Pflanzenmaterial dienten als *Template* zur Herstellung von *copy* (c) DNA-Strängen. Mit Hilfe des *RevertAid<sup>TM</sup>H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit* von Fermentas konnte die cDNA nach dem Herstellerprotokoll synthetisiert werden. Es wurden bei jeder neuen Synthese zur Quantifizierung stets gleiche Mengen an RNA eingesetzt (0.8 – 2  $\mu$ g RNA). Die erhaltene cDNA wurde portioniert à 2  $\mu$ L bei –80 °C eingefroren.

## 5.5 Proteinchemische Methoden

### 5.5.1 Heterologe Expression und Reinigung der rekombinanten Proteine

Die Plasmide für die rekombinante Proteinproduktion wurde über Transformation (5.3.3) in *E. coli* BL21 (DE3) eingebracht. Nach dem Anwachsen einer Hauptkultur in 4 x 200 ml LB-Medium bis zu einer OD von 1, wurde mit variabler IPTG-Konzentration (Tab. 11) induziert. Nach Induktion erfolgte die Proteinproduktion bei verschiedenen Kultivierungstemperaturen (Tab. 11). Die Kulturen wurden nach 4 h geerntet und aufgeschlossen (5.2.2). Nach Zentrifugation bei 15.000 g, 15 min, 4 °C wurde der geklärte Zellextrakt auf eine aktivierte Ni<sup>2+</sup>-Sephrose Säule gepumpt, die vorher mit 40 ml Äkta-Bindungspuffer equilibriert wurde. Nach dem Waschschrift konnte mittels einem linearen Imidazol-Gradienten (0.02 – 0.08 M) das rekombinante Protein bei etwa 0.05 M Imidazol von der Säule eluiert werden. Die Proteinfractionen wurden anschließend dialysiert. Bevor das Protein in flüssigen Stickstoff schockgefroren, portioniert und anschließend bei –80 °C gelagert.

#### Puffer & Lösungen

Äkta-Bindungspuffer: 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 350 mM NaCl, 20 mM Imidazol, 0.2 % (v/v) IGEPAL630  
Äkta-Elutionsspuffer: 10 mM Tris/HCl pH 8.0, 350 mM NaCl, 800 mM Imidazol, 0.2 % (v/v) IGEPAL630

### 5.5.2 SDS-PAGE, Western Blot und MALDI-TOF Massenspektrometrie

Zum Nachweis des rekombinanten Proteins wurden jeweils 20  $\mu$ L Probe mit 20  $\mu$ L SDS-Probenpuffer gemischt, für 5 Minuten gekocht und im 15 %igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Gele wurden entweder mit Coomassie Blue gefärbt oder die Proteine auf eine Nitrozellulosemembran überführt (1.5 h, 1-5 V). Die Immundetektion erfolgte nach Standardprozedur des ECL Western Blotting Substrate Kit. Eine 1:2000 verwendete Primärantikörperlösung einhielt einen in Maus produzierten anti-His Antikörper. Die nachfolgende Inkubation mit einem sekundären Antikörper erfolgte mit einem in Ziege produzierten anti-Maus Antikörper in einer 1:40.000 verdünnten Lösung. Anschließende Analy-

sen mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie bestätigten die rekombinanten Proteine. Diese Analysen wurden in Zusammenarbeit mit dem Institut für Biochemie und Biotechnologie der MLU Halle-Wittenberg, Frau Dr. Schierhorn, durchgeführt. Der Nachweis der AtPECP1 in Pflanzenextrakten erfolgte mit dem primären anti-cmyc Antikörper in einer 1:1000 Lösung. Als sekundärer Antikörper diente der Ziege-Anti-Maus Antikörper in einer 1:40.000 verdünnten Lösung.

#### Puffer & Lösungen für die SDS-PAGE

Sammelgelpuffer:	1.25 M Tris/HCl pH 6.8,
Trenngelpuffer:	1.80 M Tris/HCl pH 8.8
APS-Lösung:	100 mg APS in 1000 µl ddH <sub>2</sub> O
SDS-PAGE-Probenpuffer (2fach):	1.25 M Tris/HCl pH 6.8, 10 %, Glycerin, 5 % SDS 5 % β-Mercaptoethanol, 0.05 % Bromphenolblau
SDS-PAGE Laufpuffer (10fach):	250 mM Tris/HCl, 1.9 M Glycin, 1.0 % SDS
Coomassie-Färbelösung:	0.20 % Coomassie R250, 0.05 % Coomassie G250, 10 % Essigsäure, 30% Methanol, 17.5 % Ethanol
Entfärbelösung für Coomassie:	45 % Ethanol, 10 % Essigsäure

#### Puffer & Lösungen für den Western Blot

Transferpuffer:	25 mM Tris/HCl, 192 mM Glycin, 20 % MeOH, 0.1 % SDS
Ponceau S-Färbelösung:	1 % Eisessig, 0.5 % Ponceau S
TBS (10fach):	50 mM Tris/l, 150 mM NaCl/l
TBST:	TBS (1fach), 0.2 % Tween 20
Blockierungsreagenz:	4 g Magermilchpulver in 50 ml 1fach TBS

### 5.5.3 Proteinextraktion aus Pflanzen

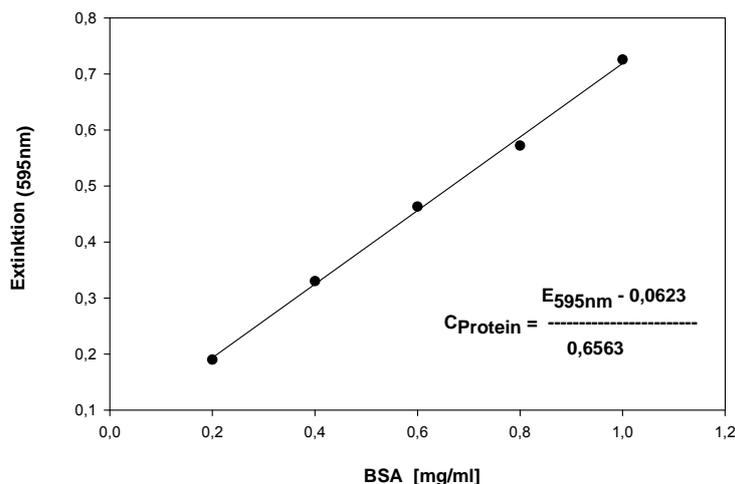
Zur Isolation der Proteine aus pflanzlichen Extrakten wurden 100 – 500 mg Material in flüssigen N<sub>2</sub> gemörsert, mit einer 3fachen Menge an Extraktionspuffer versetzt, 30" gevortext und anschließend bei 13.000 rpm, 10 min, bei 4 °C zentrifugiert. Nach Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß wurde erneut zu gleichen Bedingungen 5 min zentrifugiert, um die restlichen Partikel des Zellgewebes zu pelletieren. Nach Überführung des Überstandes in ein neues Reaktionsgefäß wurde erneut zu gleichen Bedingungen 5 min zentrifugiert, um die restlichen Partikel des Zellgewebes zu pelletieren.

#### Puffer & Lösungen

Pflanzenextraktionspuffer:	50 mM Hepes/NaOH pH 7.5, 50 mM MgCl <sub>2</sub> , 10 mM EDTA, 2 mM DTT
----------------------------	---

### 5.5.4 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford (1976), wurde das Roti<sup>®</sup>Quant-Reagenz nach dem Standardprotokoll verwendet. Die Roti<sup>®</sup>Quant Lösung wurde mit ddH<sub>2</sub>O 1:5 verdünnt und anschließend (gefiltert) in eine reduzierte Einmalküvette überführt. Ab der Zugabe von 20µl Probe, Verdünnungen zwischen 1:4 und 1:5 mit dem Pflanzenextraktionspuffer, erfolgte nach kurzem invertieren eine Inkubation von 20 min. Anschließend wurde die Extinktion der Probenlösung bei einer Wellenlänge von 595nm bestimmt und anhand einer mit BSA erstellten Kalibriergerade (Abb. 40) die Proteinkonzentration ( $c_{\text{Protein}}$ ) berechnet.



**Abbildung 40: Kalibriergeraden zur Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe der Methode von Bradford, 1976.**

### 5.5.5 Enzymaktivitätstests

Die Quantifizierung der Phosphatase-Aktivität erfolgte anhand der  $P_i$ -Freisetzung während der enzymatischen Reaktion. Hierzu wurde die Zunahme der Phosphatkonzentration diskontinuierlich vermessen. Der Nachweis des  $P_i$  erfolgte durch Komplexbildung mit Ammoniumheptamolybdat, welche in saurer wässriger Lösung in einem Gleichgewicht mit Molybdat vorliegt. Die Stöchiometrie der Nachweisreaktion ist durch folgende Reaktionsgleichungen gegeben:



In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Test in zwei Varianten durchgeführt, zum einen nach der Methode von Heinonen & Lahti (1981), zum anderen nach der Methode von Zilversmit & Davis (1950).

#### Modifizierte Methode nach Heinonen & Lahti (1981)

Die Enzymreaktionen wurden bei 37 °C durchgeführt. Die Reaktionslaufzeiten betragen, je nach Substratkonzentration, von 1 bis zu 60 min. Die Ansatzvolumina betragen 1 ml. Hiervon wurden jeweils 0,1 ml entnommen und mit 0,8 ml Molybdat-Reagenz I sowie 80 µl wässriger 1 M Zitronensäure versetzt. Das saure Milieu bewirkt das Abstoppen der Enzymreaktion. Die erhaltenen Testansätze wurden 1 Minute bei RT inkubiert. Die gebildeten Phosphomolybdat-Komplexe zeigen eine Absorption bei 350nm, die an einem UV/Vis-Spektrometer (Ultrospec 3300 pro) gemessen wurde.

**Modifizierte Methode nach Zilversmit & Davis (1950)**

Die Enzymreaktionen wurden bei 37 °C durchgeführt. Die Reaktionslaufzeiten betragen, je nach Substratkonzentration, von 1 bis zu 60 min. Die Ansatzvolumina betragen 2.5 ml. Aus diesen Ansätzen wurden jeweils 0.5 ml entnommen und mit 0.5 ml 20 %iger TCA-Lösung versetzt. Hierdurch kam es zur Abstopfung der Enzymreaktion und zur Präzipitation des Proteins. Das Präzipitat wurde in einer Tischzentrifuge abzentrifugiert (20 min, 4 °C, 13.000 rpm). Der Überstand (1 ml) wurde mit 0,5 ml Molybdat-Reagenz II und mit 0.5 ml Vanadat-Reagenz vereint. Die erhaltenen Testansätze wurden 15 min bei RT inkubiert. Danach wurden deren Absorptionswerte bei 405nm an einem UV/Vis-Spektrometer (Biotech Novaspec II) bestimmt.

Kalibrierung der Testverfahren:

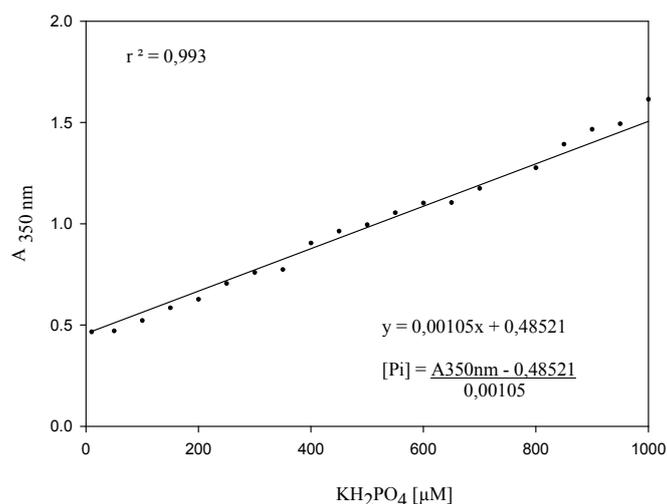
Um die nach den obigen Verfahren erhaltenen Absorptionswerte quantitativ P<sub>i</sub>-Konzentrationen zuzuordnen zu können, wurden separate Kalibrierungsmessungen durchgeführt. Dabei wurden anstelle der enzymatischen Ansätze wässrige KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Lösungen definierter P<sub>i</sub>-Konzentration eingesetzt. Die Prozedur folgte exakt dem oben beschriebenen Ablauf. Die erhaltenen Kalibrierkurven sind in den Abbildungen 39/40 dargestellt. Diese stellen zugleich die Linearität des Zusammenhangs zwischen Absorption und Phosphat-Konzentration sicher. Die somit zugänglichen Parameter aus linearen Regressionen wurden zur Bestimmung von P<sub>i</sub>-Konzentrationen im Rahmen kinetischer Untersuchungen herangezogen.

Puffer & Lösungen

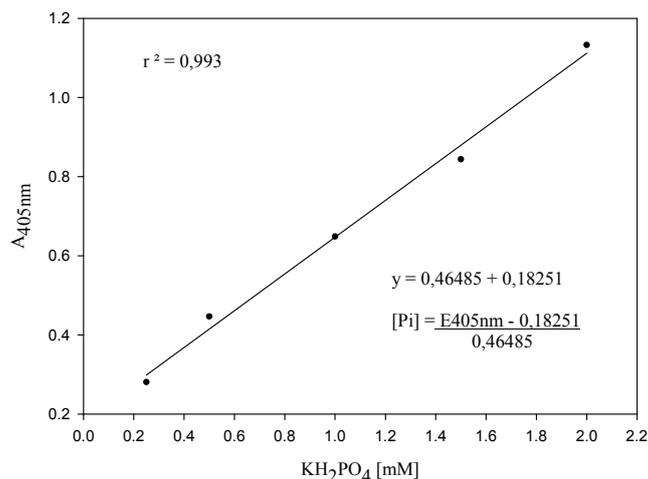
Molybdat-Reagenz I: 2.5 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4 H<sub>2</sub>O, 0.75 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3.4 M Aceton

Molybdat-Reagenz II: 40 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4 H<sub>2</sub>O, 2.5 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>

Vanadat-Reagenz: 21 mM NH<sub>4</sub>VO<sub>3</sub>, 0.28 N HNO<sub>3</sub>



**Abbildung 39: Kalibriergeraden zur Bestimmung von anorganischem Phosphat mit Hilfe der Methode nach Heinonen & Lahti, 1981.**



**Abbildung 40: Kalibriergeraden zur Bestimmung von anorganischem Phosphat mit Hilfe der Methode nach Zilversmit & Davis (1950).**

### 5.5.6 Kinetische Charakterisierung der Phosphatase-Reaktion

#### Aufnahme der v/S-Charakteristiken

Zur Ermittlung der *steady state*-Parameter der Enzymspezies AtPECP1 und AtPECP2 wurde die Substratkonzentration systematisch variiert. Die Testansätze enthielten im Falle von AtPECP1 50 mM Tris/HCl pH 7,2, 25  $\mu\text{g/ml}$  BSA, 8 mM  $\text{MgCl}_2$ , 50  $\mu\text{g/ml}$  AtPECP1 und eine variable Substratkonzentration. Für das Substrat Phosphocholin wurde ein Konzentrationsbereich von 0,1 – 4 mM, für Phosphoethanolamin von 0,1-12 mM gewählt. Im Falle von AtPECP2 enthielten die Testansätze 100 mM HEPES/NaOH pH von 6,8, 25  $\mu\text{g/ml}$  BSA, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 17  $\mu\text{g/ml}$  AtPECP2 sowie 0,1 – 5 mM Phosphoethanolamin. Die Reaktionsgeschwindigkeit des katalytischen Umsatzes wurde anhand der  $\text{P}_i$ -Freisetzung berechnet. Die  $\text{P}_i$ -Konzentrationen wurden im Falle von AtPECP1 nach dem Verfahren von Heinonen & Lahti (1981), im Falle von AtPECP2 nach dem Verfahren von Zilversmit & Davis (1950) bestimmt. Die freigesetzte  $\text{P}_i$ -Menge wurde nach Reaktionslaufzeiten von 2, 4, 6, 8, 10, 12 und 15 min gemessen. Durch Auftragung der  $\text{P}_i$ -Konzentrationen gegen die Reaktionslaufzeit wurden diskontinuierliche Progresskurven erhalten. Für jede Substratkonzentration wurden je 3 Progresskurven erstellt. Die *steady state*-Geschwindigkeiten der enzymatischen Reaktionen wurden aus den linearen Segmenten der Progresskurve bestimmt.

#### Aufnahme der pH-Profile

Die Untersuchung zur pH-Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit der Phosphatase-Reaktion von AtPECP1 wurde der pH-Wert des Testansatzes variiert. Die Variation erfolgte im Bereich von pH 5,0 – 9,0 und erforderte den Einsatz unterschiedlicher Puffer: NaAc/Essigsäure (pH 5,0 – 6,0), HEPES/NaOH (pH 6,0-7,5), Tris/HCl (pH 7,5 -9,0). Die Testansätze enthielten außerdem 1 mM Phosphocholin, 8 mM  $\text{MgCl}_2$  und 50  $\mu\text{g/ml}$  AtPECP1. Die Phosphat-Konzentrationen erfolgten nach

Heinonen & Lahti (1981). Die erhaltenen Geschwindigkeiten wurden nach folgender Gleichung analysiert:

$$V_{\max}^{pH} = \frac{V_{\max} \cdot [H]}{K_1 + [H] + \frac{[H]^2}{K_2}} \quad (1)$$

Gleichung (1) beschreibt den Zusammenhang zwischen der pH-abhängigen Maximalgeschwindigkeit und der  $H^+$ -Konzentration ( $[H]$ ) für ein zweibasiges Enzym mit  $K_1$  als Säure-Dissoziationskonstante im basischen Segment und mit  $K_2$  als Säure-Dissoziationskonstante im sauren Segment des pH-Profiles.

### 5.5.7 Gelfiltration und nicht-denaturierende Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Bestimmung der Tertiärstruktur wurde mittels einer Superdex HR 10/30 Säule (GE Healthcare, Freiburg) eine Gelfiltration durchgeführt. Als Kalibrierung dienten Standardproteine bekannter Größe, die chromatographisch über diese Säule getrennt wurden. 1 mg gereinigtes AtPECP1 Enzym wurde in 0,5 ml Fraktionen gesammelt und auf Enzym-Aktivität getestet (4.5.4). Des Weiteren wurde das gereinigte Enzym über eine mild-denaturierende SDS-PAGE (2 % SDS im Lade- und 0,1 % im Laufpuffer) getrennt (4.5.3). Durch eine PAGE ohne SDS konnten die getesteten Gelfiltrationsfraktionen mit nachgewiesener Enzymaktivität analysiert werden.

#### Puffer & Lösungen

Gelfiltrationspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8,0, 150 mM NaCl, 1 mM DTT  
Standard-Proteine: *Low Molecular Weight Kit*, GE Healthcare, Freiburg

### 5.6 Extraktion und quantitativer Nachweis von Metaboliten

Messungen zur Bestimmung von Ethanolamin, Cholin und den jeweiligen Phosphorsäureestern wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Stangl (Professur für Humanernährung, Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Universität Halle) durchgeführt. Dafür wurden jeweils 100 mg unter flüssigem Stickstoff gemörserte Arabidopsis-Keimlinge mit 1 ml Methanol/Wasser (2:1) in einem Ultraschallbad extrahiert. Das Extraktionsmittel enthielt als interne Standards 200 nM Taurin, deuteriertes Cholin und deuteriertes Phosphocholin. Die Bestimmung von Cholin und seines Phosphorsäureesters erfolgte über HPLC-MS/MS an einem API 2000 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) in Verbindung mit einer HPLC Agilent 1100 (Agilent, Waldbronn, Deutschland) nach Koc *et al.*, 2002. Die primären Amine wurden nach Vorsäulenderivatisierung mit ortho-Phthaldialdehyd und Mercaptoethanol an einer HPLC-Anlage Agilent 1100 mit Fluoreszenzdetektor gemessen (Jones & James, 1983).

## 6. Literaturverzeichnis

- Abel S., Nürnberger T., Ahnert V., Krauss G.-J., Glund K. (2000): Induction of an extracellular cyclic nucleotide phosphodiesterase as an accessory ribonucleolytic activity during phosphate starvation of cultured tomato cells, *Plant Physiology* 122 (2), 543–552
- Abel S., Ticconi, C.A., Delatorre C.A. (2002): Phosphate sensing in higher plants, *Physiologia Plantarum* 115, 1-8
- Abel S. (2011): Phosphate sensing in root development, *Current Opinion in Plant Biology* 14, 303-309
- Adams M.A., Pate J.S. (1992): Availability of organic and inorganic forms of phosphorus to lupins (*Lupinus* spp.). *Plant Soil* 145, 107-113
- Al-Ghazi Y, Muller B, Pinloche S, Tranbarger TJ, Nacry P, Rossignol M, Tardieu F, Doumas P (2003) Temporal responses of Arabidopsis root architecture to phosphate starvation: evidence for the involvement of auxin signaling, *Plant Cell Environ* 26, 1053–1066
- Allen K. N. & Dunaway-Mariano, D. (2004): Phosphoryl group transfer: evolution of a catalytic scaffold, *Trends Biochemistry Science* 29, 495-503
- Allen K. N. & Dunaway-Mariano, D. (2009): Markers of fitness in a successful enzyme superfamily, *Current Opinion in Structural Biology* 2009, 19:658–665
- Alonso J.M., Stepanova A.N., Leisse T.J. *et al.* (2003): Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653-657.
- Andersson M.X., Stridh M.H., Larsson E.K., Liljenberg C., Sandelius A.S. (2003): Phosphate-deficient oat replaces a major portion of the plasma membrane phospholipids with the galactolipid digalactosyldiacylglycerol, *FEBS Letters* 537, 128-132
- Aung K., Lin S.I., Wu C.C., Huang Y.T., Su C.L., Chiou T.J. (2006): Pho2, a phosphate overaccumulator, is caused by a nonsense mutation in a *microRNA399* target gene, *Plant Physiology* 141, 1000–1011
- Axtell M.J., Snyder J.A., Bartel D.P. (2007): Common functions for diverse small RNAs of land plants, *The Plant Cell* 19, 1750-1769
- Baldwin J.C., Karthikeyan A., Raghothama K.G. (2001): LePS2, a phosphorus starvation-induced novel acid phosphatase from Tomato, *Plant Physiology* 125, 728-737
- Baldwin J.C., Karthikeyan A., Raghothama K.G. (2008): Biochemical and molecular analysis of LePS;1: a phosphate starvation induced protein phosphatase gene from tomato. *Planta* 228, 273-280
- Bari R., Datt Pant B., Stitt M., Scheible W.R. (2006): *PHO2*, *microRNA399*, and *PHR1* define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiology* 141: 988–999
- Beassoni P.R., Lisandro H.O., Massimelli M.J., Lisa A.T., Domenech C.E. (2006): Critical active-site residues identified by site-directed mutagenesis in *Pseudomonas aeruginosa* phosphorylcholine phosphatase, a new member of the Haloacid Dehalogenases Hydrolase Superfamily. *Current Microbiology* 53, 534-539

- Beassoni P.R., Otero L.H., Lisa A.T., Domenech C.E. (2008): Using a molecular model and kinetic experiments in the presence of divalent cations to study the active site and catalysis of *Pseudomonas aeruginosa* phosphorylcholine phosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta* 1784, 2038-2044
- BeGora M.D., Macleod M.J.R., McCarry B.E., Summers P.S., Weretilnyk E.A. (2010): Identification of phosphomethylethanolamine N-methyltransferase from *Arabidopsis* and its role in choline and phospholipid metabolism, *Journal of Biological Chemistry* 285 (38), 299147-29155
- Bosse D. & Köck M. (1998): Influence of phosphate starvation on phosphohydrolases during development to tomato seedlings, *Plant Cell Environment* 21, 325-332
- Bozzo G.G., Raghobama K.G., Plaxton W.C. (2004): Structural and kinetic properties of a novel purple acid phosphatase from phosphate-starved tomato (*Lycopersicon esculentum*) cell cultures, *Biochemistry Journal* 377, 419-428
- Braum S.M., Helmke P.A. (1995): White lupin utilizes soil phosphorus that is unavailable to soybean, *Plant Soil* 176, 95-100
- Bucher, M (2007): Functional biology of plant phosphate uptake at root and mycorrhiza interfaces, *New Phytologist* 173, 11-26
- Burroughs M.A., Allen K.N., Dunaway-Mariano D., Aravind L. (2006): Evolutionary genomics of the HAD superfamily: understanding the structural adaptations and catalytic diversity in a superfamily of phosphoesterases and allied enzymes, *Journal of Molecular Biology* 361, 1003-1034
- Bürgermeister M., Birner-Grünberger R., Nebauer R., Daum G. (2003): Contribution of different pathways to the supply of phosphatidylethanolamin and phosphatidylcholin to mitochondrial membranes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *Biochimica et Biophysica Acta* 1686, 161-168
- Bustos R., Castrillo G., Linhares F., Puga M.I., Rubio V., Pérez-Pérez J., Solano R., Leyva A., Paz-Ares J. (2010): A central regulatory system largely controls transcriptional activation and repression responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*, *PLoS Genetics*, 6 (9), 1-15
- Chiou T.J., Aung K., Lin S.I., Wu C.C., Chiang S.F., Su C.L. (2006): Regulation of phosphate homeostasis by microRNA in *Arabidopsis*, *Plant Cell* 18, 412-421
- Clough S.J. & Bent A.F. (1998): Floral-dip: a simplified method for agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*, *The Plant Journal* 16 (6), 735-743
- Cluff J.A. & Burton, G.J. (1999): *Proteins* 40, 502-511
- Collet J.F., Stroobant V., Pirard M., Delpierre G., van Schaftingen E. (1998): A new class of phosphotransferases phosphorylated on an aspartate residue in an amino-terminal DXDX(T/V) motif, *Journal of Biological Chemistry* 273, 14107-14112
- Davis A.M., Hall A., Millar A.J., Darrah C., Davis S.J. (2009): Protocol: Streamlined sub-protocols for floral-dip transformation and selection of transformants in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Methods* 5:3, doi: 10.1186/1746-4811-5-3
- Desnos T. (2008): Root branching responses to phosphate and nitrate, *Current Opinion in Plant Biology* 11, 82-87
- Devaiah B.N., Karthikeyan A.S., Raghobama K.G. (2007): WRKY75 transcription factor is a modulator of phosphate acquisition and root development in *Arabidopsis*, *Plant Physiology* 143, 1789-1801

- Diatloff E., Roberts M., Sanders D., Roberts S.K. (2004): Characterization of anion channels in the plasmamembrane of Arabidopsis epidermal root cells and the identification of a citrate-permeable channel induced by phosphate starvation, *Plant Physiology* 136, 4136–4149
- Domenech C.E., Otero L.H., Beassoni P.R., Lisa A.T., (2011): Phosphorylcholine phosphatase: a peculiar enzyme of *Pseudomonas aeruginosa*, *Enzyme Research* 2011, Article ID 561841
- Doyle J.J. & Doyle J.L. (1990): Isolation of plant DNA from fresh tissue, *Focus* 12, 13-15
- Dörmann P. & Benning C. (2002): Galactolipids rule in seed plants, *Trends Plant Science* 7, 112–118
- Duan K., Yi K.K., Dang L., Huang H.J., Wu W., Wu P. (2008): Characterization of a subfamily of Arabidopsis genes with the SPX domain reveals their diverse functions in plant tolerance to phosphorus starvation, *Plant Journal* 54, 965–975
- Duff S.M.G., Sarath G., Plaxton W.C. (1994): The role of acid phosphatases in plant phosphorus metabolism, *Physiol Plantarum* 90, 791–800.
- Emanuelsson O., Brunak S., von Heijne G., Nielsen H. (2007): Locating proteins in the cell using target, signalP and related tools, *Nature Protocols* 2, 953-971
- Essigmann B., Güler S., Narang R.A., Linke D., Benning C. (1998): Phosphate availability affects the thylakoid lipid composition and the expression of *SQDI*, a gene required for sulfolipid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*, *PNAS U.S.A* 95, 1950-1955
- Franco-Zorrilla, J.M., González, E., Bustos, R., Linhares, F., Leyva, A., Paz-Ares, J. (2004): The transcriptional control of plant responses to phosphate limitation, *Journal of Experimental Botany* 55 (396), 285-293
- Fujii H., Chiou T.J., Lin S.I., Aung K., Zhu J.K. (2005): A miRNA involved in phosphate-starvation response in Arabidopsis, *Current Biology* 15, 2038–2043
- Garrido M.N., Lisa T.A., Albelo S., Lucchesi G.I., Domenech C.E. (1990): Identification of the *Pseudomonas aeruginosa* acid phosphatase as a phosphorylcholine phosphatase activity, *Molecular and Cellular Biochemistry* 94, 89-95
- Gaude N., Nakamura Y., Scheible W.-R., Ohta H., Dörmann P. (2008): Phospholipase C5 (NPC5) is involved in galactolipid accumulation during phosphate limitation in leaves of Arabidopsis, *Plant Journal* 56, 28–39
- Gibellini F. & Smith T.K. (2010): The Kennedy pathway-de novo synthesis of phosphatidylethanolamine and phosphatidylcholine. *IUBMB Life* 62, 414-428
- Good N.E., Winget D., Winter W., Connolly T.N., Izawa S., Singh R.M.M. (1966): Hydrogen ion buffers for biological research, *Biochemistry* 5 (2), 467-477
- Gordon-Weeks R., Tong Y.P., Davies T.G.E., Leggewie G. (2003): Restricted spatial expression of a high-affinity phosphate transporter in potato roots, *Journal of Cell Science* 116, 3135–3144
- Gout E., Bligny R., Roby C., Douce R. (1990): Transport of phosphocholine in higher plant cells. <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance studies, *PNAS U. S. A.* 87 (1990), 4280–4283
- Hamburger D., Rezzonico E., MacDonald-Comber Petetot J., Somerville C., Poirier Y. (2002): Identification and characterization of the Arabidopsis *PHO1* gene involved in phosphate loading to the xylem, *Plant Cell* 14, 889–902

- Hammond J.P., Bennett M.J., Bowen H.C., *et al.* (2003): Changes in gene expression in Arabidopsis shoots during phosphate starvation and the potential for developing smart plants, *Plant Physiology* 132, 578–596
- Hammond J.P. & White P.J. (2011): Sugar signaling in root responses to low phosphorus availability, *Plant Physiology* 156, 1033-1040
- Heinonen J.K., Lahti R.J. (1981): A new and convenient colorimetric determination of inorganic orthophosphate and its application to the assay of inorganic pyrophosphatase, *Analytical Biochemistry* 113, 313-317
- Heldt H.-W. & Piechulla B. (2008): *Pflanzenbiochemie*, 4. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg
- Hernandez G., Ramirez M., Valdes-Lopez O., *et al.* (2007): Phosphorus stress in common bean: root transcript and metabolic responses. *Plant Physiology* 144: 752–767.
- Hirsch J., Marin E., Floriani M., Chiarenza S., Richaud P., Nussaume L., Thibaud M.C. (2006): Phosphate deficiency promotes modification of iron distribution in Arabidopsis plants, *Biochimie*, 88, 1767-1771
- Hruz T., Laule O., Szabo G., Wessendorp F., Bleuler S., Oertle L., Widmayer P., Grussem W., Zimmermann P. (2008): Geneinvestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes, *Advances in Bioinformatics*, Article ID 420747, 5 pages
- Houston B., Seawright E., Jefferies D., Hoogland E., Lester D., Whitehead C., Farquharson C. (1999): Identification and cloning of a novel phosphatase expressed at high levels in differentiating growth plate chondrocytes. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1448, 500-506
- Höfgen R., Willmitzer, L. (1988): Storage of competent cells for Agrobacterium transformation, *Nucleic Acids Research* 16 (20): 9877
- Huang H., Patskovsky Y., Toro R., Farelli J.D., Pandya C., Almo S.C., Allen K.N., Dunaway-Mariano D. (2011): Divergence of structure and function in the Haloacid Dehalogenase enzyme superfamily: *Bacteroides thetaiotaomicron* BT2127 is an inorganic pyrophosphatase, *Biochemistry* 50, 8937-8949
- Hur Y.J., Lee H.G., Jeon E.J., Lee Y.Y., Nam M. H., Yi G., Eun M.Y., Nam J., Lee J.H., Kim D.H. (2007): A phosphate starvation-induced acid phosphatase from *Oryza sativa*: phosphate regulation and transgenic Expression, *Biotechnology Letters* 29, 829-835
- Hurley B.A., Tran H.T., Marty N.J., Park J., Snedden W.A., Mullen R.T., Plaxton W.C. (2010): The purple acid phosphatase AtPAP26 is essential for efficient acclimation of *Arabidopsis thaliana* to nutritional phosphate deprivation. *Plant Physiology* 153, 1112–1122
- Jain A., Poling M.D., Smith A.P., Nagarajan V.K., Lahner B., Meagher R.B., Raghothama K.G. (2009): Variations in the composition of gelling agents affect morphophysiological and molecular responses to deficiencies of phosphate and other nutrients, *Plant Physiology* 150, 1033-1049
- Jain A., Nagarajan V.K., Raghothama K.G. (2012): Transcriptional regulation of phosphate acquisition by higher plants, *Cellular and Molecular Life Sciences* 69, 3207-3224
- Javot H., Pumplin N., Harrison M.J. (2007): Phosphate in the arbuscular mycorrhizal symbiosis: transport properties and regulatory roles, *Plant Cell Environment* 30, 310–322

- Jia HF., Ren HY., Gu M., Zhao JN., Sun SB., Zhang X., Chen JY., Wu P., Xu GH (2011): The phosphate transporter gene *OsPht1;8* is involved in phosphate homeostasis in rice, *Plant Physiology* 156, 1164-1175
- Jones D. (1999): *Journal Molecular Biology* 292, 195-202
- Jones B.N. & Gilligan J.P. (1983): o-Phthalaldehyde precolumn derivatization and reversed-phase high-performance liquid chromatography of polypeptide hydrolysates and physiological fluids, *Journal of Chromatography* 266, 471-482
- Jiang C.F., Gao X.H., Liao L., Harberd N.P., Fu X.D. (2007): Phosphate starvation root architecture and anthocyanin accumulation responses are modulated by the gibberellin-DELLA signaling pathway in *Arabidopsis*, *Plant Physiology* 145, 1460–1470.
- Koc *et al.* (2002): *Analytical Chemistry* 74 (8), 4734-4740
- Köck M., Löffler A., Abel S., Glund K. (1995): cDNA structure and regulatory properties of a family of starvation-induced ribonucleases from tomato, *Plant Molecular Biology* 27, 477-485
- Koonin E.V. & Tatusov R.L. (1994): Computer analysis of bacterial haloacid dehalogenases defines a large superfamily of hydrolases with diverse specificity Application of an iterative approach to database search, *Journal Molecular Biology* 244, 125–132
- Kuo H-F. & Chiou T-J. (2011): The role of microRNAs in phosphorus deficiency signaling, *Plant Physiology*, 156, 1016-1024
- Kurihara T., Liu J.-Q., Nardi-Dei V., Koshikawa H., Nobuyoshi E., Soda K. (1995): Comprehensive site-directed mutagenesis of L-2-haloacid dehalogenase to probe catalytic amino acid residues, *Journal of Biochemistry* 117, 1317–1322
- Kuznetsova E., Proudfoot M., Gonzalez C., Brown G., Omelchenko M. V., Borozan, I., Carmel L. *et al.* (2006): Genome-wide analysis of substrate-specificities of the *Escherichia coli* haloacid dehalogenase-like phosphatase family, *Journal of Biological Chemistry*, 261, 36149-36161
- Kwon Y., Si-in Yu, Lee H., Yim J.H., Zhu J-K, Lee B-h (2012): *Arabidopsis* Serine Decarboxylase mutants implicate the roles of ethanolamine in plant growth and development, *International Journal of Molecular Science* 13, 3176-3188
- Lahiri S.D., Zhang G., Dunaway-Mariano D., Allen K.N. (2002): Caught in the act: the structure of phosphorylated  $\beta$ -phosphoglucomutase from *Lactococcus lactis*, *Biochemistry* 41, 8351-8359
- Lahiri S.D., Zhang G., Dai J., Dunaway-Mariano D., Allen K.N. (2004): Analysis of the substrate specificity loop of the HAD superfamily cap domain, *Biochemistry*, 43, 2812-2820
- Landy A. (1989): Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination, *Ann. Rev., Biochemistry* 58, 913-949
- Lee S.H., Cho Y., Kim Y-J., Lho T-O., Cha S-S., Lee J-H., Kang S.G. (2009): A novel inorganic pyrophosphatase in *Thermococcus onnurineus* NA1, *FEMS Microbiology Letters* 300, 68-74
- Lee R.B. & Ratcliffe R.G. (1993): Subcellular distribution of inorganic phosphate, and levels of nucleoside triphosphate, in mature maize roots at low external phosphate concentrations: Measurements with  $^{31}\text{P}$ -NMR, *Journal of Experimental Botany* 44, 587-598
- Lin W.-Y., Lin S.-I., Chiou T.-J. (2009): Molecular regulators of phosphate homeostasis in plants, *Journal of Experimental Botany* 60 (5), 1427-1438

- Linkohr B.I., Williamson L.C., Fitter A.H., Leyser H.M. (2002): Nitrate and phosphate availability and distribution have different effects on root system architecture of *Arabidopsis*. *Plant Journal* 29, 751-760
- Liu Y., Ahn J-E., Datta S., Salzman R.A., Moon J., Huyghues-Despointes B., Pittendrigh B., Murdock L.L., Koiwa H., Zhu-Salzman K. (2005): *Arabidopsis* vegetative storage protein is an anti-insect acid phosphatase, *Plant Physiology* 139, 1545-1556
- Lopez-Bucio L., Hernández-Abreu E., Sanchez-Calderon L., Nieto-Jacobo M.R., Simpson J., Herrera-Estrella L. (2002): Phosphate sensitivity alters architecture and causes changes in hormone sensitivity in the *Arabidopsis* root system. *Plant Physiology* 129, 244-256
- Lopez-Bucio L., Hernández-Abreu E., Sanchez-Calderon L., Perez-Torres A., Rampey R.A., Bartel B., Herrera-Estrella L. (2005): An auxin transport independent pathway is involved in phosphate stress induced root architectural alterations in *Arabidopsis*. Identification of BIG as a mediator of auxin in pericycle cell activation, *Plant Physiology*, 137, 681–691
- Lottspeich, F., Zorbas, H. (1998): *Bioanalytik*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin
- Lynch J.P. (2007): Roots of the second green revolution. *Australian Journal of Botany* 55, 493-512
- Lynch J.P. (2011): Root phenes for enhance soil exploration and phosphorus acquisition: tools for future crops. *Plant Physiology* 156, 1041-1049
- Macher B.A. & Mudd J.B. (1976): Partial purification and properties of ethanolamine kinase from spinach leaf, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 177, 24-30
- MacRae V.E., Davey M.G., McTeir L., Narisawa, S., Yadav M.C., Millan J.L., Farquharson, C. (2010): Inhibition of PHOSPHO1 activity results in impaired skeletal mineralization during limb development of the chick, *Bone* 46, 1146-1155
- Makarenkov, U. (2001): T-Rex: reconstructing and visualizing phylogenetic trees and reticulation networks, *Bioinformatics* 17, 664-668
- Massimelli M.J., Beassoni P.R., Forrellad M. A., Barra J.L., Garrido M.N., Domenech C.E., Lisa A.T. (2005): Identifikation, cloning and expression of *Pseudomonas aeruginosa* phosphorylcholine phosphatase gene, *Current Microbiology* 50, 251-256
- Marschner H. (1995): *Mineral nutrition of higher plants*. Academic Press, London.
- Martin A.B. & Tolbert N.E. (1983): Factors which affect the amount of inorganic phosphate, phosphorylcholine, and phosphorylethanolamine in xylem exudates of tomato plants, *Plant Physiology* 73, 464–470
- Maruyama K. & MacLennan D.H. (1988): Mutation of aspartic acid-351, lysine-352, and lysine-515 alters the Ca<sup>2+</sup> ATPase expressed in COS-1 cells, *PNAS U.S.A.* 85, 3314–3318
- May A., Berger S., Hertel T., Köck M. (2011): The *Arabidopsis thaliana* phosphate starvation responsive gene *AtPPsPase1* encodes a novel type of inorganic pyrophosphatase, *Biochimica et Biophysica Acta* 1810, 178-185
- May A., Spinka M., Köck M. (2012): *Arabidopsis thaliana* PECP1 – Enzymatic characterization and structural organization of the first plant phosphoethanolamine/phosphocholine phosphatase, *Biochimica et Biophysica Acta* 1824, 319-325

- Menon A.K. & Stevens V.L. (1992): Phosphatidylethanolamine is the donor of the ethanolamine residue linking a glycosylphosphatidylinositol anchor to protein, *Journal of Biochemistry* 267 (22), 15277-15280
- Miller S.S., Liu J.Q., Allan D.L., Menzhuber C.J., Fedorova M., Vance C.P. (2001): Molecular control of acid phosphatase secretion into the rhizosphere of proteoid roots from phosphorus-stressed white lupin, *Plant Physiology* 127, 594-606
- Mimura T. (1999): Regulation of phosphate transport and homeostasis in plant cells. *International Review of Cytology* 191, 149-200
- Misson J., Raghothama K.G., Jain A., Jouhet J., Block M.A., Bligny R., Ortet P., Creff A., Somerville S., Rolland N. *et al.* (2005): A genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* affymetrix gene chips determined plant responses to phosphate deprivation, *PNAS U.S.A.*, 102, 11934-11939
- Miura K., Rus A., Sharkhuu A., Yokoi S., Karthikeyan A.S., Raghothama K.G., Baek D., Koo Y.D., Jin J.B., Bressan R.A. *et al.* (2005): The *Arabidopsis* SUMO E3 ligase SIZ1 controls phosphate deficiency responses. *PNAS U.S.A.*, 102, 7760-7765
- Monks, D.E., Goode J.H., Dewey R.E. (1996): Characterization of soybean choline kinase cDNAs and their expression in Yeast and *Escherichia Coli*. *Plant Physiology* 110, 1197-1205
- Morcuende R., Bari R., Gibon Y., Zheng W., Pant B.D., Bläsing O., Usadel B., Czechowski T., Udvardi M.K., Stitt M., Scheible W.-R. (2007): Genome-wide reprogramming of metabolism and regulatory networks of *Arabidopsis* in response to phosphorus, *Plant Cell Environ* 30, 85-112
- Müller R., Morant M., Jarmer H., Nilsson L., Nielsen T.H. (2007): Genome-wide analysis of the *Arabidopsis* leaf transcriptome reveals interaction of phosphate and sugar metabolism, *Plant Physiology* 143, 156-171
- Nakagawa T., Kurose T., Hino T., Tanaka K., Kawamukai M., Niwa Y., Toyooka K., Matsuoka K., Jinbo T., Kimura T. (2007): Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation, *Journal of Bioscience and Bioengineering* 104 (1), 34-41
- Nakamura Y., Awai K., Masuda T., Yoshioka Y., Takamiya K., Ohta H. (2004): A novel phosphatidylcholine-hydrolyzing phospholipase C induced by phosphate starvation in *Arabidopsis*, *Journal of Biology Chemistry* 280, 7469-7476
- Nakamura Y. (2013): Phosphate starvation and membrane lipid remodeling in seed plants, *Progress in Lipid Research* 52, 43-50
- Narcy P., Canivenc G., Müller B., Azmi A., van Onckelen H., Rossignol M., Doumas P. (2005): A role for auxin redistribution in the responses of the root system architecture to phosphate starvation in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 138, 2061-2074
- Nilsson L., Müller R., Nielsen T.H. (2010): Dissecting the plant transcriptome and the regulatory responses to phosphate deprivation. *Physiology Plantarum* 139, 129-143
- Nuccio M.L., Russell B.L., Nolte K.D., Rathinasabapathi B., Gage D.A. Hanson A.D. (1998): The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monoxygenase, *The Plant Journal* 16 (4), 487-496
- Olczak M., Morawiecka B., Watorek W. (2003): Plant purple acid phosphatases – genes, structures and biological function, *Acta Biochimica Polonica* 50, 1245-1256

- Osmont K.S., Sibout R., Hardtke, C.S.(2007): Hidden branches: developments in root system architecture. *Annual Review of Plant Biology* 58, 93-113
- Peel G.J., Mickelbart M. V., Rhodes D. (2010): Choline metabolism in glycinebetaine accumulating and non-accumulating near-isogenic lines of *Zea mays* and *Sorghum bicolor*, *Phytochemistry* 71, 404-414
- Peisach E., Selengut J.D., Dunaway-Mariano D., Allen K.N. (2004): X-ray crystal structure of the hypothetical phosphotyrosine phosphatase MDP-1 of the Haloacid Dehalogenase Superfamily, *Biochemistry* 43, 12770-12779
- Petters J., Göbel C., Scheel D., Rosahl S. (2001): A pathogen-responsive cDNA from potato encodes a protein with homology to a phosphate starvation-induced phosphatase, *Plant Cell Physiology* 43, 1049-1053
- Plaxton W.C. & Carswell M.C. (1999): Metabolic aspects of the phosphate starvation response in plant. In *Plant Response to Environmental Stresses: From Phytohormones to Genome Reorganization* (Lerner, H., ed.), pp. 349-372, Marcel Dekker
- Plaxton W.C. & Tran H.T. (2011): Metabolic adaptations of phosphate-starved plants, *Plant Physiology* 156, 1006-1015
- Poirier Y., Thoma S., Somerville C., Schiefelbein J.: (1991) A mutant of *Arabidopsis* deficient in xylem loading of phosphate, *Plant Physiology* 97, 1087–1093
- Poirier Y. & Buchner M. (2002): Phosphate transport and homeostasis in *Arabidopsis*. In: Somerville C.R., Meyerowitz E.M., eds. *The Arabidopsis book*. Rockville, MD: American Society of Plant Biologists, 1-35
- Raghothama, K.G. (1999): Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Biology* 50, 665-693
- Raghothama, K.G. (2000): Phosphat transport and signaling, *Current Opinion in Plant Biology*, 3 (3), 182-187
- Rausch C. & Bucher M. (2002): Molecular mechanisms of phosphate transport in plants. *Planta* 216, 23-37.
- Roberts S.J., Stewart A.J., Sadler, P.J., Farquharson, C (2004): Human PHOSPHO1 exhibits high specific phosphoethanolamine and phosphocholine phosphatase activities, *Biochemistry Journal* 382, 59-65
- Rontein D., Rhodes D., Hanson A.D. (2003): Evidence from engineering that decarboxylation of free serine is the major source of ethanolamine moieties in plants, *Plant Cell Physiology* 44 (11), 1185-1191
- Rouached H., Arpat A.B., Poirier Y. (2010): Regulation of phosphate starvation responses in plants: signaling players and crosstalks. *Molecular Plant* 3, 288-299
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989): *Molecular cloning: a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sanchez-Calderon L., Lopez-Bucio J., Chacon-Lopez A., Cruz-Ramirez A., Nieto-Jacobo, F., Dubrovsky J., Herrera-Estrella L. (2005): Phosphate starvation induces a determinate developmental program in the roots of *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiology*, 46, 174-184

- Schachtman D.P., Reid R.J., Ayling S.M. (1998): Phosphorus uptake by plants: from soil to cell, *Plant Physiology* 116, 447-453
- Schellenberger, Alfred (1989): *Enzymkatalyse: Einführung in die Chemie, Biochemie und Technologie der Enzyme*, 1. Auflage, Original-Ausgabe, Gustav Fischer Verlag Jena
- Seelengut J.D. (2001): MDP-1 is a new and distinct member of the haloacid dehalogenase family of aspartate-dependent phosphohydrolases, *Biochemistry* 40, 12704-12711
- Seifried A., Schultz J., Gohla A. (2013): Human HAD phosphatases: structure, mechanism, and roles in health and disease. *FEBS Journal* 280, 549-571
- Smith S.E., Smith F.A. (2011): Roles of arbuscular mycorrhizas in plant nutrition and growth: new paradigms from cellular to ecosystems scales, *Annual Review of Plant Biology* 63, 227-250
- Smith S.E., Jakobsen I., Gronlund M., Smith A.F. (2011): Roles of arbuscular mycorrhizas in Plant phosphorus nutrition: interactions between pathways of phosphorus uptake in arbuscular mycorrhizal roots have important implications for understanding and manipulating plant phosphorus acquisition, *Plant Physiology* 156, 1050-1057
- Selengut J.D. (2001): MDP-1 is a new and distinct member of the Haloacid Dehalogenase Family of aspartate-dependent phosphohydrolase, *Biochemistry* 40, 12704-12711
- Singh, S.K., Yang, K., Karthikeyan, S., Huynh, T., Zhang, X.J., Phillips, M.A. Zhang, H. (2004): The thrH gene product of *Pseudomonas aeruginosa* is a dual activity enzyme with a novel phosphoserine: homoserine phosphotransferase activity, 279 (13), 13166-13173
- Spiegel S. & Milstien S. (2003): Sphingosin-1-Phosphate: An enigmatic signalling lipid, *Nature Reviews Molecular Cell Biologie* 4 (5), 397-407
- Stefanovic A., Ribot C., Rouached H., Wang Y., Chong J., Belbahri L., Delessert S., Poirier Y. (2007): Members of the *PHO1* gene family show limited functional redundancy in phosphate transfer to the shoot, and are regulated by phosphate deficiency via distinct pathways, *Plant Journal* 50, 982-994
- Stenzel I., Ziethe K., Schurath J., Hertel S.C., Bosse D., Köck M. (2003): Differential expression of the LePS2 phosphatase gene family in response to phosphate availability, pathogen infection and during development, *Physiologica Plantarum* 118, 138-146
- Storch, V., Welsch, U., Wink, M. (2007): *Evolutionsbiologie*, 2. Auflage, Springer-Verlag Berlin, Heidelberg
- Sunkar R., Zhu J.K. (2004): Novel and stress-regulated microRNAs and other small RNAs from Arabidopsis. *The Plant Cell* 16, 2001-2019
- Svistoonoff S., Creff A., Reymond M., Sigoillot-Claude C., Ricaud L., Blanchet A., Nussaume L., and Desnos T. (2007): Root tip contact with low-phosphate media reprograms plant root architecture, *Nature Genetic* 39, 792-796
- Tanaka K., Tolbert N.E., Gohlke A.F. (1966): Choline kinase and phosphorylcholine phosphatase in plants, *Plant Physiology* 41, 307-312
- Tian J., Venkatachalam P., Liao H., Yan X., Raghothama K. (2007): Molecular cloning and characterization of phosphorus starvation responsive genes in common bean (*Phaseolus vulgaris L.*), *Planta* 227, 151-165

- Thibaud M.-C., Arrighi J.-F., Bayle V., Chiarenza S., Creff A., Bustos R., Paz-Ares J., Poirier Y., Nus saume L. (2010): Dissection of local and systemic transcriptional responses to phosphate starvation in *Arabidopsis*, *Plant Journal* 64, 775-789
- Ticconi, C. & Abel, S. (2004): Short on phosphate: plant surveillance and countermeasures, *Trends in Plant Science* 9 (11) 548-555
- Tirrell I.M., Wall J.L., Daley C.J., Denial S.J., Tennis F.G., Galens K.G., O'Handley S.F. (2006): YZGD from *Paenibacillus thiaminolyticus*, a pyridoxal phosphatase of the HAD (haloacid dehalogenase) superfamily and a versatile member of the Nudix (nucleoside diphosphate x) hydrolase superfamily, *Biochemical Journal*, 394, 665-674
- Tran H.T., Hurley B.A., Plaxton W.C. (2010): Feeding hungry plants: the role of purple acid phosphatases in phosphate nutrition, *Plant Science* 179, 14–27
- Uhde-Stone C., Zinn K.E., Ramirez-Yanez M., Li A., Vance C.P., Allan D.L. (2003): Nylon filter arrays reveal differential gene expression in proteoid roots of white lupin in response to phosphorus deficiency. *Plant Physiology* 131, 1064–1079
- Valentin E. & Lambeau G. (2000): Increasing molecular diversity of secreted phospholipases A2 and their receptors and binding proteins, *Biochimica et Biophysica Acta* 1488, 59-70
- Van Larebeke N., Engler G., Holsters M., Van den Elsacker S., Zaenen I., Schilperoort R.A., Schell J. (1974): Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown gall-inducing ability, *Nature* 252, 169-170
- Vance, C.P., Uhde-Stone, C., Allan, D. L. (2003): Phosphorus acquisition and use: critical adaptations by plants for securing a nonrenewable resource, *New Phytologist* 157, 423-447
- Wang W., Kim R., Jancarik J., Yokota H., Kim S.H. (2001): Crystal structure of phosphoserine phosphatase from *Methanococcus jannaschii*, a hyperthermophile, at 1.8 Å resolution, *Structure* 10, 65-71
- Wang X., Wang Y., Tian J., Lim L.B., Yan X., Liao H. (2009): Overexpressing AtPAP15 Enhances Phosphorus Efficiency in Soybean, *Plant Physiology* 151, 233-240
- Wasaki J., Yonetani R., Kuroda S., et al. (2003a): Transcriptomic analysis of metabolic changes by phosphorus stress in rice plant roots. *Plant, Cell and Environment* 26, 1515–1523.
- Ward J.T., Lahner B., Yakubova E., Salt D.E., Raghothama K.G. (2008): The effect of iron on the primary root elongation of *Arabidopsis* during phosphate deficiency, *Plant Physiology* 147, 1181–1191
- Watt M. & Evans J.R. (1999): Proteoid roots. Physiology and development. *Plant Physiology* 122, 317-323
- Wharfe J. & Harwood J.L. (1979): Lipid metabolism in germinating seeds. Purification of ethanolamine kinase from Soyabean, *Biochimica et Biophysica Acta* 575, 102-111
- Woody S.T., Austin-Phillips S., Amasino R.M., Krysan P.J. (2007): The WiscDsLox T-DNA collection: an arabidopsis community resource generated by using an improved high-throughput T-DNA sequencing pipeline. *J Plant Res* 120, 157-165
- Yadav M., Simão A., Narisawa, S., Huesa C., McKee M., Farquharson C., Millan, J. (2011): Loss of skeletal mineralization by the simultaneous ablation of PHOSPHO1 and alkaline phosphatase function: A unified model of the mechanisms of initiation of skeletal calcification, *J. Bone Miner. Res.* 26, 286-297

- Yan F., Zhu Y.Y., Müller C., Zörb C., Schubert S. (2002): Adaptation of H<sup>+</sup>-pumping and plasma membrane H<sup>+</sup> ATPase activity in proteoid roots of white lupin under phosphate deficiency. *Plant Physiology* 129, 50–63
- Yang J.X., Finnegan P.M. (2010): Regulation of phosphate starvation responses in higher plants, *Annals of Botany* 105, 513-526
- Yi K., Menand B., Bell E., Dolan L. (2010): A basic helix-loop-helix-transcription factor controls cell growth and size in root hairs, *Nature Genetics* 42, 264-267
- Zheng L., Huang F., Narsai R., Wu J., Giraud E., He F., Cheng L., Wang F., Wu P., Whelan J. *et al.* (2009): Physiological and transcriptome analysis of iron and phosphorus interaction in rice seedlings, *Plant Physiology*, 151, 262-274
- Zhu H., Qian W., Xuzhong L., Li D., Liu X., Liu K., Wang D. (2005): Expression patterns of purple acid phosphatase genes in *Arabidopsis* organs and functional analysis of AtPAP23 predominantly transcribed in flower, *Plant Molecular Biology* 59 , 581–594
- Zilversmit D.B., Davis A.K. (1950): Microdetermination of plasma phospholipids by trichloroacetic precipitation, *Journal of Laboratory Clinical Medicine* 35, 155-160
- Zimmerman P., Regrierer B., Kossmann J., Amrhein N., Bucher M. (2004): Differential expression of three purple acid phosphatases from potato, *Plant Biology* 6, 519–528

## 7. Anhang

### 7.1 Vektorkarten

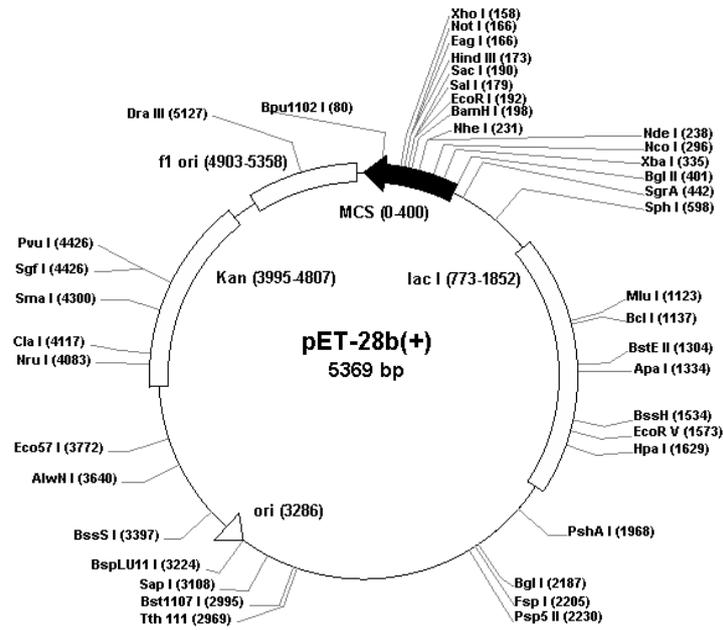


Abbildung 40: Schematische Darstellung des Vektors pET-28b(+)

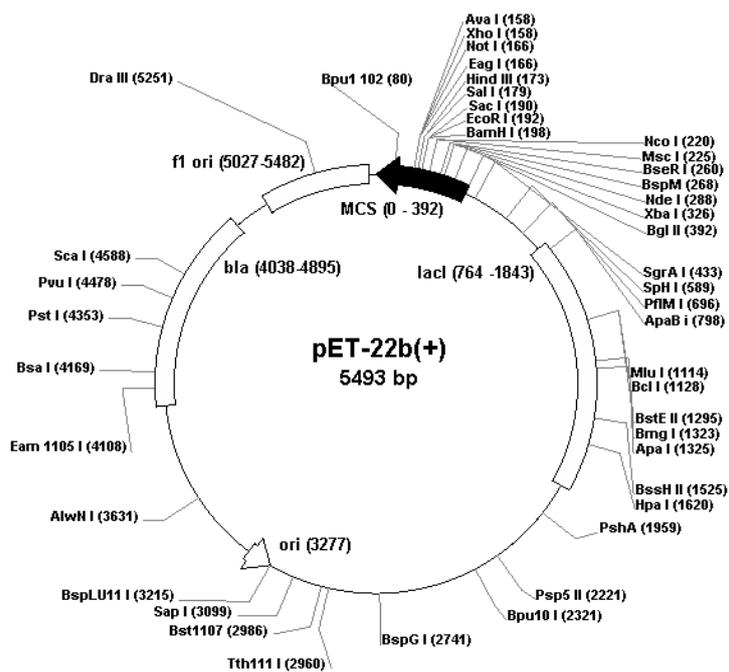


Abbildung 41: Schematische Darstellung des Vektors pET-22b(+)

## 7.2 Berechnung der spezifischen AtPECP1-Aktivität

1. Lineare Kalibriergeraden-Gleichung zur Bestimmung von anorganischem Phosphat mit Hilfe der Methode nach Zilversmit & Davis (1950):

$$[P_i]_{\text{Konzentration}} = \frac{A_{405\text{nm}} - 0,18251}{0,46485}$$

2. Berechnung der spezifischen Aktivität nach  $P_i$ -Freisetzung:

$$[A]_{\text{spezifisch}} = \frac{[P_i]_{\text{Konzentration}} \times \text{Rohextraktvolumen} \times \text{Faktor}^*}{\text{Reaktionszeit} \times \text{Proteinmenge}}$$

\* Faktor (Reaktionsvolumen/Rohextraktvolumen)

Beispiel:

$$[A]_{\text{spezifisch}} = \frac{490,3 \mu\text{M} \times 100 \mu\text{l} \times 10}{\text{min} \times 50 \mu\text{g}}$$

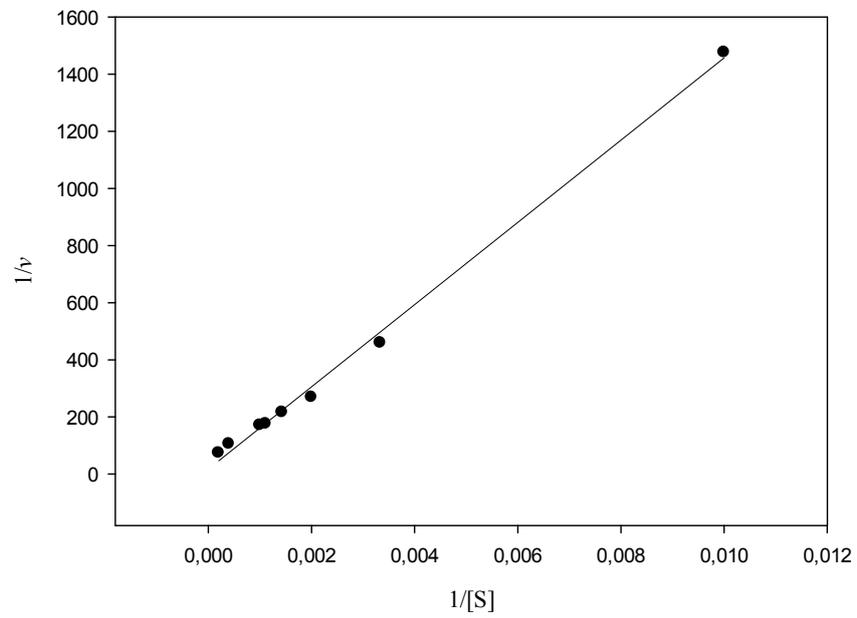
$$[A]_{\text{spezifisch}} = \frac{490,3 \mu\text{mol} \times 0,1 \text{ ml} \times 10}{10^3 \text{ ml} \times \text{min} \times 0,05 \text{ mg}}$$

$$[A]_{\text{spezifisch}} = \frac{490,3 \mu\text{mol} \times 1}{50 \text{ mg} \times \text{min}}$$

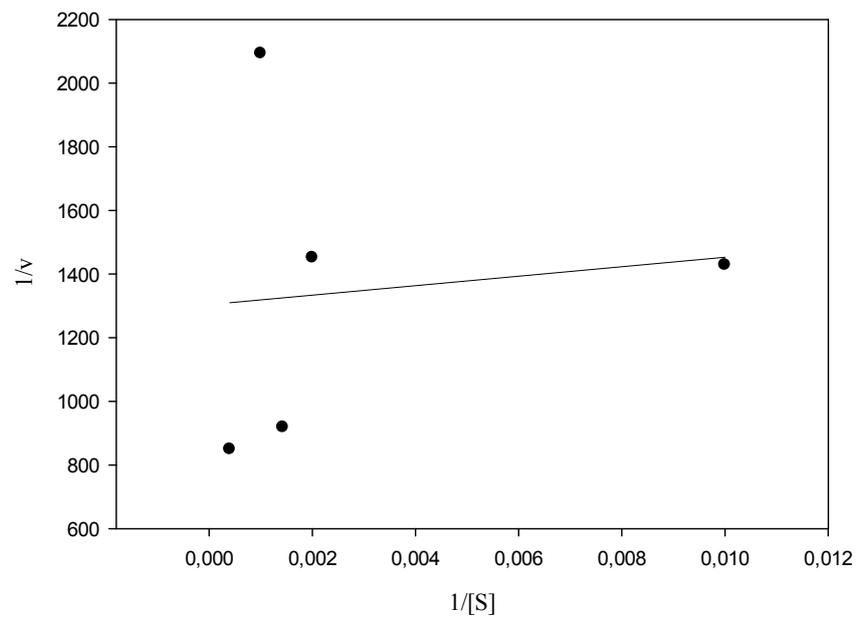
$$[A]_{\text{spezifisch}} = \underline{\underline{9,806 \mu\text{mol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}}}$$

### 7.3 Lineweaver-Burk Plots der v/S-Charakteristik der AtPECP2

Substrat Phosphoethanolamin:

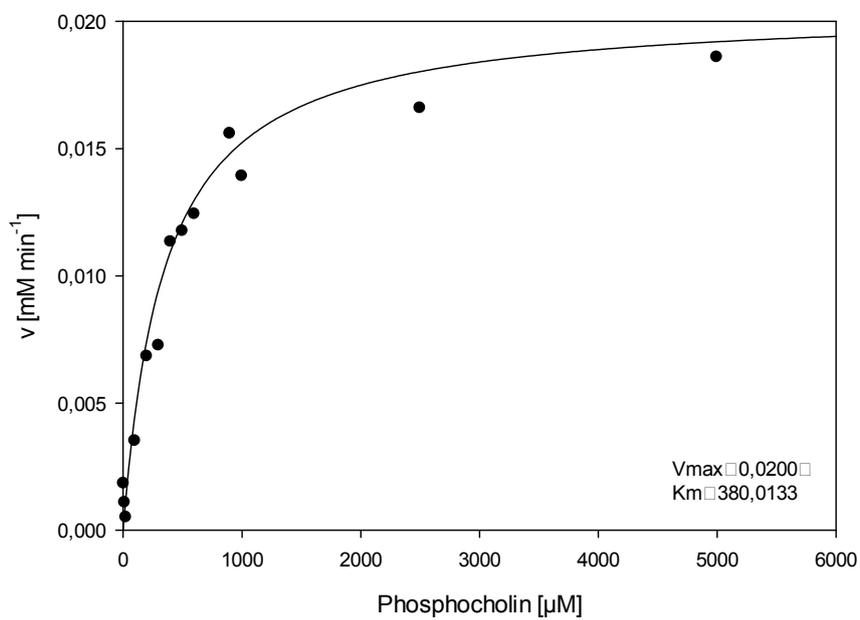
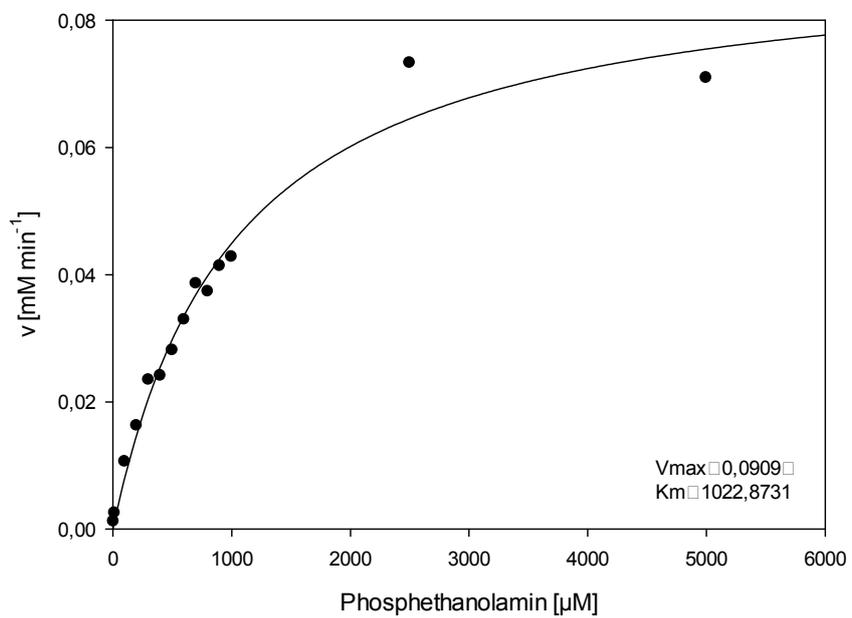


Substrat Phosphocholin:

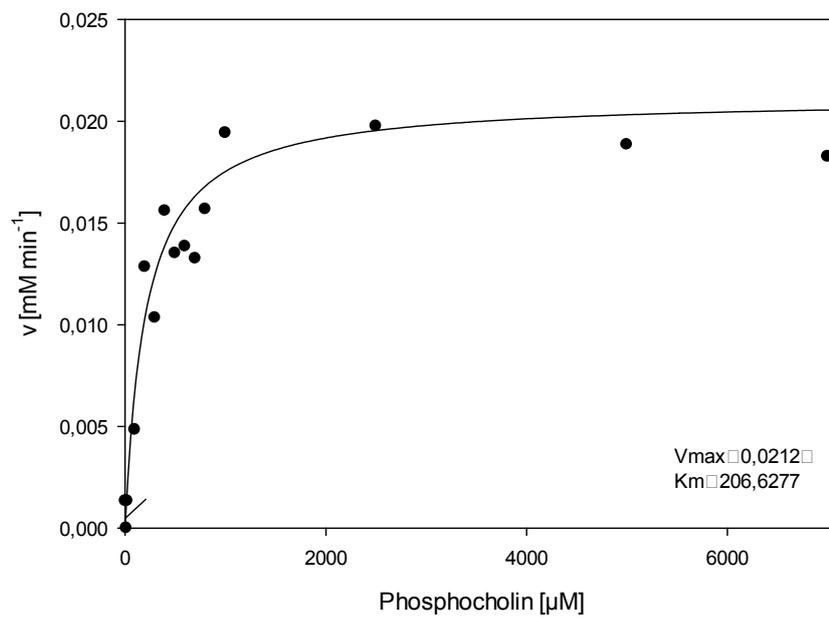
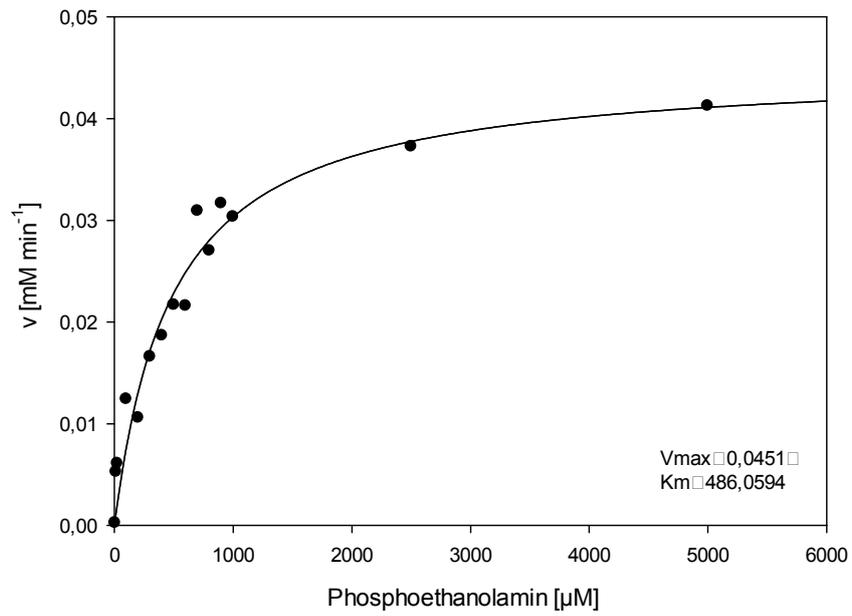


## 7.4 v/S-Charakteristiken der PECP-Isoenzyme

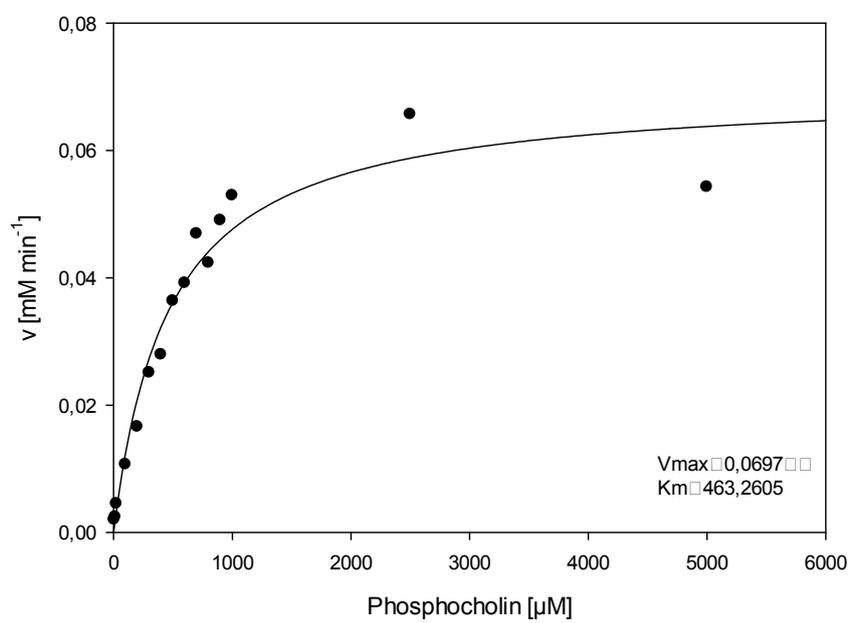
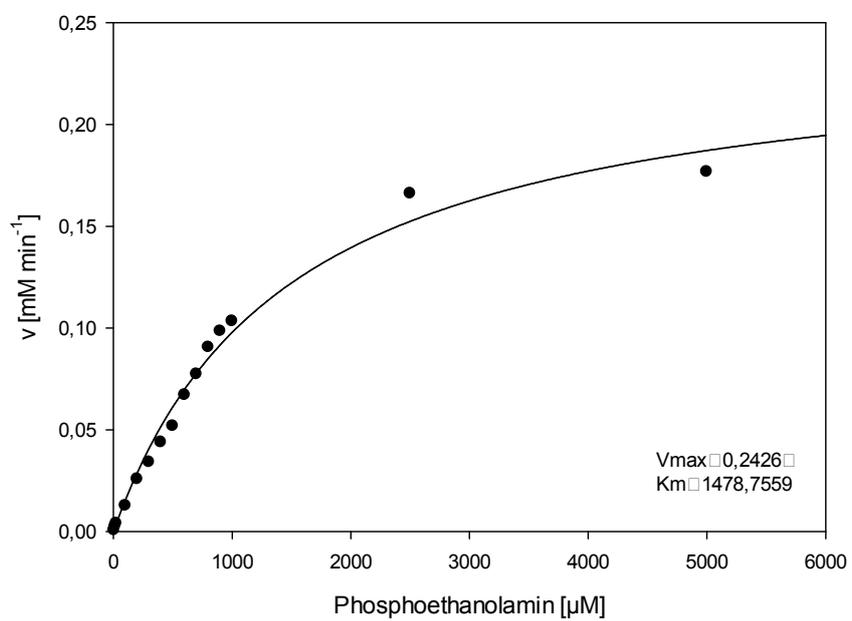
LePS2;1



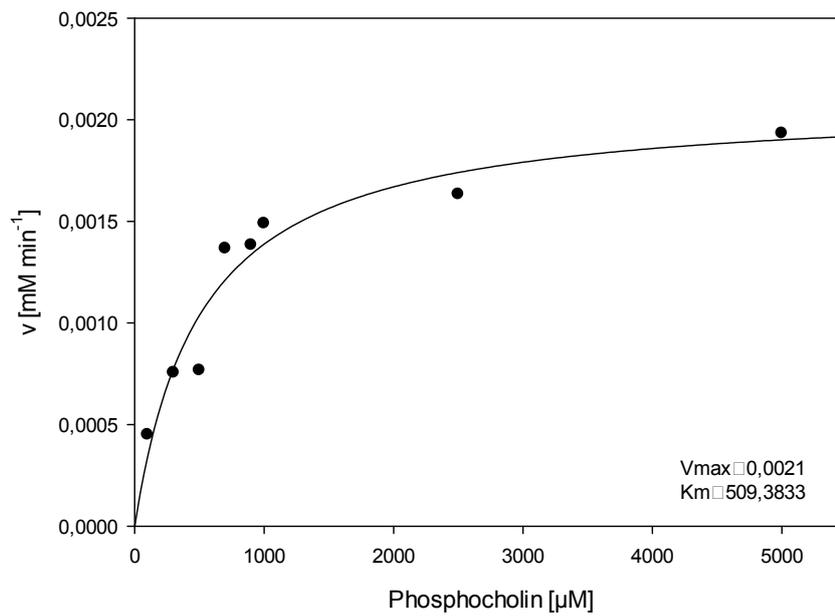
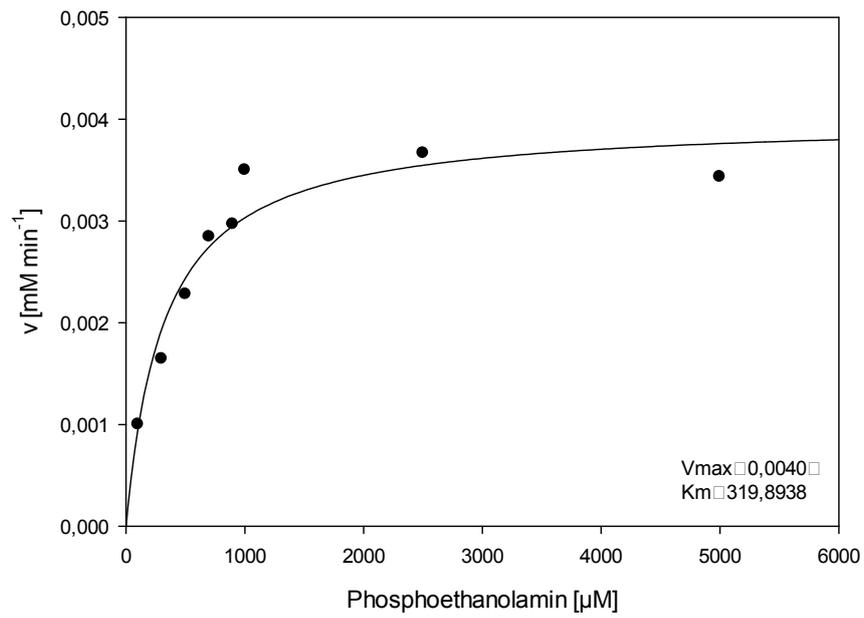
LePS2;2



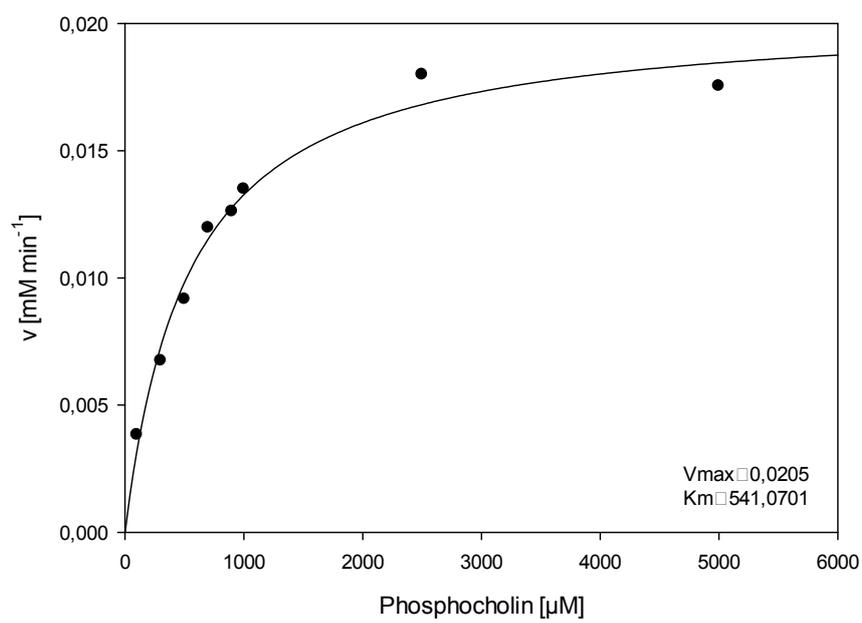
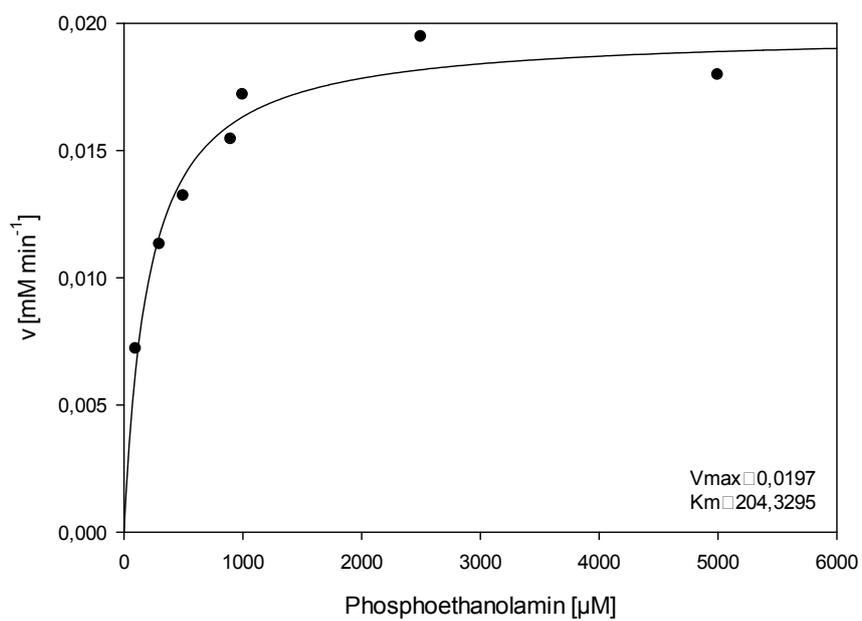
LePS2;3



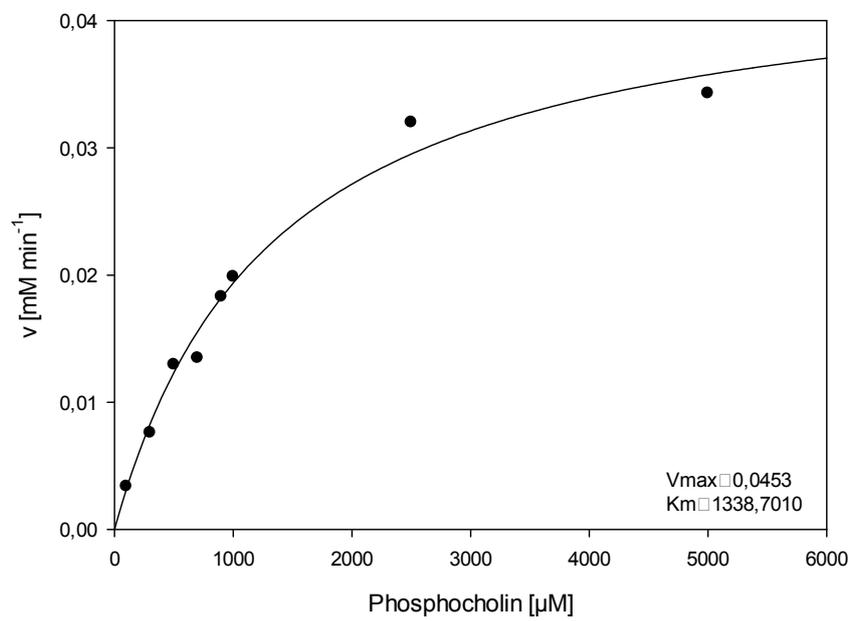
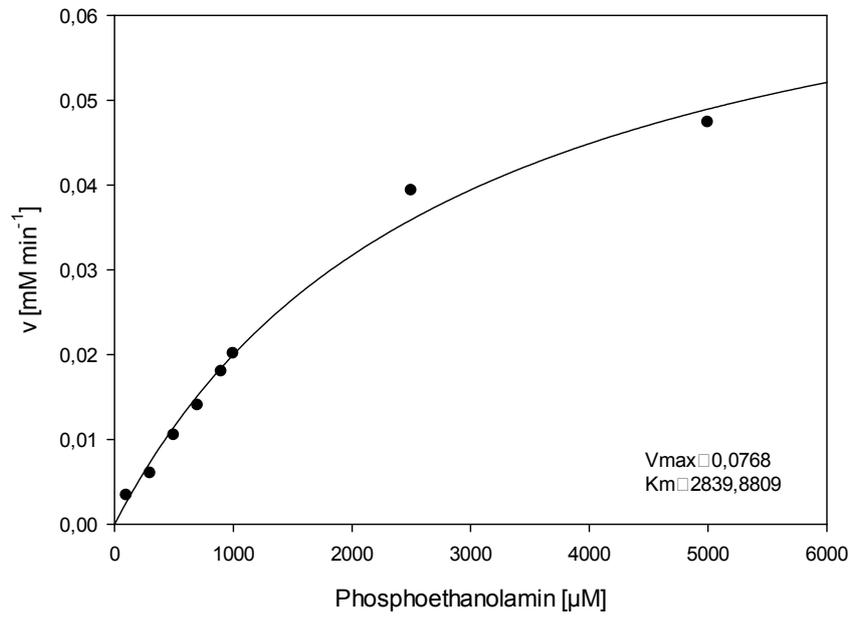
## PvHAD1



## PvPS2



## OsACP1



## 7.5 Multiples Alignment (Clustal-W2) der HAD Superfamilie Hydrolasen

```

A.thaliana_Q67YC0_AtPPsPase1 -----MAYNSNSNNNNNN--I 14
A.lyrata_D7KR62 -----MAYNSN-NKNSNN--I 13
A.thaliana_Q9FZ62_AtPECP1 -----MAKNNN--I 7
A.lyrata_D7KFI6 -----MANRNN--I 7
P.trichocarpa_B9HM85 -----MAAA--I 5
P.trichocarpa_B9MWQ6 -----MAAVAAAAGG--I 11
R.communis_B9SN55 -----MAG--V 4
R.communis_B9T693 -----MAGLG--I 6
G.max_C6TBH9 -----MSG--T 4
G.max_1KGE6 -----MSG--I 4
G.max_1lKUW2 -----MSG--I 4
P.vulgaris_D7PEX6_PvHAD1 -----MSE--I 4
P.vulgaris_A4ZVI5_PvPS2 -----MSG--I 4
L.japonicus_I3S8Y2 -----MSG--I 4
M.truncatula_I3SND6 -----MSNN--I 5
M.truncatula_A2Q3B8 -----MAS--I 4
M.truncatula_G7ZWH8 -----MAN--I 4
G.max_1lMCY1 -----MAE--I 4
L.esculentum_Q9FPR1_LePS2_1 -----MAG--I 4
L.esculentum_Q8GRL8_LePS2_2 -----MAG--I 4
L.esculentum_Q8GUC1_LePS2_3 -----MAG--I 4
S.tuberosum_PGSC000DMT40001234 -----MAG--I 4
S.tuberosum_PGSC000DMT40001234 -----MAG--I 4
S.tuberosum_PGSC0003DMG4020048 -----MAG--I 4
L.esculentum_K4BMU1 -----MAG--I 4
S.tuberosum_SGN-U278474 -----MAG--I 4
V.vinifera_D7U028 -----MAG--I 4
G.max_C6THU3 -----MAG--I 4
G.max_K7M947 -----MAG--N 4
P.vulgaris_E5D6S8_PvPS2-2 -----MAG--I 4
G.max_C6SZJ1 -----MAG--I 4
G.max_1lKGE5 -----MISQLIYHNICFWCIQKMG--I 21
G.max_1lKUW1 -----MAG--I 4
L.japonicus_I3T6F3 -----MAG--I 4
M.truncatula_B7FI56 -----MAG--V 4
P.trichocarpa_B9INJ1 -----MAK--V 4
V.vinifera_D7STM9 -----MA--V 3
R.communis_B9RKA9 -----MAQ--I 4
S.tuberosum_PGSC0003DMP4000642 -----MVGEK--V 6
A.thaliana_Q9SU92_AtPECP2 -----MAK--I 4
A.lyrata_D7MCK8 -----MER--I 4
V.vinifera_D7TBA2 -----MTG--I 4
G.max_C6SZJ9 -----MGGGG--V 6
M.truncatula_G7LJK6 -----M--V 2
P.patens_A9RMS9 -----MD--T 3
S.moellendorffii_D8SBA0 -----MAS--S 4
P.sitchensis_A9NLR1 -----MD--T 3
B.distachyon_I1HR17 -----MAG--V 4
H.vulgare_F2DKT3 -----MAG--V 4
O.glaberrima_I1NRA5 -----MAG--I 4
O.sativa_Q8W0E7_OsACP1 -----MAG--I 4
O.brachyantha_J3L3K4 -----MAG--I 4
S.bicolor_C5XID0 -----MAG--I 4
Z.mays_B6TXH8 -----MAG--V 4
S.italica_K3XQG7 -----MAG--I 4
Z.mays_B4F825 -----MAG--I 4
O.glaberrima_I1NYN4 -----MAASGGGNGV 10
O.sativa_Q6H6J4 -----MAASGGGNGV 10
S.italica_K3YUH3 -----MAASNG--AP 8
Z.mays_C4JC34 -----MRMAASNG--AP 11
O.sativa_A2ZV38 -----MAAGVDGDTAAAAAAGGGV 19
S.bicolor_C5XQ80 -----MASAPAPAPAV 11
B.distachyon_I1HP49 -----MAAAL 5

```

Motiv 1

A.thaliana_Q67YC0_AtPPsPase1	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> WVDEL <del>G</del> FTDLFNQLLPTMPW--NTLM <del>D</del> RRM <del>M</del> KE	62
A.lyrata_D7KR62	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> WVDEL <del>G</del> YTDLFNQLLPTMPW--NTLM <del>D</del> RRM <del>M</del> KE	61
A.thaliana_Q9FZ62_AtPECP1	VIVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVDEL <del>G</del> FTDLFNQLLPTMPW--NSLM <del>N</del> R <del>R</del> M <del>M</del> KE	55
A.lyrata_D7KFI6	VIVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVDEL <del>G</del> FTELFNQLLPTMPW--NSLM <del>N</del> R <del>R</del> M <del>M</del> KE	55
P.trichocarpa_B9HM85	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> WVDEL <del>G</del> FTE <del>S</del> FNQLLPTMSW--NSLM <del>D</del> R <del>R</del> M <del>M</del> KE	53
P.trichocarpa_B9MWQ6	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> WVDEL <del>G</del> FTDLFNQLLHTMPW--NSLM <del>D</del> RRM <del>M</del> KE	59
R.communis_B9SN55	LVVFD <del>F</del> DN <del>T</del> IIIDVSDN <del>N</del> WVDEL <del>G</del> FTDLFNQLLPTMPW--NSLM <del>D</del> RRM <del>M</del> KE	52
R.communis_B9T693	VVILDFYK <del>T</del> IIIDVSDY <del>V</del> VVKELGLTDFFYQLLPTMPL--NSAMA <del>E</del> MM <del>M</del> KE	54
G.max_C6TBH9	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> WVDEL <del>G</del> FTDLFNQLLPTMPW--NSLM <del>D</del> R <del>R</del> M <del>M</del> ME	52
G.max_1KGE6	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> WVDEL <del>G</del> FTDLFNQLLPTMPW--NSLM <del>D</del> K <del>M</del> MM <del>M</del> E	52
G.max_1lKUW2	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVDDL <del>G</del> FTDLFNQLLPTMPW--NSLM <del>D</del> R <del>R</del> M <del>M</del> ME	52
P.vulgaris_D7PEX6_PvHAD1	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> WVDEL <del>G</del> FTDLFNQLLPTMPW--NTLM <del>D</del> K <del>M</del> MM <del>M</del> E	52
P.vulgaris_A4ZVI5_PvPS2	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVDEL <del>G</del> FTDLFNQLLPTMPW--NSLM <del>D</del> R <del>R</del> M <del>M</del> KE	52
L.japonicus_I3S8Y2	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVDEL <del>G</del> FTDLFNQLLPTMPW--NSLM <del>D</del> K <del>M</del> MM <del>M</del> E	52
M.truncatula_I3SND6	VII <del>F</del> FD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> WVDEL <del>G</del> FTDLFNQLLPTMPW--NSV <del>M</del> D <del>K</del> MM <del>M</del> E	53
M.truncatula_A2Q3B8	VVVFD <del>F</del> DKTIIIECDSDN <del>N</del> VVDEL <del>G</del> FN <del>D</del> LFNQLFP <del>T</del> MPL--NYLM <del>D</del> R <del>R</del> M <del>M</del> ME	52
M.truncatula_G7ZWH8	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVDEL <del>G</del> FTDLFNELVPTMPW--NSLM <del>D</del> R <del>R</del> M <del>M</del> ME	52
G.max_1lMCI1	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVDEL <del>G</del> FNELFNRL <del>L</del> PTMPW--NTLM <del>D</del> K <del>M</del> MM <del>M</del> E	52
L.esculentum_Q9FPR1_LePS2_1	VVVFD <del>F</del> DKTIIIEVSDN <del>N</del> VVDEL <del>G</del> ATDLFNQLLPTMPW--NSLM <del>D</del> R <del>R</del> M <del>M</del> KE	52
L.esculentum_Q8GRL8_LePS2_2	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVDEL <del>G</del> ATDLFNQLLPTMPW--NSLM <del>D</del> R <del>R</del> M <del>M</del> KE	52
L.esculentum_Q8GUC1_LePS2_3	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVDEL <del>G</del> ATDLFNQLLPTMPW--NSLM <del>D</del> R <del>R</del> M <del>M</del> KE	52
S.tuberosum_PGSC000DMT40001234	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVDEL <del>G</del> ATDLFNQLLPTMPW--NSLM <del>D</del> R <del>R</del> M <del>M</del> NE	52
S.tuberosum_PGSC000DMT40001234	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVDEL <del>G</del> ATDLFNQLLPTMPW--NSLM <del>D</del> R <del>R</del> M <del>M</del> NE	52
S.tuberosum_PGSC0003DMG4020048	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVDEL <del>G</del> ATDLFNQLLPTMPW--NSLM <del>D</del> R <del>R</del> M <del>M</del> NE	52
L.esculentum_K4BMU1	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVDEL <del>G</del> ATDLFNQLLPTMPW--NSLM <del>D</del> R <del>R</del> M <del>M</del> KE	52
S.tuberosum_SGN-U278474	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVDEL <del>G</del> ATDLFNQLLPTMPW--NSV <del>M</del> D <del>K</del> MM <del>M</del> KE	52
V.vinifera_D7U028	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVDEL <del>G</del> ATDLFNQLLPTMPW--NSLM <del>D</del> R <del>R</del> M <del>M</del> KE	52
G.max_C6THU3	VVIFDFD <del>S</del> TIIIECDSDN <del>N</del> WVDEL <del>F</del> GLTEK <del>F</del> YQLLPNMLW--NPLM <del>D</del> K <del>M</del> MM <del>N</del> E	52
G.max_K7M947	VVVFD <del>F</del> D <del>S</del> TIIIECDSDN <del>N</del> WVDEL <del>F</del> GLTEK <del>F</del> YQLLPNMPW--NPLM <del>D</del> K <del>M</del> MM <del>N</del> E	52
P.vulgaris_E5D6S8_PvPS2-2	VVVFD <del>F</del> D <del>S</del> TIIIECDSDN <del>N</del> WVDEL <del>F</del> GLTQ <del>K</del> FYELLPNTLW--NPLM <del>D</del> K <del>M</del> MM <del>D</del> E	52
G.max_C6SZJ1	VVIFDFD <del>S</del> TIIIECDSDN <del>N</del> WVDEL <del>T</del> GLTEK <del>F</del> YQLLPSTHW--NPLM <del>D</del> K <del>M</del> MM <del>N</del> E	52
G.max_1lKGE5	VVIFDFD <del>S</del> TIIIECDSDN <del>N</del> WVDEL <del>T</del> GLTEK <del>F</del> YQLLPSTHW--NPLM <del>D</del> K <del>M</del> MM <del>N</del> E	52
G.max_1lKUW1	VVIFDFD <del>S</del> TIIIECDSDN <del>N</del> WVDEL <del>T</del> GLTEK <del>F</del> YQLLPSTHW--NPLM <del>D</del> K <del>M</del> MM <del>N</del> E	52
L.japonicus_I3T6F3	VVVFD <del>F</del> D <del>S</del> TIIIECDSDN <del>N</del> WVDEL <del>F</del> GLTEK <del>F</del> YQLLPSTPWGNPLM <del>D</del> K <del>M</del> MM <del>N</del> E	54
M.truncatula_B7FI56	VVIFDFD <del>S</del> TIIIECDSDN <del>N</del> WVDEL <del>F</del> GLTEK <del>F</del> YQLLPSTMLW--NPLM <del>D</del> K <del>I</del> MM <del>N</del> E	52
P.trichocarpa_B9INJ1	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVDEL <del>G</del> LDVHDLFAQLLPSLPW--NRLM <del>D</del> K <del>M</del> MM <del>N</del> E	51
V.vinifera_D7STM9	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVDEL <del>G</del> LTPLEFTQLLPTMPW--NPLM <del>D</del> R <del>R</del> M <del>F</del> ME	51
R.communis_B9RKA9	VVVFD <del>F</del> DR <del>T</del> LIDGSD <del>R</del> WVVTQ <del>M</del> GLSSLFNQLRSTLP--WNSLM <del>D</del> R <del>R</del> M <del>M</del> RE	52
S.tuberosum_PGSC0003DMP4000642	VIVFD <del>F</del> DR <del>T</del> LIDGSD <del>R</del> WVVENMGLTHL <del>F</del> NQLRPTLP--WNALM <del>D</del> D <del>G</del> GA	54
A.thaliana_Q9SU92_AtPECP2	VILFD <del>F</del> DR <del>T</del> LIDGSDN <del>N</del> VVTEMGLTEIFHQLRFTLP--WNRLM <del>D</del> R <del>R</del> M <del>M</del> ME	52
A.lyrata_D7MCK8	VII <del>F</del> DFD <del>R</del> T <del>L</del> IDGSD <del>R</del> WVTEMGLTEIFHQLRFTLP--WNRLM <del>D</del> R <del>R</del> M <del>M</del> ME	52
V.vinifera_D7TBA2	VVLFDFD <del>R</del> TIIIDGSD <del>K</del> WVTEMGLTQ <del>S</del> FQLRSLP--WNTLM <del>D</del> R <del>M</del> LHE	52
G.max_C6SZJ9	VVVLD <del>F</del> DR <del>T</del> IIDDDSD <del>R</del> WVVAELGLTELFKELRHSMP--WISLM <del>D</del> R <del>I</del> MAQ	54
M.truncatula_G7LJK6	IVVLD <del>F</del> DR <del>T</del> IIDDDSD <del>R</del> WVINQ <del>M</del> GLSDLFNQLRATMPS--WTSLM <del>D</del> R <del>M</del> EE	51
P.patens_A9RMS9	LIIFDFD <del>W</del> SLIDCNSD <del>T</del> WVVKLGAMERMKPLMEVLPW--TQLM <del>D</del> TMM <del>N</del> E	51
S.moellendorffii_D8SBA0	IVVFD <del>F</del> D <del>W</del> SLINCNSD <del>T</del> FVVEQ <del>M</del> GADLMRSLRRSLPW--TDLMD <del>T</del> MM <del>V</del> E	52
P.sitchensis_A9NLR1	VIMFD <del>F</del> D <del>H</del> T <del>L</del> IDCNSD <del>P</del> WV <del>N</del> QLGATQLMDSL <del>I</del> KVLPW--TSLM <del>D</del> R <del>R</del> M <del>S</del> E	51
B.distachyon_I1HR17	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVDSL <del>G</del> ATELFDRL <del>L</del> PTMPW--NALID <del>T</del> MM <del>G</del> E	52
H.vulgare_F2DKT3	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVVDGLGATELFDRL <del>L</del> PTMPW--NTLID <del>T</del> VM <del>G</del> E	52
O.glaberrima_I1NRA5	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVVDGLGATEEFER <del>L</del> LPTMPW--NTLMD <del>T</del> MM <del>G</del> E	52
O.sativa_Q8W0E7_OsACP1	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVVDGLGATEEFER <del>L</del> LPTMPW--NTLMD <del>T</del> MM <del>G</del> E	52
O.brachyantha_J3L3K4	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVVDGLGATEEFER <del>L</del> LPTMPW--NTLMD <del>T</del> MM <del>G</del> E	52
S.bicolor_C5XID0	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVVDNLG <del>F</del> TELFER <del>L</del> LPTMPW--NTLMD <del>T</del> MM <del>G</del> E	52
Z.mays_B6TXH8	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVVDSLG <del>F</del> TEPFER <del>L</del> LPTMPW--NTLMD <del>T</del> MM <del>G</del> E	52
S.italica_K3XQG7	IVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVVDSLG <del>F</del> TEEFER <del>L</del> LPTMPW--NDLMD <del>A</del> MM <del>G</del> K	52
Z.mays_B4F825	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVVDSLG <del>T</del> DLFER <del>L</del> LPTMPW--NTLMD <del>T</del> MM <del>G</del> E	52
O.glaberrima_I1NYN4	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDCSDN <del>N</del> VVVDALGATARF <del>D</del> LLRRLPW--NSAID <del>A</del> MM <del>G</del> E	58
O.sativa_Q6H6J4	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDCSDN <del>N</del> VVVDALGATARF <del>D</del> LLRRLPW--NSAID <del>A</del> MM <del>G</del> E	58
S.italica_K3YUH3	LVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVVDALGATRRF <del>D</del> LLRRLPW--NHAID <del>A</del> MM <del>G</del> E	56
Z.mays_C4JC34	LVVFD <del>F</del> DKTIIIDVSDN <del>N</del> VVVDALGATRRF <del>D</del> LLRRLPW--NHAID <del>A</del> MM <del>G</del> E	59
O.sativa_A2ZV38	VVVFD <del>F</del> DR <del>T</del> IIEWSD <del>D</del> WVITKLGASDAFR <del>R</del> LRPTMRW--NPLM <del>D</del> R <del>R</del> M <del>M</del> VE	67
S.bicolor_C5XQ80	VVVFD <del>F</del> DKTIIIDWSD <del>D</del> WVITKLGAA <del>D</del> AFRR <del>R</del> LRPTMRW--NPLM <del>D</del> R <del>R</del> M <del>M</del> AE	59
B.distachyon_I1HP49	VVVFD <del>F</del> DKTIIIEWSDN <del>N</del> VVITKLGATDAFN <del>R</del> LRPTMSW--TPLM <del>D</del> R <del>R</del> M <del>M</del> GE	53

..:.\* : : : : \* : :

HAD-Superfamilie Konsens: DxDx (T/V)



A.thaliana_Q67YC0_AtPPsPase1	ETIVEHLGISELSELFSEINSNPGY--VDER-GTLKISP---YHDF--TKSPH 153
A.lyrata_D7KR62	ETIVEHLGISELSELFSEINSNPGY--VDER-GTLRISP---YHDF--TKSSH 152
A.thaliana_Q9FZ62_AtPECP1	ETIIEHLGIGEFFSEINTNPGL--VDEQ-GRLIVSP---YHDF--TKSSH 146
A.lyrata_D7KFI6	ETIIEHLGIREFFSEINTNPGL--VDEQ-GRLIVSP---YHDF--TKSSH 146
P.trichocarpa_B9HM85	ETILKHLGLKDYFSEINTNPGF--VDEE-GRLRISP---YHDF--TQSSH 144
P.trichocarpa_B9MWQ6	ETILNHLGLKDYFSEINTNPGF--VDEQ-ERLRISP---YHDF--TQSSH 150
R.communis_B9SN55	ETILKHLGLRDYFSEINTNPGF--VDDE-GKLRIFP---YDF--TQSSH 143
R.communis_B9T693	DTILEHVGLRDCFSEINTNPGF--VDEE-GRLNIFP---FHD-----SG 141
G.max_C6TBH9	ETILKHLGLREYFSEINTNPGY--VNEE-GRLRILP---YHDF--NKASH 143
G.max_lKGE6	ETILKHLGLREYFSEISTNPGY--VNEE-ERLRILP---YHDF--NKASH 143
G.max_I1KUW2	ETILKHLGLREYFSEINTNPGY--VNEE-GRLRIQP---CHDF--NKASH 143
P.vulgaris_D7PEX6_PvHAD1	ESILKHLGLREYFSEINTNPGY--VNEE-GRLRILP---CHDF--NRSPH 143
P.vulgaris_A4ZVI5_PvPS2	ETILKHLGLKEYFSEIMTNPY--VNEE-GRLRILP---YHDF--NKASH 143
L.japonicus_I3S8Y2	ETILEHLKIKYFSEINTNPGY--V-EE-GRLRILP---YHDF--NKAPH 142
M.truncatula_I3SND6	ETILKHLGLVDCFSEINSNPGY--VNQE-GRVISP---YHDF--TKSSH 144
M.truncatula_A2Q3B8	ETILKHLGIRECFSEINTNPGY--VDEE-GRLRILP---FYDL--NKPPH 143
M.truncatula_G7ZWH8	ETILKHLGIRECFSEINTNPGY--VDE--GRLRILP---YHDL--NKPPH 142
G.max_I1MCY1	ETILKHLKIKYCFSEINTNPGY--INGE-ERLRILP---YHDF--NNSPH 143
L.esculentum_Q9FPR1_LePS2_1	ETILKHLGLRDYFSEINTNPGY--VDGE-GRLRILP---YDF--NKASH 143
L.esculentum_Q8GRL8_LePS2_2	ETILKHLGLRDYFSEINTNPGY--VDGE-GRLRILP---YDF--NKASH 143
L.esculentum_Q8GUC1_LePS2_3	ETILKHLGLRDYFSEINTNPGY--VDGE-GRLRILP---YDF--NKASH 143
S.tuberosum_PGSC000DMT40001234	ETILKHLGIRDYFSEINTNPGY--VNEE-GRLRILP---YDF--NKASH 143
S.tuberosum_PGSC000DMT40001234	ETILKHLGIRDYFSEINTNPGY--VDEE-GRLRILP---YDF--NKASH 143
S.tuberosum_PGSC0003DMG4020048	ETILKHLGIRDYFSEINTNPGY--VDKE-GRLRILP---YDF--NKASH 143
L.esculentum_K4BMU1	ETILNHLGISDCFTEIHTNPGY--VDEE-GRLRIRP---HHDF--HTSSH 143
S.tuberosum_SGN-U278474	ETILNHLGISDCFTEIHTNPGY--VDEE-GKLRIRP---HHDF--HTSSH 143
V.vinifera_D7U028	ETILKHLGVMDCFSEINTNPSF--VDEE-GRLRIFP---YDF--NKASH 143
G.max_C6THU3	ETILKHLGVMDCFSEINTNPSF--VDEE-GRLRIFP---YDF--NKASH 143
G.max_K7M947	ETILKHLGVMDCFSEINTNPSF--VDEE-GRLRIFP---YDF--NKASH 143
P.vulgaris_E5D6S8_PvPS2-2	ERILKHLGVMDCFSDITANPSY--VNEE-GRLRIFP---YDF--NKASH 143
G.max_C6SZJ1	ETILKHLGVMDCFSDIVIANPIH--VNE--GRLNICP---YDF--NKASH 142
G.max_I1KGE5	ETILKHLGVMDCFSDIVIANPIH--VNE--GRLNICP---YDF--NKASH 142
G.max_I1KUW1	ETILKHLGVMDCFSEIVIANPSH--VNE--GRLNICP---YDF--NKASH 142
L.japonicus_I3T6F3	ETILKHLGVMDCFSEIVIANPSH--VNE--GRLNICP---YDF--NKASH 142
M.truncatula_B7FI56	ETILKHLGVMDCFSEIVIANPSH--VNE--GRLNICP---YDF--NKASH 142
P.trichocarpa_B9INJ1	ETILKHLGVMDCFSEIVIANPSH--VNE--GRLNICP---YDF--NKASH 142
V.vinifera_D7STM9	ETVLLKHLGMDCFSEINTNPSY--VDGE-GRLRILQ---YHVN--KFPSPH 144
R.communis_B9RKA9	ETVLLKHLGMDCFSEIKTNPSF--VDGE-GRLRILP---YHDL--KSSSH 142
S.tuberosum_PGSC0003DMP4000642	EKILDHHLGLGCFSEIITNPSL--VDDE-GRVIRP---PYHAL--GTPPH 143
A.thaliana_Q9SU92_AtPECP2	KTILKHHGLVLCFSEIYTNPTS--VDGE-GRLRIFP---YHDM--TSPH 142
A.lyrata_D7MCK8	EKILEHHDLDVCFSEIYTNPTS--LDDN-GNLRIL---PYHSD--ALPPH 143
V.vinifera_D7TBA2	EKILEHHDLDVCFSEIYTNPTS--LDDN-GNLRIL---PYHSD--ALPPH 143
G.max_C6SZJ9	ETILKHHGLLGFSEIYTNPTS--VDEE-GRLRIFP---YHDF--TLAPH 143
M.truncatula_G7LJK6	ETILKHHGLLGFSEIYTNPTS--VDEE-GRLRIFP---YHDF--TLAPH 143
P.patens_A9RMS9	QTIIEHHLNLCFSEIYTNPTS--VDDE-GRLRIFP---YHDF--TLAPH 143
S.moellendorffii_D8SBA0	QTIIEHHLNLCFSEIYTNPTS--VDDE-GRLRIFP---YHDF--TLAPH 143
P.sitchensis_A9NLR1	QTIIEHHLNLCFSEIYTNPTS--VDDE-GRLRIFP---YHDF--TLAPH 143
B.distachyon_I1HR17	ETILKHHGLLGFSEIYTNPTS--VDDE-GRLRIFP---YHDF--TLAPH 143
H.vulgare_F2DKT3	ETILKHHGLLGFSEIYTNPTS--VDDE-GRLRIFP---YHDF--TLAPH 143
O.glaberrima_I1NRA5	ETILKHHGLLGFSEIYTNPTS--VDDE-GRLRIFP---YHDF--TLAPH 143
O.sativa_Q8W0E7_OsACP1	ETILKHHGLLGFSEIYTNPTS--VDDE-GRLRIFP---YHDF--TLAPH 143
O.brachyantha_J3L3K4	ETILKHHGLLGFSEIYTNPTS--VDDE-GRLRIFP---YHDF--TLAPH 143
S.bicolor_C5XID0	ETVLEHHGIRGCFSEIYTNPSH--VDAD-GRLRIGP---YHAA--H 140
Z.mays_B6TXH8	ETVLEHHGIRGCFSEIYTNPSH--VDAD-GRLRIGP---YHAA--H 140
S.italica_K3XQG7	ETVLEHHGIRGCFSEIYTNPSH--VDAD-GRLRIGP---YHAA--H 140
Z.mays_B4F825	ETVLEHHGIRGCFSEIYTNPSH--VDAD-GRLRIGP---YHAA--H 140
O.glaberrima_I1NYN4	ETVLEHHGIRGCFSEIYTNPSH--VDAD-GRLRIGP---YHAA--H 140
O.sativa_Q6H6J4	ETVLEHHGIRGCFSEIYTNPSH--VDAD-GRLRIGP---YHAA--H 140
S.italica_K3YUH3	ETVLEHHGIRGCFSEIYTNPSH--VDAD-GRLRIGP---YHAA--H 140
Z.mays_C4JC34	ETVLEHHGIRGCFSEIYTNPSH--VDAD-GRLRIGP---YHAA--H 140
O.sativa_A2ZV38	ETVLEHHGIRGCFSEIYTNPSH--VDAD-GRLRIGP---YHAA--H 140
S.bicolor_C5XQ80	ETVLEHHGIRGCFSEIYTNPSH--VDAD-GRLRIGP---YHAA--H 140
B.distachyon_I1HP49	ETVLEHHGIRGCFSEIYTNPSH--VDAD-GRLRIGP---YHAA--H 140
	:: : : * : : ** : :

Motiv 3

A.thaliana_Q67YC0_AtPPsPase1	SCSCGT	CPPNMCK	GLIIERIQQSLA	---KEGK	-----K-KMIY	LDGAGDY	195
A.lyrata_D7KR62	GCSCGT	CPPNMCK	GLIIERIQQSLA	---KEGK	-----K-KMIY	LDGAGDY	194
A.thaliana_Q9FZ62_AtPECP1	GCSR	--CPPNMCK	GLIIDRIQASLT	---KEGK	-----TSKMIY	LDGAGDY	187
A.lyrata_D7KFI6	GCSR	--CPPNMCK	GLIIERIQASLT	---KEGR	-----KTMIY	LDGAGDY	187
P.trichocarpa_B9HM85	GCSL	--CPPNMCK	GLIIERIQASIS	---KEG	-----SKKIY	LDGAGDY	184
P.trichocarpa_B9MWQ6	CCSL	--CPPNMCK	GLIIERIQASIS	---KDG	-----SKKIY	LDGAGDY	190
R.communis_B9SN55	GCSL	--CQPNMCK	GHIIERIQASMS	---KEDK	-----SKKIY	LDGAGDY	184
R.communis_B9T693	CCSL	--CPPNMCK	GRIIE--NPNIF	---IQGG	-----EQRIY	LDGAGDY	180
G.max_C6TBH9	GCT	--LCPNMC	GLIIDRIQDSIS	---EEG	-----KKRMIY	LDGSGDY	183
G.max_1KGE6	GCS	--LCPNMC	GLIIDRIQDSIL	---EEG	-----KKRMIY	LDGSGDY	183
G.max_1lKUW2	GCS	--LCPNMC	GLIIDRIQDSIS	---QEG	-----NKRMIY	LDGSGDY	183
P.vulgaris_D7PEX6_PvHAD1	GCS	--LCPNMC	GLVIKRMQDSIS	---EE	-----DKRLIY	LDGSGDY	182
P.vulgaris_A4ZVI5_PvPS2	GCT	--LCPNMC	GLIIDRIQDSIS	---EE	-----DKRLIY	LDGSGDY	182
L.japonicus_I3S8Y2	GCCG	--LCPNMC	GLIIDRIQDSFS	---QDD	-----DKKIY	LDGAGDY	183
M.truncatula_I3SND6	GQNN	--VCPNMC	GLIIDKIKNTIY	---DGD	-----NKRFIY	LDGAGDY	185
M.truncatula_A2Q3B8	TCN	--LCPNMC	GLIIKRIQDSIS	---SEK	-----NKRFIY	LDGSGDY	183
M.truncatula_G7ZWH8	KCN	--LCPNMC	GLIIRIQESIS	---CEE	-----NKRFIY	LDGAGDY	182
G.max_1lMCY1	GCT	--LCPNMC	GGEIIEKIQDSIS	---SGE	-----KKRVIY	LDGSGDY	183
L.esculentum_Q9FPR1_LePS2_1	SC	--NLCPNMC	GMIVERIQA	----KEG	-----KKRMIY	LDGIGDF	180
L.esculentum_Q8GRL8_LePS2_2	GC	--NLCPNMC	GMIVERIQA	----KEG	-----KKRMIY	LDGIGDF	180
L.esculentum_Q8GUC1_LePS2_3	GC	--NLCPNMC	GMIVERIQA	----KEG	-----KKRMIY	LDGIGDF	180
S.tuberosum_PGSC000DMT40001234	GC	--NLCPNMC	GMIVERIQAAILA	---KEG	-----KKRMIY	LDGIGDF	183
S.tuberosum_PGSC000DMT40001234	GC	--NLCPNMC	GMIVERIQAASMT	---KEG	-----KKRMIY	LDGIGDF	183
S.tuberosum_PGSC0003DMG4020048	GC	--NLCPNMC	GRIVKRIQAAILA	---KEG	-----KKRMIY	LDGIGDF	183
L.esculentum_K4BMU1	GSSNT	CPPNMCK	GLVIKRIQASLA	---KEG	-----KKRMIY	LDGAGDY	185
S.tuberosum_SGN-U278474	GSSNT	CPPNMCK	GLVIKRIQASLA	---KEG	-----KKRMIY	LDGAGDY	185
V.vinifera_D7U028	GC	--SLCPNMC	GMVIKRIQAS	----IS	-----TEKFIY	LDGSGDF	180
G.max_C6THU3	GCN	--LCPNMC	GMITERIQNSVD	---AAGK	-----K--FIY	LDGSGDF	182
G.max_K7M947	GCKN	--PCPPNCK	GMITERIQNSVD	---AAGK	-----K--FIY	LDGSGDF	183
P.vulgaris_E5D6S8_PvPS2-2	GCN	--LCPNMC	GLVIERIQN-DG	---AEEK	-----K--YIY	LDGNGDF	181
G.max_C6SZJ1	GCN	--LCPNMC	GLVIERIQNSLA	---AAGK	-----KK-LIY	LDGNGDF	182
G.max_1lKGE5	GCN	--LCPNMC	GLVIERIQNSLA	---AAGK	-----KK-LIY	LDGNGDF	196
G.max_1lKUW1	GCN	--LCPNMC	GLVIERIQNSLA	---AAGK	-----KK-LIY	LDGNGDF	182
L.japonicus_I3T6F3	GCS	--LCPNMC	GLVMDRIQNSLD	---AAGK	-----KKFMIY	LDGSGDF	186
M.truncatula_B7FI56	GCN	--LCPNMC	GLVMEFQNSLD	---DEGK	-----KK-LIY	LDGSGDF	183
P.trichocarpa_B9INJ1	GCT	--SCPPNCK	GLVMKRIQASVS	---AEG	-----EKQFIY	VDGKNDF	181
V.vinifera_D7STM9	GCN	--FCPPNCK	GLVMRVRTSVS	---AEG	-----KKRVIY	LDGSAF	182
R.communis_B9RKA9	GCH	--LCPNLC	GLVINQICASTA	---EIEK	-----RRFIY	LDGSGDF	180
S.tuberosum_PGSC0003DMP4000642	GCN	--LCPNLC	-----IQASMS	---EKRK	-----SRFIY	LDERGDY	176
A.thaliana_Q9SU92_AtPECP2	SCN	--LCPNLC	GLVMDHLRASS	---NDQI	-----PRRFIY	LDGGGDF	184
A.lyrata_D7MCK8	SCN	--LCPNLC	GLVMDHIRASS	---NDQI	-----PRRFIY	LDGGGDF	184
V.vinifera_D7TBA2	GCS	--LCSYNCK	GLVIEQIRAAAS	---ENGK	-----KRFIY	VDGKGF	183
G.max_C6SZJ9	SCP	--LCPNMC	GLVIDQIRSSLLSGTGNEE	-----ERRFIY	IGDAGDY	189	
M.truncatula_G7LJK6	DCQ	--LCPNMC	GLVIDRIRGSLP	---ES	-----KTRFIY	VDGAGDY	182
P.patens_A9RMS9	GCK	--LCPNMC	GLIILDSVRLGSS	---ENL	-----NKRVIY	IGDGGDY	182
S.moellendorffii_D8SBA0	GCL	--ICPPNCK	GLIILD--RILSS	---KPA	-----ENRVVY	IGDGRDI	180
P.sitchensis_A9NLR1	GCE	--LCPNMC	GAIVDGIQRCFP	---PES	-----NKRFIY	LDGRGDF	182
B.distachyon_I1HR17	GCGVGT	CPPNMC	GQVLDLRIR	---ASSVG	-----KRVIY	LDGRGDY	179
H.vulgare_F2DKT3	GGLGT	CPPNMC	GQVLDLRIR	---ASSATADGT	-----KRFIY	LDGRGDY	186
O.glaberrima_I1NRA5	GGLGI	CPPNMC	GQVLDLRIR	---ASAGAAG	-----KRVIY	LDGRGDY	185
O.sativa_Q8W0E7_OsACP1	GGLGI	CPPNMC	GQVLDLRIR	---ASAGAAG	-----KRVIY	LDGRGDY	185
O.brachyantha_J3L3K4	GGLGI	CPPNMC	GQVLDLRIR	---ASAGAD	-----KRVIY	LDGRGDY	183
S.bicolor_C5XID0	GCGVGT	CPPNMC	GLVLDLRLREAAAGTTGRS	-----TKRVIY	LDGRGDY	186	
Z.mays_B6TXH8	GCGVGT	CPPNMC	GQVLDLRLREASSAAGR	-----KRVIY	LDGRGDY	185	
S.italica_K3XQG7	GCGVGT	CPPNMC	GQVLDLRLREAAA--GGGR	-----KRVIY	LDGRGDY	183	
Z.mays_B4F825	GCGVGT	CPPNMC	GLVLDLRLREAEAEAEETASS	-----AKPRVIY	LDGRGDY	191	
O.glaberrima_I1NYN4	GCLAT	CPPNMC	GKVMERIIDELSCGCGGAP	---AARRRRVVVY	VDGRGDY	196	
O.sativa_Q6H6J4	GCLAT	CPPNMC	GKVMERIIDELSCGCGGAL	---AARRRRVVVY	VDGRGDY	196	
S.italica_K3YUH3	GCLPS	CPPNMC	GKVMERILQEEEEAAVAAR	---RRRRVVVY	LDGRGDY	197	
Z.mays_C4JC34	GCLPT	CPPNMC	GKVMERILLQEEAAAAAAAAASAKS	RRRRVVVY	LDGRGDY	205	
O.sativa_A2ZV38	GCS	--LCPNMC	GKIIERIQATAN	---GKR	-----HFYIY	IGDGRDY	197
S.bicolor_C5XQ80	GCS	--LCPDNCK	GKIIERIQATAS	---DKKQ	-----HFYIY	IGDKGDY	190
B.distachyon_I1HP49	GCS	--LCPNMC	GKIIERIQATDS	---AKNK	-----HFYIY	IGDKGDY	183

\* \* \* \* \* : \* \*

HAD-Superfamilie Konsens: K - x(18-30) - (G/S;D/S)x3(D/N)

A.thaliana_Q67YC0_AtPPsPase1	CPSLKLNTEDYVMPRKNFPVWDLIS-QNPMLIKAAIREWTDGQSMEM	241
A.lyrata_D7KR62	CPSLKLNTEDYVMPRKNFPVWDLIS-QNPMLIKATIREWTDGQSLEM	240
A.thaliana_Q9FZ62_AtPECP1	CPSLGLKAEYVMPRKNFPVWDLIS-QNPMLVKATVRDWTGDGEDMER	233
A.lyrata_D7KFI6	CPSLGLKAEYVMPRKNFPVWDLIS-QNPMLVKATVRDWTGDGEDMER	233
P.trichocarpa_B9HM85	CPSLKLTEADYVMPRKNFPVWDLIS-KNPKLIKAEIHEWINDGAEMER	230
P.trichocarpa_B9MMQ6	CPSLKLTEADYVMPRKNFPVWDLIS-ENPLLVKAEIHEWINGAELEER	236
R.communis_B9SN55	CPSLKLTEADYVMPRKNFPVWDLIC-SNPMVIKAEIHEWTDGEELEGR	230
R.communis_B9T693	CPGLKLTHADYVMPRKNFPVWDLIC-GNPTPIRADIHEWTNGEEFER	226
G.max_C6TBH9	CPSLRLKERDFMMSRKNFPVWDLIC-KDPLLKAEIHGWSGDGEELEQ	229
G.max_lKGE6	CPSLRLKERDFMMPRKNFPVWDLIC-KDPLLKAEIHGWSGDGEELEQ	229
G.max_I1KUW2	CPSLRLKERDFMMPRKNFPVWDLIC-KDPLLKAEIHGWSGDGEELEQ	229
P.vulgaris_D7PEX6_PvHAD1	CPSLRLKEKDFMMPRKNFPVWALIC-RDPSAVKAEIHGWSGDGEELEQ	228
P.vulgaris_A4ZVI5_PvPS2	CPSLRLIEKDFMMPRKNFPVWDLIC-KDPSVVKAEIHGWSGDGEELEQ	228
L.japonicus_I3S8Y2	CPSLRLKQDFMMPRKNFPVWDLIC-KDPSLLKAEIHGWTGDGEELEQ	229
S.truncatula_I3SND6	CPSLRLKEDFVMPRKNFPVWDLIC-KDPSLVKAEIHGWSGDGEELEQ	231
M.truncatula_A2Q3B8	CPSLRLKEKDFVMPRKNFPVWDLIC-KDPSLVKAKIYEWSDGEEQER	229
M.truncatula_G7ZWH8	CPSLRLKEKDFVMPRKNFPVWDLIC-KDPSLVKAKIYEWSDGEEQER	228
G.max_I1MCY1	CPSLRLKDKDFVMPRKNFPVWELIC-KDPLLIKAEIHEWSDGEELEER	229
L.esculentum_Q9FPR1_LePS2_1	CPSLRLKEDFVMPRKNFPVWDLIC-KNRTLVKAGVHEWTNGKELEH	226
L.esculentum_Q8GRL8_LePS2_2	CPSLKLREADFVMPRKNFPVWDLIC-KNRTLVKAGVHEWTNGKELEH	226
L.esculentum_Q8GUC1_LePS2_3	CPSLKLSEADFVMPRKNFPVWDLIC-KNRTLVKATVHEWTNGQEELEH	226
S.tuberosum_PGSC000DMT40001234	CPSLKLMEADFVMPRKNFPVWDLIC-ENR TLVKAHVHEWTDGEEFEH	229
S.tuberosum_PGSC000DMT40001234	CPSLKLMEADFVMPRKNFPVWDLIC-KNR TLVKAHVHEWTDGEEFEH	229
S.tuberosum_PGSC0003DMG4020048	CPSLKLREADFVMPRKNFPVWDLIC-KNR TLVKAHVHEWTDGEELEER	229
L.esculentum_K4BMU1	CPSLKLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-ENHDLVKAEIHGWSGDGEEQEQ	231
S.tuberosum_SGN-U278474	CPSLKLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-ENRDLVKAEIHGWSGDGEEQEH	231
V.vinifera_D7U028	CPSLKLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-RNPNLIKAEVHGWTDGEELEH	226
G.max_C6THU3	CPSLKLKDRDYLMRKNFPVWDLIC-ENSKHIKAEVHAWRDGEELEH	228
G.max_K7M947	CPSLKLKDRDYLMRKNFPVWDLIC-ENSNLIKAEVHAWRDGEELEH	229
P.vulgaris_E5D6S8_PvPS2-2	CPSLKLKEDDYLMRKNFPVWDLIC-KNPNHIKPEVHAWRNGEELYD	227
G.max_C6SZJ1	CPSLKLKEDDYLMRKNFPVWDLIC-KNSNKIKAEVHAWRDGEELEH	228
G.max_I1KGE5	CPSLRLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-KNSNKIKAEVHAWRDGKELEH	245
G.max_I1KUW1	CPSLRLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-KNSNKIKAEVHAWRDGKELEH	228
L.japonicus_I3T6F3	CPSLKLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-KNSNAIKAEVHAWRDGAELN	232
M.truncatula_B7FI56	CPSLKLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-KNSNDIKAHVHAWRDGEELEH	229
P.trichocarpa_B9INJ1	CPALTLKETDALMPRKNFPVWELIC-NNKMLVEANIQEWSDWEELES	230
V.vinifera_D7STM9	CPSLKLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-SNPKLIKAEVHAWRDGEELEK	228
R.communis_B9RKA9	CPTLKLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-SNPTLVKAEVHAWRDGEELEQ	229
S.tuberosum_PGSC0003DMP4000642	CPTLKLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-SDPNLLKADYHEWSDGEELES	222
A.thaliana_Q9SU92_AtPECP2	CPTLKLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-DNPLLLKAEVKEWSSAEEQQR	230
A.lyrata_D7MCK8	CPTLKLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-DNALLIKAEVKEWSSAEELEQR	230
V.vinifera_D7TBA2	CPSLKLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-GDPMHIKAEVKEWSDGEELEK	229
G.max_C6SZJ9	CPTLKLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-SDPKLVAAQLHDWTDGEELET	235
M.truncatula_G7LJK6	CPTLKLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-SDPKLVHAKVHDWSDGEELES	228
P.patens_A9RMS9	CPSLKLKHGDHILARHGFPVWDLIC-ANIGSVKANLHEWTTARDEK	228
S.moellendorffii_D8SBA0	CPSLRLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-NNREIFKANLHLWSSPKDIEN	226
P.sitchensis_A9NLR1	CPSLKLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-QNPDLVKAQVHWSNAKDVED	228
B.distachyon_I1HR17	CPSLRLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-ENPGLLQAEVHPWSDGDMEE	225
H.vulgare_F2DKT3	CPSLRLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-ENPGLLQAEVHPWSDGDMEE	232
O.glaberrima_I1NRA5	CPSLRLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-EDPSLLQAEVHPWADGAEMEE	231
O.sativa_Q8W0E7_OsACP1	CPSLRLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-EDPSLLHAEVHWSADGAEMEE	231
O.brachyantha_J3L3K4	CPSLRLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-EDPSLLQAEVHPWTDGEELEH	229
S.bicolor_C5XID0	CPSLRLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-EDPARVQAEVHPWADGADLEE	232
Z.mays_B6TXH8	CPALRLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-EDPARLQAEVHPWADGAEELE	231
S.italica_K3XQG7	CPSLRLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-EDPAR--AEVHPWADGAEMEA	227
Z.mays_B4F825	CPALRLKQDFVMPRKNFPVWDLIC-EDPARLQAEVHPWTDGEELEH	237
O.glaberrima_I1NYN4	CPSLKLTEMVMPRKNFPVWDLIAGGDRAAVRADVREWADFEDLEA	243
O.sativa_Q6H6J4	CPSLKLTEMVMPRKNFPVWDLIAGGDRAAVRADVREWADFEDLEA	243
S.italica_K3YUH3	CPSLKLKQDFVMPRKNFPVWDLIAGGDRAAVRADVREWADFEDLAR	241
Z.mays_C4JC34	CPSLKLKQDFVMPRKNFPVWDLIAGGDRAAVRADVREWADFEDLAR	249
O.sativa_A2ZV38	CPSLKLKQDFVMPRKNFPVWDLIAGGDRAAVRADVREWADFEDLAR	243
S.bicolor_C5XQ80	CPSLKLKQDFVMPRKNFPVWDLIAGGDRAAVRADVREWADFEDLEK	236
B.distachyon_I1HP49	CPSLKLKQDFVMPRKNFPVWDLIAGGDRAAVRADVREWADFEDLER	229

\* : . :

A.thaliana_Q67YC0_AtPPsPase1	ILIGTIEEIRLEEEKE-----KMLTSAENNCQMOTISIGINNVHHEP	283
A.lyrata_D7KR62	ILIGTIEEIILEEKE-----KMLTSAENNCKLQTVISVGINNVHHEP	282
A.thaliana_Q9FZ62_AtPECP1	ILMEIINEIMSSEEGE-EN---DKMLSS--ENCK---ISVGI---VHEP	270
A.lyrata_D7KFI6	ILMEIINEIMSLEEEE-DQ---DKMLSS--ENCK---ISVGI---VHEP	270
P.trichocarpa_B9HM85	VLLQIIERISREEINS-NS---AKLFSAD---CKLQTVISAG----HD	267
P.trichocarpa_B9MWQ6	VLLQIIERISTDEISS-NS---AQLLSAD---CKLQTVISIAA---HE	273
R.communis_B9SN55	VLIETIDRICLEERNG-SS---DQLFSSD---CKLQTVISIA-----	264
R.communis_B9T693	VLLRIIDSISMNES-----AQFSTD---SKLMPPIPIA----HE	258
G.max_C6TBH9	VLLHLINKISMEEN-----AQFISSD---CKLQTVISVS----ALE	262
G.max_1KGE6	VLLHLINKISMEEN-----AQFISSD---CKLQTVISVS----AHE	262
G.max_I1KUW2	VLLHLINKISMEENVH-----EQLIASD---CKLQTVISVS---A--	262
P.vulgaris_D7PEX6_PvHAD1	VLVHLISKVSMEHN-----SPFISSD---CKLQTVISVS----AHE	261
P.vulgaris_A4ZVI5_PvPS2	VLLQLISKVSMEHN-----SPFITSD---CKLQTVISVS----VLE	261
L.japonicus_I3S8Y2	VLLQLISQISMEKD-----ALFMSSD---CKTQTLLIS----AHE	262
M.truncatula_I3SND6	ILLIQLINKIIEEDN-----VQFIATD---CKLQTVISIH----VLE	264
M.truncatula_A2Q3B8	VLLHLINKISMEES-----AQFISTE---FNMHTPSFS----AHE	262
M.truncatula_G7ZWH8	VLLHLINKISMEET-----AEFISTE---FKLQTVISVS----THE	261
G.max_I1MCY1	ISLQLINKISLGES-----AQNISAD---CKLET-----IRE	258
L.esculentum_Q9FPR1_LePS2_1	ILLQWINTINIEE-----SQLLSMEN--CKFQTKHNAA----HG	259
L.esculentum_Q8GRL8_LePS2_2	ILLQWINTINIEE-----SQLLSMEY--CKFQTKPNAD----HG	259
L.esculentum_Q8GUC1_LePS2_3	ILLQWINTINIEE-----SQLLSVDY--CKLVMTSKAA----HG	259
S.tuberosum_PGSC000DMT40001234	ILLQWINTINIEE-----NQLLSVEY--CKFQTKMSKE----	259
S.tuberosum_PGSC000DMT40001234	ILLQWINTINIEE-----SRLLSVEY--CKFQTKMSKAT----HG	262
S.tuberosum_PGSC0003DMG4020048	ILLQWINTINIEE-----SQLLSLEF--CKFQTKPKAA----HG	262
L.esculentum_K4BMU1	ILLQIKTISMED-----NQFLSVD--CKFQTKPINAV----HE	264
S.tuberosum_SGN-U278474	ILLQIKTISMED-----NQFLSVD--CKFQTKPINAV----HE	264
V.vinifera_D7U028	GLLHLIKKISEENNAN--NNSAA--AQLISVD--CKFETMAAQA-----	264
G.max_C6THU3	VLLHFIDKAIGE--GNK--NISS--TPIVSD--CKLGSISIEAHK-----	267
G.max_K7M947	VLLHFINKAIGE--GNG--SISS--TPIISVD--CKLEFN-----	262
P.vulgaris_E5D6S8_PvPS2-2	VMLHIINKIIGEEGKN--SVSSSTPTISID--CKLGSISIDLHNN----	269
G.max_C6SZJ1	VLLHVIDKEIGE--RN--NINNS--TQKVSVD--CKMGPIAIDTRQ-----	266
G.max_I1KGE5	VLLHVINKAIGE--GN--NINNS--TQKVSVD--CKMGPIAIDTRQ-----	283
G.max_I1KUW1	VLLHVINKAIGE--GS--NINNS--TQKVSVD--CKMGPIPIDTLQ-----	266
L.japonicus_I3T6F3	VLLHIINKTINGEGSN--GTSGS--TPIISVD--CKFGTISIDGHN----	272
M.truncatula_B7FI56	VLLHIINKANIGKGN--IVG--PKIISVD--CKMGNISIDAHK-----	266
P.trichocarpa_B9INJ1	KLHNLNTIFIEEKCS--VRA--DQLVPVD--CKFQTVSSIS-----	265
V.vinifera_D7STM9	ILLHLITTISIEEKN--MRS--DKCQASS--MDSHKTFQS-----	263
R.communis_B9RKA9	ILLHLINTIFTAKNIQ--SSNSNQLN-----	253
S.tuberosum_PGSC0003DMP4000642	ILL-----	225
A.thaliana_Q9SU92_AtPECP2	ILLQLVSTITKEEDS-----	245
A.lyrata_D7MCK8	ILLQLVSTITKE-----	242
V.vinifera_D7TBA2	VLLHLIDTISIEENIS--NGTSTQSKSSQSVSENAATHP-----	267
G.max_C6SZJ9	ILLNLINKISL-----	246
M.truncatula_G7LJK6	ILLNLVNKAT-----	238
P.patens_A9RMS9	LFRTLLLT-----	236
S.moellendorffii_D8SBA0	HLLDILDLRAT-----	237
P.sitchensis_A9NLR1	CLCKLLMP-----	236
B.distachyon_I1HR17	TLLRLVR-----KVLVEESRLLPLD---CKLES-LPVAAVQDG	260
H.vulgare_F2DKT3	TLLRLIS-----RVLVEESQLLPLD---CKLES-LPVA-VQDG	265
O.glaberrima_I1NRA5	TLLRLVG-----RVLLEERNLPLD---CKLES-LPVAVAVQDG	265
O.sativa_Q8W0E7_OsACP1	TLLRLVG-----RVLLEERNLPLD---CKLES-LPVAVAVQDG	265
O.brachyantha_J3L3K4	TLLRLGGGGVGG---GVLLEARNLPLD---CKLES-LPVAVAVQDG	269
S.bicolor_C5XID0	TLLRLVG-----RALVEEAALPPP---LDCKLESTMPVAAQDGG	268
Z.mays_B6TXH8	TLLRLVG-----RARVEEAALPPP---LDCKLES-MPVAAQEGM	266
S.italica_K3XQG7	TLLGLVR-----RVLVEDAALLP---LDCKLESSIPVTAQDGG	263
Z.mays_B4F825	TLLRLVR-----RAVVEDAALPPPPPLDCKLES-MPVAAQDG-	275
O.glaberrima_I1NYN4	VLLGIVAECLTS-----EHDDADDDGGEAAPPACRALPATLASVQEA	286
O.sativa_Q6H6J4	VLLGIVAECLTS-----EHDDADDDGGEAAPPACRALPATLASGQEA	286
S.italica_K3YUH3	VLLGIVDEIARAAVTTTTEQDDAAAMNAAVVGAVVVPDCRALPARQEA	291
Z.mays_C4JC34	VLLGIVDGEIAR-----AAAEEGAGAVVVV---VPARQEA-	282
O.sativa_A2ZV38	TLLKLVNKLITPP-----AQPSQFEY-KCDMSNPVSTEVG--QAL	280
S.bicolor_C5XQ80	TLLKLVSKMIAAP-----AQASQFDYSKCEMSNPAIQHP----AL	272
B.distachyon_I1HP49	ILLQLVKNLITPP-----AQVTQVDY-KCEISNPVSKVEVGHQTL	268

A.thaliana_Q67YC0_AtPPsPase1	ILPRALRVSQSS-----	295
A.lyrata_D7KR62	ILPRALRVSQSS-----	294
A.thaliana_Q9FZ62_AtPECP1	-----IQVPLNLVK-----	279
A.lyrata_D7KFI6	MVPLALQVPLNLVK-----	284
P.trichocarpa_B9HM85	AMPQALSVTQ-----	277
P.trichocarpa_B9MWQ6	GLPQPLSVTQ-----	283
R.communis_B9SN55	ALPQAVPVR-----	274
R.communis_B9T693	ALPRQ-----	263
G.max_C6TBH9	GLPKALPVR-----	272
G.max_1KGE6	DLPKVLVPR-----	272
G.max_I1KUW2	-----	
P.vulgaris_D7PEX6_PvHAD1	AIPKALPVR-----	271
P.vulgaris_A4ZVI5_PvPS2	ALPKALPLR-----	271
L.japonicus_I3S8Y2	PLPKVLHVRPKLESLPVAVQDGVPMPLGVKN	293
M.truncatula_I3SND6	SLPKALPVG-----	274
M.truncatula_A2Q3B8	TLPKALHVLL-----	272
M.truncatula_G7ZWH8	AMPKALRVLH-----	271
G.max_I1MCY1	PFQVLLAHR-----	268
L.esculentum_Q9FPR1_LePS2_1	ALPRPLPVPY-----	269
L.esculentum_Q8GRL8_LePS2_2	ALPRPLPVPY-----	269
L.esculentum_Q8GUC1_LePS2_3	ALPQALPVPY-----	269
S.tuberosum_PGSC000DMT40001234	ALPLALPVPY-----	269
S.tuberosum_PGSC000DMT40001234	ALPPALPVPY-----	272
S.tuberosum_PGSC0003DMG4020048	ALPQALPVPY-----	272
L.esculentum_K4BMU1	AITKALPVPY-----	274
S.tuberosum_SGN-U278474	AMPKALPVPY-----	274
V.vinifera_D7U028	-LPQALPVPH-----	273
G.max_C6THU3	PLPRAIPVPQ-----	277
G.max_K7M947	-----	
P.vulgaris_E5D6S8_PvPS2-2	PLPKALPVPQ-----	279
G.max_C6SZJ1	PLPKALSVSY-----	276
G.max_1KGE5	PLPKALSVPQ-----	293
G.max_I1KUW1	PLPKALSVPQ-----	276
L.japonicus_I3T6F3	PFPKALSVP-----	282
M.truncatula_B7FI56	HFPKALSVPN-----	276
P.trichocarpa_B9INJ1	APAFQFLSRC-----	275
V.vinifera_D7STM9	VLPVPH-----	269
R.communis_B9RKA9	-----	
S.tuberosum_PGSC0003DMP4000642	-----	
A.thaliana_Q9SU92_AtPECP2	-----	
A.lyrata_D7MCK8	-----	
V.vinifera_D7TBA2	-----	
G.max_C6SZJ9	-----	
M.truncatula_G7LJK6	-----	
P.patens_A9RMS9	-----	
S.moellendorffii_D8SBA0	-----	
P.sitchensis_A9NLR1	-----	
B.distachyon_I1HR17	MPMP-LGVKN-----	270
H.vulgare_F2DKT3	MPMP-LGVKN-----	274
O.glaberrima_I1NRA5	MPMT-LRIKN-----	274
O.sativa_Q8W0E7_OsACP1	MPMT-LRIKN-----	274
O.brachyantha_J3L3K4	MPMP-LRIKN-----	278
S.bicolor_C5XID0	MPIMPLGVKN-----	278
Z.mays_B6TXH8	GPIMPLGVKH-----	276
S.italica_K3XQG7	MPIMPLGVKN-----	273
Z.mays_B4F825	MPIVPLGVKN-----	285
O.glaberrima_I1NYN4	ILPKAVHVPN-----	296
O.sativa_Q6H6J4	ILPKAVHVPN-----	296
S.italica_K3YUH3	LLPQAVRVPN-----	301
Z.mays_C4JC34	LMPQAVRVPN-----	292
O.sativa_A2ZV38	RVPH-----	284
S.bicolor_C5XQ80	RVPH-----	276
B.distachyon_I1HP49	PVPN-----	272

## Danksagung

Von den vielen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, möchte ich mich besonders bei meiner Betreuerin, Frau PD Dr. Margret Köck, für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppe und für die Möglichkeit, dieses vielseitige Thema bearbeiten zu dürfen, bedanken. Ich fand in ihr stets eine interessierte und konstruktive Diskussionspartnerin und bin sehr dankbar für ihre Unterstützung. Vielen Dank auch für das in mich gesetzte Vertrauen und die Erfahrungen, die ich in den letzten fünf Jahren in ihrer Arbeitsgruppe sammeln durfte.

Bei den Gutachterinnen bzw. Gutachtern, bedanke ich mich sehr für ihre Bereitschaft, ein Gutachten zu meiner Dissertation zu erstellen. Des Weiteren für die Zeit, die sie dafür erübrigen und für das damit gezeigte Interesse an meiner Arbeit.

Ein ganz besonderer Dank geht an das Institut für Biochemie und Biotechnologie der MLU Halle-Wittenberg, Abteilung Enzymologie, Herrn PD Dr. Stefan König und Herrn Dipl.-Biochem. Michael Spinka, für die sehr gute Zusammenarbeit während der Kooperation zur enzymatischen und strukturellen Aufklärung der AtPECP1. Herrn PD Dr. König danke ich für die Möglichkeit, mit ihm und seinem Team im Deutschen Synchrotron Forschungszentrum (DESY) in Hamburg mitarbeiten zu dürfen und für seine Unterstützung bei der schwierigen Auswertung meiner Ergebnisse. Herrn Dipl.-Biochem. Michael Spinka danke ich für die konstruktive Erarbeitung der Publikation zur AtPECP1 und für sein zur Verfügung gestelltes umfangreiches Wissen auf dem Gebiet der Enzymologie.

Mein herzlicher Dank geht an Herrn Dr. habil. Harry Schmidt vom Institut für anorganische Chemie der MLU Halle-Wittenberg. Ich danke ihm sehr für die Beantwortung aller Fragen auf dem Gebiet der Phosphorchemie und für die Möglichkeit, einige Phosphorylverbindungen unter seiner Betreuung synthetisieren zu dürfen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Frank Hirche vom Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften der MLU Halle-Wittenberg für die Bereitschaft zur Kooperation und der damit verbundenen Quantifizierung der Metabolite der AtPECP1-Reaktion. Es würde mich sehr freuen, wenn unsere im letzten Abschnitt der Promotion begonnene Kooperation sich über diese Arbeit hinaus erweitern ließe. Ein großer Dank geht an das Leibniz-Institut für Pflanzenbiochemie Halle, an Frau Prof. Sabine Rosahl, für die Überlassung des Plasmiden *pORFStPPP* und an Herrn PD Dr. Michael Walter, für die Bereitstellung der Reispflanzen zur weiteren Verwendung in dieser Arbeit.

Den Biochemie-Studierenden Katharina Becker, Kristin König, Annekatri Missal und Martin Tannert danke ich für Ihren großen Fleiß während der Erarbeitung ihrer Bachelorarbeit und dem damit verbundenen Interesse für mein Promotionsthema. Ganz besonders danke ich Martin Tannert für die zusätzliche Hilfe bei der enzymatischen Aufklärung der AtPECP2.

Ich danke meinen Kollegen, Frau Karin Klar und Frau Daniela Ditfe, für die Unterstützung bezüglich dieser Arbeit in allen praktischen und theoretischen Dingen. Daniela Ditfe möchte ich für Ihre langjährige Freundschaft danken, die über das Studium hinaus bestehen blieb.

Meiner ganzen Familie danke ich für ihre Unterstützung in alltäglichen Dingen und ihrer Ermutigung.  
Meiner Tochter Anastasia May danke ich von ganzem Herzen für ihre Geduld und für ihr großes  
Verständnis für die oftmals zu kurz gekommene Zeit.

**Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich mich mit der vorliegenden Arbeit erstmals um die Erlangung des Doktorgrades bewerbe, die Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel angefertigt und die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Halle, den 03.03.2014

---

Anett May

## Lebenslauf

### Persönliche Informationen:

Name: Anett May  
 Geburtstag/u. -ort: 21.01.1974 in Halle (Saale)  
 Familienstand: verheiratet, ein Kind (geb. 24.12.2003)

### Werdegang:

09/1980 – 07/1990 Schulausbildung (Erweiterte Oberschule „Wittekind“, Giebichenstein)  
 09/1990 – 07/1993 Berufsausbildung (Landgericht Halle, Hansering 13, 06108 Halle)  
 IHK-Abschluss als Bürokauffrau  
 07/1993 – 03/1994 Geschäftsstellenverwalterin der 1./2. Zivilkammer des Landgerichtes  
 Bestellung als Urkundsbeamte  
 04/1994 – 06/1995 Angestellte Krüger GmbH Bergisch Gladbach, Außenstelle Halle  
 06/1995 – 08/2000 Angestellte der Kathi Halle GmbH, Berliner Straße 216, 06116 Halle  
 09/2000 – 07/2003 Studierende des 2. Bildungswegs, Kolleg & Abendgymnasium Halle  
 Abschluss: Abitur (Schwerpunkt: Naturwissenschaften)  
 08/2003 – 09/2004 Erziehungsurlaub  
 10/2004 – 07/2009 Studierende der Naturwissenschaftlichen Fakultät I, Diplom-Biochemie  
 08/2009 – bis heute Diplom-Biochemikerin und Mitarbeiterin der AG PD Dr. Margret Köck,  
 biowissenschaftliche Forschung/Radionuklidlabor, Weinbergweg 22,  
 06120 Halle (Saale)  
 zusätzl. Qualifikation: Zertifikat über die Fachkunde im Strahlenschutz (Fachkundegruppen:  
 (09/2012) S 2.2, S 4.1)

### Teilnahme an Tagungen:

09/2009: Botanikertagung Leipzig, 1 x Posterbeitrag  
 09/2011: Botanikertagung Berlin, 2 x Posterbeiträge

### Publikationen:

May A., Berger S., Hertel T., Köck M. (2011): The *Arabidopsis thaliana* phosphate starvation responsive gene *AtPPsPase1* encodes a novel type of inorganic pyrophosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta, General Subjects*, 1810 (2), 178-85.

May A., Spinka M., Köck M. (2012): *Arabidopsis thaliana* PECP1 - enzymatic characterization and structural organisation of the first plant phosphoethanolamine/phosphocholine phosphatase. *Biochimica et Biophysica Acta. Protein and Proteomics*, 1824, 319-325.