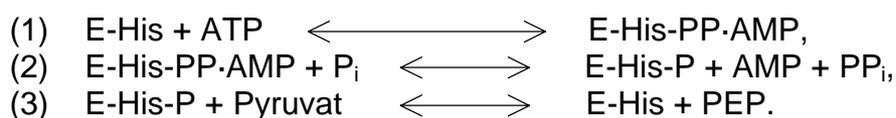


## 1. Einleitung

### 1.1. Pyruvat, Phosphat Dikinase

Pyruvat, Phosphat Dikinase (PPDK) ist ein Enzym, das die Umwandlung von Adenosintriphosphat (ATP), Phosphat (Pi) und Pyruvat zu Adenosinmonophosphat (AMP), Pyrophosphat (PPi) und Phosphoenolpyruvat (PEP) katalysiert. Es geschieht in drei  $Mg^{2+}$ - und  $NH_4^+$ -abhängigen partiellen Reaktionen ([Abb. 1-1](#)), die Phosphat und Pyrophosphat als Zwischenprodukte haben (Wood *et al.*, 1977; Carroll *et al.*, 1989). Das Protein ist in drei Domänen gegliedert. Die N-terminale Domäne des Proteins bindet ATP (Carroll *et al.*, 1989) und Pi (McGuire *et al.*, 1998), während die C-terminale Domäne Pyruvat binden kann (Yankie *et al.*, 1995). Die zentrale Domäne enthält die katalytische His-Stelle (Herzberg *et al.*, 1996). Die in [Abb. 1-1](#) gezeigten Reaktionen sind umkehrbar und die Reaktionsrichtung variiert in den Zellen verschiedener Organismen (glykolytische Synthese von ATP oder PEP-Synthese).



**Abb. 1-1:** Chemische Schritte der PPDK-Katalyse.

E, E-P und E-PP bedeutet das freie Enzym, Phosphorylenzym beziehungsweise Pyrophosphorylenzym.

### 1.2. PPDK in verschiedenen Organismen

Die PPDK ist in einigen anaeroben Protisten, zahlreichen Bakterien und vielen Pflanzen gefunden worden (Ronimus und Morgan, 2003), während sie in Säugetierzellen nicht vorhanden ist (Maldonado und Fairlamb, 2001). Die Richtung

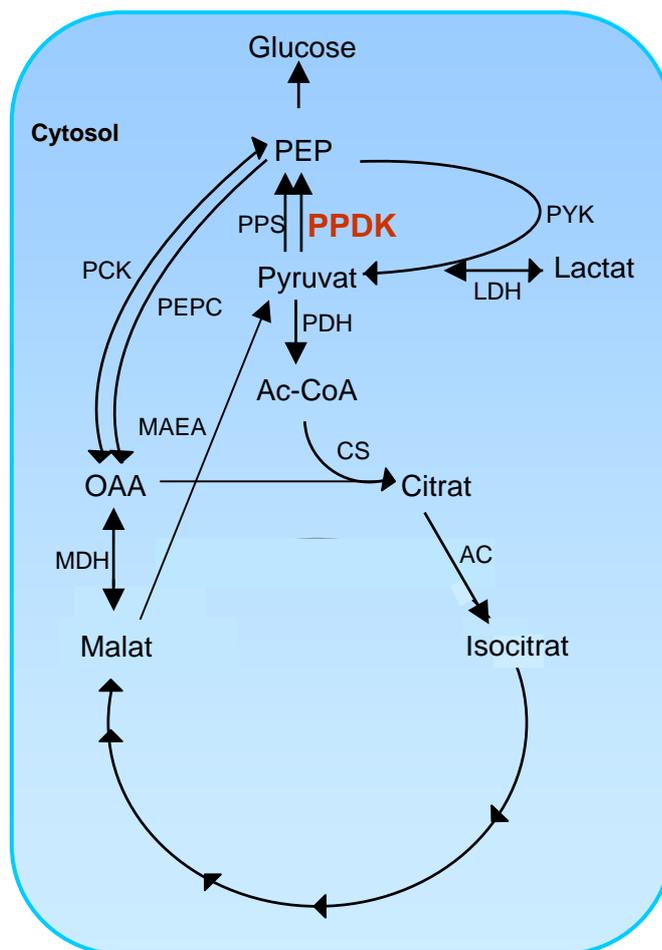
der PPDK-Reaktion in den verschiedenen Organismen hängt von den Konzentrationen der Reaktionspartner ab.

### 1.2.1. Rolle der PPDK in Bakterien

Der Mechanismus der PPDK-Reaktion wurde zuerst in bakteriellen Systemen untersucht und die Enzymaktivität bei verschiedenen Arten beschrieben. Unter anderem in photosynthetischen Bakterien wie *Rhodospirillum rubrum*, *Chromatium* spp. und *Chlorobium thiosulfatophilum* (Buchanan, 1974), obligaten Anaerobiern wie *Propionibacterium shermanii* (Wood, 1985) und stickstofffixierenden Bakterien wie *Rhodopseudomonas palustris* (Inui *et al.*, 1999) und *Rhizobium meliloti* (Osteras *et al.*, 1997).

Die PPDK katalysiert in Zusammenarbeit mit dem Malat-Enzym einen gluconeogenetischen Weg für Bakterien, der unabhängig von dem Enzym Phosphoenolpyruvat Carboxykinase (PCK) ist (Abb. 1-2). Es kann für den Organismus vorteilhaft sein, einen sekundären glukoneogenetischen anaplerotischen Weg für die Aufrechterhaltung der Bilanz von dazwischenliegenden Metaboliten zu haben (Osteras *et al.*, 1997).

In einigen Organismen ist die Relevanz von Pyrophosphat im glykolytischen Stoffwechsel durch Forschung an energiearmen anaerobischen Mikroorganismen aufgedeckt worden. Zum Beispiel in Spezies wie *P. shermanii*, die keine Phosphofruktokinase (PFK) haben, wird Fru-6-P mittels einer PPI-abgängigen Phosphofruktokinase (PFP) zu Fru-1,6-Biphosphat umgewandelt. Des weiteren besitzen sie auch keine Pyruvat Kinase, aber sie verwenden Pyrophosphat zur Umwandlung von PEP zu Pyruvat durch den PPDK-Weg, dadurch wird die gespeicherte Energie im Pyrophosphat auf ein AMP übertragen und ein energiereiches ATP gewonnen. PFP und PPDK sind in diesen Organismen theoretisch dazu fähig, durch den Abbau eines Moleküls Glukose zu Pyruvat fünf ATP statt zwei zu gewinnen (Plaxton, 1996).



**Abb. 1-2:** Glukoneogenetische Rolle der PPDK in Bakterien.

AC: Aconitase; Ac-CoA: Acetyl-Coenzym A; LDH: Lactat-Dehydrogenase; MAEA: Malat-Enzyme-NAD-verbunden; MDH: Malat-Dehydrogenase; OAA: Oxalacetat; PCK: Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase; PDH: Pyruvat-Dehydrogenase; PEP: Phosphoenolpyruvat; PEPC: Phosphoenolpyruvat-Carboxylase; PPDK: Pyruvat, Phosphat Dikinase; PPS: Phosphoenolpyruvat-Synthase; PYK: Pyruvat Kinase.

### 1.2.2. Rolle der PPDK in Protisten

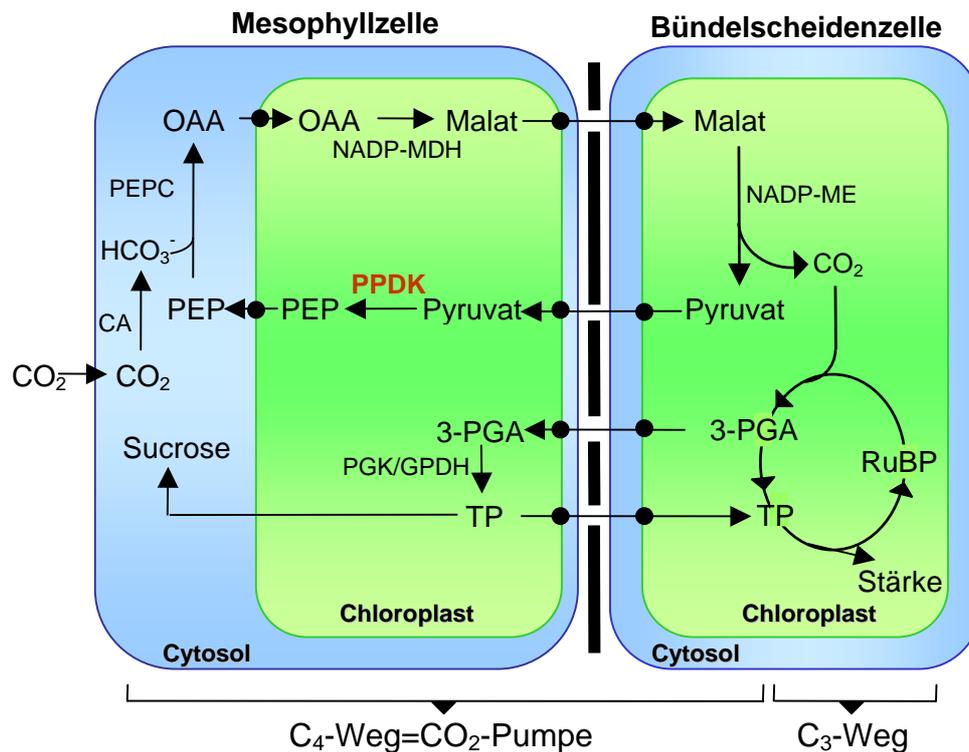
Die PPDK in Protisten ist als ein PPI-abhängiges Enzym charakterisiert worden, welches mit der Glykolyse zusammenhängt. Die primitivsten Protisten (*Giardia*, *Trichomonas* und *Entamoeba*), die in Anoxybiose leben und keine metabolischen Kompartimente haben, entwickelten eine PPI-abhängige Glykolyse, welche effizienter ist, als die konventionelle, da fünf (anstatt zwei) ATP-Moleküle pro Molekül Glucose produziert werden können (Plaxton, 2002). In *Trypanosoma brucei*

ist die PPK in den „Glykosomen“ gefunden worden, die spezielle Peroxisomen sind und alle Enzyme des Glukoseabbaus enthalten (Coustou *et al.*, 2003, Hannaert *et al.*, 2003). Dort würde die PPK Pyrophosphat verbrauchen, welches im Glykosom existieren könnte, da es in diesem Organell keine Pyrophosphatase-Aktivität gibt. Eine mögliche Rolle der PPK könnte in diesem Fall die Produktion von PEP aus dem cytosolischen Pyruvat, welches aus L-Malat des Zitratzyklus stammt, sein. Die PPK-Aktivität könnte den ersten Schritt einer glykosomischen Glukoneogenese bedeuten (Bringaud *et al.*, 1998).

### 1.2.3. Rolle der PPK in C<sub>4</sub>-Pflanzen

C<sub>4</sub>-Pflanzen umfassen einige der wichtigsten Anbaupflanzen der Welt (z. B. Mais, Sorghum), Futterpflanzen (z. B. *Panicum maximum*), und schädliche Unkräuter (z. B. *Echinochloa*). Sie zeigen ein besonderes Schlüsselmerkmal: die räumliche Aufteilung des photosynthetischen Apparates zwischen Mesophyll- und Bündelscheidenzellen (Ghannoum *et al.*, 2000).

Diese Pflanzen können biochemisch und anatomisch klassifiziert werden. Biochemisch sind sie bezüglich der benutzten primären C<sub>4</sub>-Carbonsäure in der C<sub>4</sub>-Photosynthese in die drei folgenden Kategorien eingeordnet: NADP-Malat-Enzym (NADP-ME), NAD-Malat-Enzym (NAD-ME) und PEP Carboxykinase (PEP-CK) (Edwards *et al.*, 2004). Der C<sub>4</sub>-Weg besteht aus drei Hauptschritten und ist in der [Abb. 1-3](#) dargestellt (Leegood, 2002; Jeanneau *et al.*, 2002; Miyao, 2003): 1) Bei der Kohlendioxydfixierung wird im Cytosol der Mesophyllzellen mittels Phosphoenolpyruvat Carboxylase (PEPC) eine C<sub>4</sub>-Säure gebildet; 2) Decarboxylierung der C<sub>4</sub>-Säure in den Bündelscheidenzellen unter Freisetzung von CO<sub>2</sub>, und; 3) Regeneration des primären Kohlendioxyd-Akzeptors (PEP) in den Chloroplasten der Mesophyllzellen.



**Abb. 1-3:** Darstellung der Rolle des Enzyms PPDK in C<sub>4</sub>-Pflanzen.

CA: Carbonanhydrase; CO<sub>2</sub>: Kohlendioxyd; GPDH: Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Bicarbonat; NADP-MDH: NADP-Malat-Dehydrogenase; NADP-ME: NADP-Malat-Enzym; OAA: Oxalacetat; PGK: Phosphoglycerat-Kinase; PEPC: Phosphoenolpyruvat Carboxylase; PEP: Phosphoenolpyruvat; 3-PGA: 3-Phosphoglycerat; PPDK: Pyruvat, Phosphat Dikinase; RuBP: Ribulose1-5-phosphat; TP: Triosephosphat; ●: Translokator.

In allen Subtypen ist diese Regeneration von PEP durch das Enzym PPDK katalysiert. Die PPDK ist durch eine schnell umkehrbare Proteinphosphorylierung mittels eines bifunktionellen regulatorischen Proteins (RP) lichtabhängig reguliert (Fukayama *et al.*, 2001; Miyao, 2003). Das RP inaktiviert die PPDK bei Dunkelheit durch eine ADP-abhängige Phosphorylierung und aktiviert PPDK bei Licht durch Dephosphorylierung des selben Threonins (Sheen, 1999; Fukayama *et al.*, 2001).

#### 1.2.4. Rolle der PPK in CAM-Pflanzen

Der Crassulaceensäure-Stoffwechsel (CAM) ist eine spezielle Art der photosynthetischen Kohlendioxydassimilierung als Antwort auf ungewöhnliche Umweltbedingungen. Bis heute weiß man, dass ca. 7 % der Pflanzenspezies (gruppierte in 33 Familien und 328 Gattungen) eine Kapazität für den CAM-Stoffwechsel besitzen. Eine taxonomische Vielfalt spiegelt sich in der Reichweite des Lebensraumes wider, die die CAM-Pflanzen begünstigt. Sie reicht von Trockengebieten, über den tropischen Regenwald bis zu Wasserökosystemen (Borland und Taybi, 2004). Im Unterschied zu C<sub>4</sub>-Pflanzen sind Carboxylierung und Decarboxylierung nicht räumlich, sondern zeitlich getrennt (Abb. 1-4). Auf diese Weise fixieren die CAM-Pflanzen CO<sub>2</sub> nachts und setzen es tagsüber, wenn der lichtabhängige C<sub>3</sub>-Cyclus stattfindet, wieder frei (Cushman und Bohnert, 1999). Abhängig vom Decarboxylierungsprozess können die CAM-Pflanzen in zwei Gruppen unterteilt werden. Einerseits gibt es die Phosphoenolpyruvat Carboxykinase-Pflanzen (PCK-CAM) und andererseits die sogenannten Malat-Enzym-Pflanzen (ME-CAM). Unter den PCK-CAM-Pflanzen wird das produzierte Oxalacetat aus Malat durch die Pyruvat-Carboxykinase decarboxyliert. Bei ME-CAM Pflanzen wird das Malat durch das Malat-Enzym in den Chloroplasten zu Pyruvat und CO<sub>2</sub> decarboxyliert, wie es in der Abb. 1-4 dargestellt ist. Das Pyruvat wird durch die PPK-Katalyse zu PEP phosphoryliert und dieses nach dem Transport ins Cytosol in der Glukoneogenese konserviert. In Folgenden wird Glucose-6-Phosphat wieder in den Chloroplasten transportiert und im Form von Stärke gespeichert. Die Stärke in den Chloroplasten wird in der Nacht zu Triosephosphat abgenaut. Die ins Cytosol transportierten Triosephosphat werden glycolytisch zu PEP umgewandelt. So bedeutet die PPK-Reaktion den Anfangspunkt der Glukoneogenese und nicht der Regeneration des CO<sub>2</sub>-Akzeptors (Heldt, 1999; Kondo *et al.*, 2000; Buchanan *et al.*, 2000).

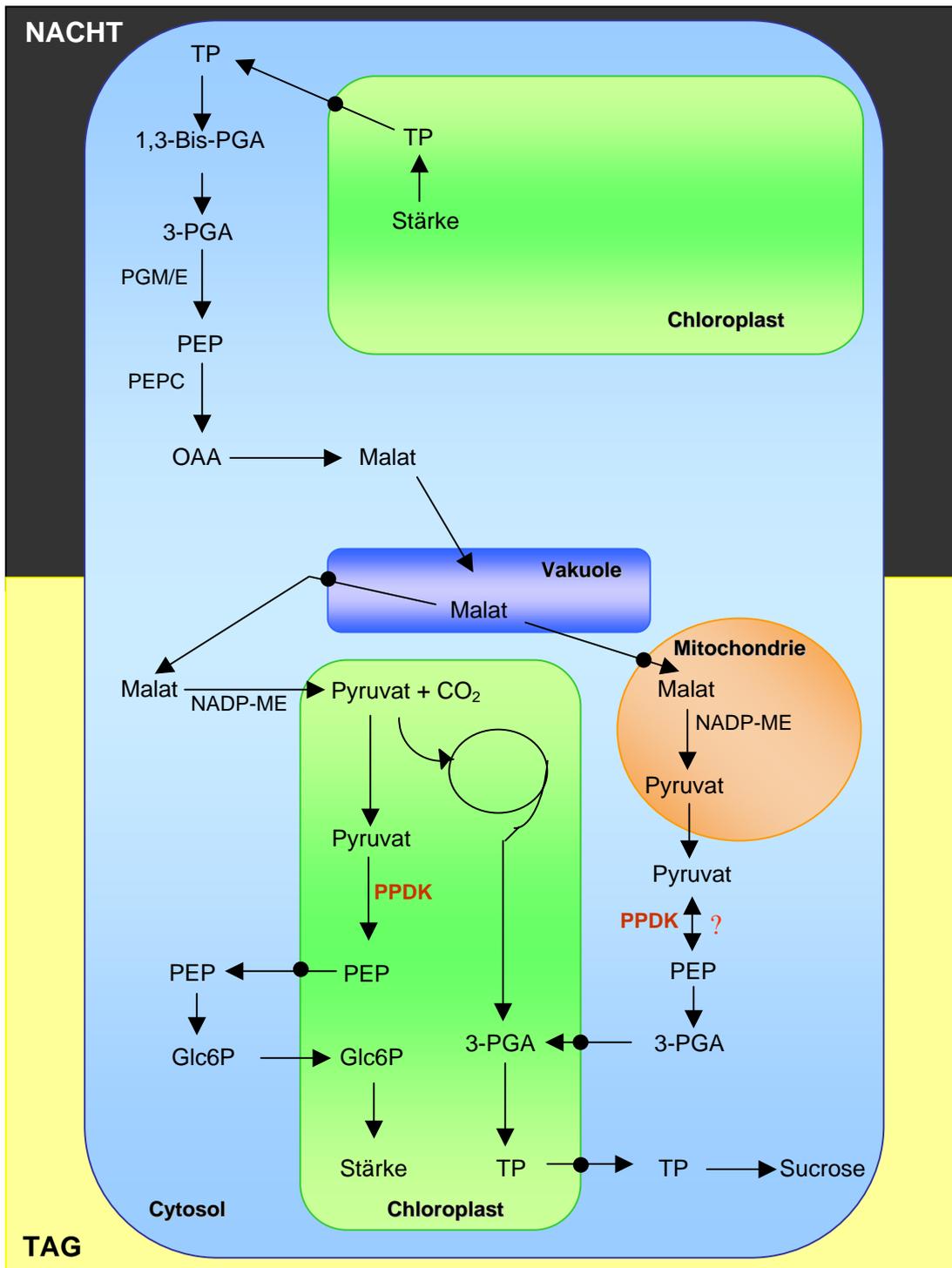


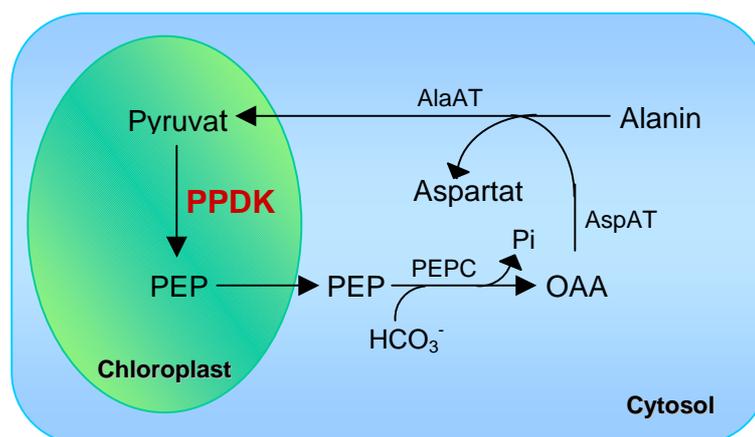
Abb. 1-4: PPDK-Rolle in Pflanzen mit CAM-Stoffwechsel.

1,3-Bis-PGA: 1,3-Bisphosphoglycerat; Glc6P: Glucose-6-Phosphat; NADP-MDH: NADP-Malat-Dehydrogenase; NADP-ME: NADP-Malat-Enzym; OAA: Oxalacetat, PEPC: Phosphoenolpyruvat Carboxylase, PEP: Phosphoenolpyruvat; 3-PGA: 3-Phosphoglycerat; PGM/E: Phosphoglucomutase; PPDK: Pyruvat, Phosphat Dikinase; TP: Triosephosphat; ● : Translokator.

### 1.2.5. Rolle der PPK in C<sub>3</sub>-Pflanzen

Mehr als 90 % der Landpflanzen, die viele landwirtschaftlich wichtige Anbaupflanzen umfassen, assimilieren das atmosphärische CO<sub>2</sub> durch den C<sub>3</sub>-Weg der Photosynthese. Bei der C<sub>3</sub>-Photosynthese besitzt die RUBISCO eine niedrige Affinität zum atmosphärischen CO<sub>2</sub>. Die Photosynthese der C<sub>3</sub>-Pflanzen ist daher durch die Photorespiration limitiert, ein Prozess, der als Energieverschwendung betrachtet wird (Ku *et al.*, 1996). In C<sub>3</sub>-Pflanzen wird die Aktivität der PPK in verschiedenen Gewebearten als sehr niedrig eingestuft und zudem ist ihre Funktion bis heute nicht klar (Häusler *et al.*, 2002).

Die PPK wurde in C<sub>3</sub>-Pflanzen mit dem Enzym Phosphoenolpyruvat Carboxylase in Verbindung gebracht (PEPC spielt eine zentrale Rolle in der anaplerotischen Versorgung des Kohlenstoffskeletts für die Aminosäurebiosynthese in Blättern von C<sub>3</sub>-Pflanzen (Rademacher *et al.*, 2002)). So könnte durch die PPK-Aktivität die PEPC-Aktivität zur Refixierung von CO<sub>2</sub> in Aminosäuren beitragen. Die [Abb. 1-5](#) zeigt diesen Prozess. Alanin kann mit OAA unter Bildung von Aspartat und Pyruvat reagieren. Das aus dieser Reaktion entstandene Pyruvat kann im Chloroplasten durch die PPK zu PEP phosphoryliert werden. Somit ist das Substrat für die PEPC bereit gestellt (Latzko und Kelly, 1983).



**Abb. 1-5:** Beitragung der PPK in der Refixierung von Kohlendioxid durch die PEPC-Aktivität.

PEP: Phosphoenolpyruvat; PEPC: Phosphoenolpyruvat Carboxylase; Pi: anorganisches Phosphat; AlaAT: Alanin-Aminotransferase; AspAT: Aspartat-Aminotransferase; HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>: Bicarbonat; OAA: Oxalacetat; PPK: Pyruvat, Phosphat Dikinase.

Gleicherweise wie in CAM-Pflanzen, könnte die PPDK in C<sub>3</sub>-Pflanzen eine Rolle in der glukoneogenetischen PEP-Regeneration spielen. Schnabl (1981) zeigte einige Beweise dafür in der Ackerbohne (*Vicia faba* L.). Bei einer Erhöhung der PPDK-Aktivität in den Schließzellen der Spaltöffnung stieg die Lieferung von PEP (Substrat für die PEPC) für die Synthese von organischen Säuren und zur Förderung der Öffnung der Spaltöffnungen an. Die plastidiäre PPDK könnte im Einklang mit dem cytosolischen NADP-Malat-Enzym eine Rolle bei der glukoneogenetische PEP-Synthese aus Pyruvat spielen.

Lin und Wu (2004) haben einen neuen biochemischen Weg postuliert, bei dem die PPDK an der Bildung von Asparagin für die Stickstoffremobilisierung in dunkelbehandelten Blättern von *Arabidopsis thaliana* während der Seneszenz beteiligt ist. Wegen der relativen Stabilität und dem hohen Verhältnis von Stickstoff zu Kohlenstoff ist das Asparagin eine wichtige Verbindung für Transport und Aufbewahrung von Stickstoff (Hayashi und Chino, 1990; Lam *et al.*, 1996). Die Ergebnisse von Lin und Wu zeigten, dass alle Gene der entsprechenden dazwischen liegenden Enzyme eindeutig überreguliert wurden. In der Tat wurde die Menge von freiem Asparagin in signifikanter Weise erhöht. Das Asparagin arbeitet als N-Transporteur.

### **1.3. Modulation der PPDK-Aktivität *in planta***

In der Regel hängt die Gesamtreaktion der PPDK in Abhängigkeit von der Konzentration der Substrate der Aktivatoren ab (Burnell und Hatch, 1985).

Im allgemeinen zeigen die PPDK-Isoenzyme, von C<sub>3</sub>-, C<sub>4</sub>- und CAM-Pflanzen, gleichartige enzymatische Charakteristika, wie z. B. ihre Aktivierung bei Licht, Empfindlichkeit gegenüber Kälte, katalytische Eigenschaften und immunologische Besonderheiten (Imaizumi *et al.*, 1997). Die PPDKs aus verschiedenen Pflanzen zeigen große Ähnlichkeiten in den Sequenzen und in der quartären Struktur, die in allen Pflanzen ein Homotetramer ist, während es in Bakterien ein Homodimer ist (Ku *et al.*, 1996).

Die Lokalisierung der PPDK in Pflanzen ist abhängig von der Spezies. Am häufigsten ist das Enzym in den Chloroplasten gefunden worden (Winter *et al.*, 1982, Kondo *et al.*, 2000), aber auch im Cytosol oder gleichzeitig in beiden Zellkompartimenten (Kondo *et al.*, 1998). Cytosolische PPDK ist auch in nicht photosynthetischen Organen von C<sub>3</sub> und C<sub>4</sub> Pflanzen lokalisiert worden (Kondo *et al.*, 2001).

Die PPDK-Aktivität ist reversibel licht-abhängig reguliert. Diese Regulation erfolgt durch die umkehrbare Phosphorylierung eines Threonin-Restes nahe einem katalytisch notwendigen Histidin. Die Aktivität der PPDK kann sich als Antwort auf kleine Schwankungen in der Lichtintensität verändern. Bei Licht ist die PPDK aktiviert, d.h. dephosphoryliert; während sie bei Dunkelheit inaktiv ist, d.h. phosphoryliert (Hatch und Slack, 1969; Aoyagi und Bassham, 1984; Burnell and Hatch, 1985; Matsuoka *et al.*, 1993; Chastain *et al.*, 2002).

In Bezug auf die Temperatur wurde berichtet, dass eine reversible PPDK-Inaktivierung bei Kälte auftritt; Grund dafür ist eine Dissoziation der aktiven tetramerschen Form zu nicht aktiven Monomeren und Dimeren. Diese Monomere und Dimere können sich bei Erwärmung wieder verbinden und das aktive Enzym ausbilden (Hatch, 1979, Otha *et al.*, 1997; Naidu *et al.*, 2003). Als bei belichteten Blättern der perennierenden C<sub>4</sub>-Pflanze *Atriplex halimus* zusätzlich eine Kältebehandlung erfolgte, ist die PPDK nur teilweise inaktiviert worden (Salahas *et al.*, 2002).

Einige Berichte informieren über die Aktivierung der PPDK bei Stressbedingungen. Salzstress verursachte eine transkriptionale Aktivierung des *ppdk*-Gen in Blättern von *M. crystallinum* (Fißlthaler *et al.*, 1995). Während Anaerobiosebedingungen die Aktivität der PPDK in Reis stark erhöhten (Moons *et al.*, 1998).