Untersuchungen zur Regulation des Calvin-Zyklus in Kieselalgen

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Andreas Michels

aus Düsseldorf

2002

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

Referent: Professor Dr. A.W. Alfermann
Koreferent: Professor Dr. P.G. Kroth
Tag der mündlichen Prüfung: 04.02.2002

Elektronische Veröffentlichung unter:
http://www.uni-duesseldorf.de/diss/mathnat/2002/michels.html

Inhaltsangabe

1 EINLEITUNG 1

1.1 DIE REAKTIONEN DER PHOTOSYNTHESE 1
1.2 ZUCKERPHOSPHAT-STOFFWECHSEL-ZYKLEN IN DEN PLASTIDEN HÖHERER PFLANZEN 2
1.2.1 Der reduktive Pentosephosphat-Zyklus (Calvin-Zyklus) 2
1.2.2 Der oxidative Pentosephosphat-Weg 4
1.3 DIE REGULATION DES CALVIN-ZYKLUS 6
1.3.1 Das plastidäre Ferredoxin/Thioredoxin-System 6
1.3.2 Die Thiol-Modulation plastidärer Zielenzyme 8
1.3.2.1 Die Thiol-Modulation der Phosphoribulokinase (PRK) 8
1.3.2.2 Die Thiol-Modulation der Fruktose-1,6-bisphosphatase (FbPase) 9
1.3.2.3 Die Thiol-Modulation der Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SbPase) 10
1.3.2.4 Die Thiol-Modulation der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) 10
1.3.2.5 Die Thiol-Modulation der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) 11
1.3.3 Die Kontrolle der PRK- und GAPDH-Aktivität durch regulatorische Proteinkomplexe 12
1.4 DIE ENTWICKLUNG UND EVOLUTION DER KIESELALGEN 13
1.5 DIE KIESELALGEN 15
1.6 ZIELSETZUNG DER ARBEIT 17

2 MATERIAL UND METHODEN 18

2.1 MATERIAL 18
2.1.1 Allgemeines 18
2.1.2 Biologisches Material 18
2.1.3 Bakterienstämme 19
2.1.4 Plasmide 19
2.1.5 Antikörper 19
2.1.6 Proteine 20
2.1.7 Nukleotide und Nukleinsäuren 20
2.1.8 Feinchemikalien 20
2.1.9 Verschiedenes 21
2.1.10 Allgemeine Puffer und Medien 21
2.2 ALLGEMEINE METHODEN 22
2.2.1 UV/Vis-Spektroskopie 22
2.2.2 Gelelektrophoresen 23
2.2.2.1 Agarosegelelektrophorese 23
2.2.2.2 Polyacrylamidgelelektrophorese unter nativen Bedingungen 24
2.2.2.3 Sequenziergele 24
2.2.2.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese 24
2.2.3 Nachweis von Proteinen in der Gelmatrix 25
2.2.3.1 Proteinnachweis durch Silberfärbung 25

2.2.3.2 Immunodetektion von Proteinen ... 26
2.3 MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN ... 27
2.3.1 Amplifizierung von DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ... 27
2.3.2 Klonierung von DNA ... 27
2.3.3 Isolation von cDNA- und genomischen DNA-Klonen aus Phagenbanken ... 28
2.3.3.1 Titer-Bestimmung der DNA-Banken und Vorbereitung zur Sichtung ... 28
2.3.3.2 Southern-Hybridisierung ... 29
2.3.4 Gensequenzierung ... 30
2.4 PHYSIOLOGISCHE METHODEN ... 30
2.4.1 Präparation von stromalen Proteinen ... 30
2.4.1.1 Präparation von intakten Chloroplasten aus Kieselalgen ... 30
2.4.1.2 Präparation von intakten Chloroplasten aus Spinat ... 31
2.4.1.3 Chlorophyll-Bestimmung ... 32
2.4.2 Untersuchung der Qualität isolierter Chloroplasten ... 33
2.4.3 Thermolysin-Behandlung intakter Plastiden ... 33
2.5 PROTEINCHEMISCHE METHODEN ... 34
2.5.1 Expression und chromatographische Reinigung von Proteinen ... 34
2.5.1.1 Phosphoribulokinase aus Spinat ... 35
2.5.1.2 Phosphoribulokinase von *O. sinensis* heterolog exprimiert in *E. coli* ... 36
2.5.1.3 Thioredoxin-Isoformen m und f von Spinat heterolog exprimiert in *E. coli* ... 38
2.5.2 Trennung und Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen durch Größenausschluss-chromatographie ... 40
2.5.3 Deglykosylierung von stromalen Proteinen ... 41
2.5.4 Bestimmung der enzymatischen Aktivität ... 41

3 ERGEBNISSE ... 43

3.1 ÜBERPRÜFUNG DER PRÄPARATION VON INTAKTEN CHLOROPLASTEN AUS DIATOMEEN ... 43
3.2 REGULATION DER PHOSPHORIBULOKINASE (PRK) ... 45
3.2.1 Einfluss von Reduktions- und Oxidationsmitteln auf die enzymatische Aktivität der PRK ... 45
3.2.2 Veränderungen der PRK-Menge über die Belichtungsphase ... 48
3.2.3 Die Sequenz der PRK von *Odontella sinensis* ... 49
3.3 UNTERSUCHUNGEN AN GEREINIGTER PRK ... 51
3.3.1 Reinigung der PRK von *O. sinensis* nach Expression in *Escherichia coli* ... 51
3.3.2 Präparation und Reinigung der PRK aus Spinat ... 53
3.3.3 Hinweise für eine Glykosylierung der PRK von *O. sinensis in vivo* ... 55
3.3.4 Untersuchungen zum Mechanismus der Inaktivierung ... 56
3.4 BESTIMMUNG DES REDOX-POTENTIALS DER REGULATORISCHEN CYSTEINE DER PRK ... 60
3.4.1 Einstellung geeigneter experimenteller Bedingungen für die Redox-Gleichgewichts-Titration ... 60
3.4.1.1 Einstellung geeigneter Inkubations-Bedingungen ... 60
3.4.1.2 Einstellung und Stabilität des Redox-Potentials ... 62
3.4.1.3 Das mittlere Redox-Potential E_m der PRK von Spinat ... 65
3.4.2 Redox-Gleichgewichts-Titration der regulatorischen Cysteine der PRK von *Odontella sinensis* ... 67
3.4.2.1 Überprüfung der experimentellen Bedingungen ... 67

3.4.2.2 Das mittlere Redox-Potential E_m der PRK von *O. sinensis* ... 68
3.5 Untersuchung regulatorischer Proteinkomplexe des Calvin-Zyklus ... 72
3.6 Untersuchung der plastidären Fruktose-1,6-bisphosphatase (FBPase) und der Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase) ... 77
3.7 Untersuchung von Enzymen des oxidativen Pentosephosphat-Wegs in den Plastiden der Diatomeen ... 79
3.8 Untersuchung auf Isoformen der Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase in Kieselalgen ... 82

4 DISKUSSION ... 85

4.1 Die Regulation des Calvin-Zyklus-Enzyms Phosphoribulokinase ... 86
4.1.1 Die strukturellen und katalytischen Eigenschaften der PRK von *O. sinensis* sind typisch für eine eukaryotische PRK ... 86
4.1.2 Die PRK von Diatomeen wird in der Plastide nicht durch Thiol-Modulation kontrolliert, ist jedoch potentiell über den Redox-Status regulierbar ... 87
4.1.3 Die Expression der Diatomeen-PRK wird durch Licht reguliert ... 88
4.1.4 Die Redox-Regulation der PRK aus *O. sinensis* gleicht mechanistisch der PRK-Regulation in höheren Pflanzen ... 89
4.1.5 Ein verändertes Redox-Potential ist wahrscheinlich die Ursache für eine permanente Aktivierung der PRK aus *O. sinensis in vivo* ... 91
4.2 In den Plastiden der Diatomeen lassen sich keine regulatorischen PRK:CP12:GAPDH-Komplexe nachweisen ... 94
4.3 Die GAPDH der Diatomeen ist wahrscheinlich nicht Thiol-moduliert ... 97
4.4 Die Regulation der Calvin-Zyklus-Enzyme Fruktose-1,6-bisphosphatase und Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase ... 98
4.5 In den Plastiden der Diatomeen gibt es wahrscheinlich keinen Oxidativen Pentosephosphat-Weg (OPPW) ... 100
4.6 Untersuchung von G6PDH-Isoformen in Diatomeen ... 102
4.7 Schlussfolgerung ... 105

5 ZUSAMMENFASSUNG ... 110

6 LITERATUR ... 112

7 ANHANG ... 126

7.1 Sequenzen und Sequenzvergleiche ... 126
7.2 Abkürzungsverzeichnis ... 140

1 Einleitung

Die oxygene Photosynthese der Cyanobakterien, eukaryotischen Algen und höheren Pflanzen bildet die Grundlage des aeroben Lebens auf der Erde. In dem Prozess der Photosynthese wird Licht in chemische Energie überführt. Die Energie der elektromagnetischen Strahlung wird für die Reduktion des Kohlenstoffs aus atmosphärischem CO_2 und seine Fixierung in Form von Kohlenhydraten verwendet. Gleichzeitig erfolgt die Bildung von Sauerstoff durch die Oxidation von Wasser.

Traditionell wird die Photosynthese in „Licht"- und „Dunkel"-Reaktionen unterschieden, wobei dies Synonyme für den photosynthetischen Elektronentransport und die Photophosphorylierung bzw. die CO_2-Assimilation sind. Dies ist irreführend, da bereits die Experimente von Calvin und Mitarbeitern (Bassham *et al.*, 1954), die zur Aufklärung der biochemischen Grundlagen der photosynthetischen CO_2-Assimilation (Calvin-Zyklus) führten, zeigten, dass diese Reaktionen generell abhängig vom Licht sind. Tatsächlich ist die CO_2-Assimilation vollständig integriert in den lichtabhängigen Elektronen- und Protonentransport des Chloroplasten.

Dass die Chloroplasten im Dunkeln kein CO_2 fixieren können, ist nicht alleine durch das Fehlen von Substraten, sondern vielmehr durch inaktive Enzyme zu erklären. Einige Schlüsselenzyme der zyklischen Reaktionssequenz sind im Dunkeln inaktiv und werden durch Licht aktiviert. Damit ist Licht eines der wichtigsten Signale für die Kontrolle der Enzymaktivität und damit für die Kontrolle des Umsatzes (Flusses) durch den Calvin-Zyklus (Buchanan, 1980; Wolosiuk *et al.*, 1993). Zahlreiche Untersuchungen konnten sowohl die Komponenten dieses regulatorischen Systems als auch die molekularen Details ausgehend vom Signal Licht bis hin zur Aktivierung der Zielenzyme identifizieren (Übersicht: Jacquot *et al.*, 1997).

1.1 Die Reaktionen der Photosynthese

Alle eukaryotischen Organismen, die aktiv Photosynthese betreiben, besitzen ein spezialisiertes Kompartiment, den Chloroplasten. Diese Zellorganellen sind semiautonom, verfügen also zusätzlich zu der genetischen Information im Zellkern über ein eigenes Genom (Plastom) prokaryotischen Ursprungs und den dazu gehörenden genetischen Apparat. In den Chloroplasten erfolgen die drei Hauptreaktionen der Photosynthese:

1. **Elektronentransport und Protonentranslokation:** Im Inneren der Chloroplasten befindet sich das geschlossene Membransystem der Thylakoide, welches die photosynthetischen

Pigmente und eine Reihe, Elektronen-übertragender Membranproteine enthält. Lichtenergie, die durch die Pigmente absorbiert wird, treibt einen Elektronentransport über die Proteinkomponenten von H_2O zum Elektronen-Akzeptor $NADP^+$, der auf der Stroma-Seite zu NADPH reduziert wird. Der Elektronentransport ist mit der Bildung eines transmembranen Protonengradienten und dem Aufbau eines Membranpotentials verknüpft.

2. **Photophosphorylierung:** Das elektrochemische Potential des Protonengradienten ist die treibende Kraft für die Synthese von ATP. Die ATP-Synthese wird durch einen weiteren membranintegralen Proteinkomplex, der ATP-Synthase, katalysiert.
3. **CO_2-Assimilation:** Unter Verwendung der in den ersten beiden Reaktionen gebildeten Energie- und Reduktions-Äquivalente ATP und NADPH wird das fixierte atmosphärische CO_2 reduziert und zu Kohlenhydraten umgesetzt. Diese Synthese wird durch die komplexe Reaktionsfolge des reduktiven Pentosephosphat-Zyklus katalysiert. Auf diesen Zyklus sowie den ebenfalls in Plastiden höherer Pflanzen vorhandenen oxidativen Pentosephosphat-Weg soll im folgenden näher eingegangen werden.

1.2 Zuckerphosphat-Stoffwechsel-Zyklen in den Plastiden höherer Pflanzen

In den Plastiden der höheren Pflanzen sind zwei entgegengesetzte Pentospehosphat-Zyklen vorhanden: Der anabole reduktive Pentosephosphat-Zyklus und der katabole oxidative Pentosephosphat-Weg. Einige Reaktionen sind Bestandteil beider Stoffwechselwege und eine Vielzahl der dabei umgesetzten Metabolite sind identisch.

1.2.1 Der reduktive Pentosephosphat-Zyklus (Calvin-Zyklus)

Der reduktive Pentosephosphat-Zyklus, oder auch Calvin-Zyklus, lässt sich in drei Abschnitte auftrennen: (1) Carboxylierung, (2) Reduktion von 3-Phosphoglycerat (3PGA) zu Triosephosphat und (3) die Regeneration des CO_2-Akzeptors Ribulose-1,5-bisphosphat (Ru-1,5-bP). Weitere Reaktionen (4), die direkt mit der Assimilation von CO_2 verbunden sind, stehen im Zusammenhang mit der Überführung der Triosephosphate zu den Endprodukten der Kohlenhydrate (Abbildung 1-1 zeigt ein Schema des Calvin-Zyklus und damit assoziierter Reaktionen):

1. Carboxylierung

Die Schlüsselreaktion des Calvin-Zyklus, in der Ru-1,5-bP als Akzeptor für ein CO_2 fungiert und die zur Synthese von zwei Molekülen 3PGA führt, wird durch die Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (Rubisco) katalysiert. Die Rubisco liegt in der Plastide in außergewöhnlich hoher Konzentration vor. In verschiedenen Untersuchungen wurde ein Anteil von 30% bis 40% am stromalen Protein beschrieben (Woodrow und Berry, 1988). Dies entspricht einer Konzentration der Katalyse-Stellen von 4 mM (Harris und Königer, 1997) und soll wahrscheinlich die niedrige Effizienz des Enzyms kompensieren. Wegen eines hohen K_m–Wertes für das Substrat CO_2 und der konkurrierenden Oxygenase-Aktivität ist die Carboxylierungs-Reaktion der Rubisco unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich über die CO_2-Konzentration limitiert (Woodrow und Berry, 1988).

2. Reduktion von 3PGA zu Triosephosphaten

Das zuvor in der Carboxylierung entstandene Endprodukt von zwei Molekülen 3PGA pro Molekül Ru-1,5-bP wird in den folgenden drei Reaktionen zu Triosephosphaten reduziert. Im photosynthetischen Gleichgewicht werden 5 von 6 Molekülen Triosephosphat wieder in den Zyklus zurückgeführt, wo sie für die Regeneration des CO_2-Akzeptors Ru-1,5-bP verwendet werden (siehe 3. dieses Abschnitts). Das andere Sechstel der Triosephosphate kann auf verschiedenen Wegen umgesetzt und dem Zellmetabolismus zur Verfügung gestellt werden (siehe 4. dieses Abschnitts).

3. Regeneration des CO_2-Akzeptors, Ribulose-1,5-bisphosphat

Im regenerativen Teil des Zyklus wird der CO_2-Akzeptor Ru-1,5-bP zurückgebildet. Eine Folge von verzweigten Reaktionen, Isomerisierungen, Kondensationen und Hydrolysen führt zur Bildung von Ribulose-5-Phosphat (Ru5P). Dieses wird durch die Phosphoribulokinase (PRK) unter ATP Verbrauch zu Ru-1,5-bP umgesetzt.

4. Synthese von Kohlenhydraten

Die synthetisierten Triosephosphate, aber auch andere Metabolite des Calvin-Zyklus, sind Intermediate, die sowohl innerhalb als auch außerhalb des Chloroplasten in verschiedenen Stoffwechselwegen umgesetzt werden. Ausgehend von F-6-P wird innerhalb des Chloroplasten die Assimilationsstärke hergestellt. Im Cytosol wird, ausgehend vom exportierten Triosephosphate, die extrazelluläre Transportform Saccharose synthetisiert. Der Export von assimiliertem Kohlenstoff, in Form von Triosephosphat, wird durch den Triosephosphat-

Translokator der inneren Plastidenmembran vermittelt. Der Export findet unter strikter Kopplung an die Aufnahme von anorganischem Phosphat (P_i) statt (Fliege *et al.*, 1978; Heldt und Flügge, 1992). Damit setzen beide Wege der Endprodukt-Synthese innerhalb des Chloroplasten Phosphat frei bzw. führen zu dessen Import. Dadurch wird ein vollständiger Abbau des plastidären Phosphat-Pools während der CO_2-Assimilation verhindert. Eine ausreichende Phosphatkonzentration ist eine essentielle Voraussetzung für die photosynthetische ATP-Produktion und damit für die CO_2-Fixierung durch den Calvin-Zyklus.

1.2.2 Der oxidative Pentosephosphat-Weg

Der oxidative Pentosephosphat-Weg (OPPW) ist ein ubiquitärer, katabolischer Stoffwechselweg. Die wichtigsten Funktionen sind die Bereitstellung von NADPH und verschiedenen Zuckerphosphaten für reduktive Prozesse wie die Fettsäure- und Desoxynukleotid-Synthese sowie die Biosynthese von aromatischen Aminosäuren (Copeland und Turner, 1987). Der OPPW kann in einen oxidativen und einen verzweigten, reversiblen Teilbereich unterteilt werden.

Die Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase katalysiert die erste Reaktion des oxidativen Zweigs, in dem zusammen mit der 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase NADPH aus der oxidativen Decarboxylierung von Glukose-6-phosphat gewonnen wird. In höheren Pflanzen gibt es mindestens zwei Isoformen der beiden Dehydrogenasen in den Kompartimenten Cytosol und Plastide (Schnarrenberger *et al.*, 1973; Wendt *et al.*, 1999 und 2000). In den Plastiden der höheren Pflanzen findet sich ein vollständiger OPPW (Schnarrenberger *et al.*, 1995). Dabei wird für die Reaktionen des reversiblen Zweigs mit Ausnahme der Transaldolase-Reaktion (TAL) die Enzym-Ausstattung des Calvin-Zyklus genutzt. Die TAL umgeht die durch die Phosphatase-Reaktion irreversible Reaktions-Sequenz von Erythrose-4-Phosphat zu Sedoheptulose-1,7-bisphosphat, die im Calvin-Zyklus durch die FBA und FbPase katalysiert wird.

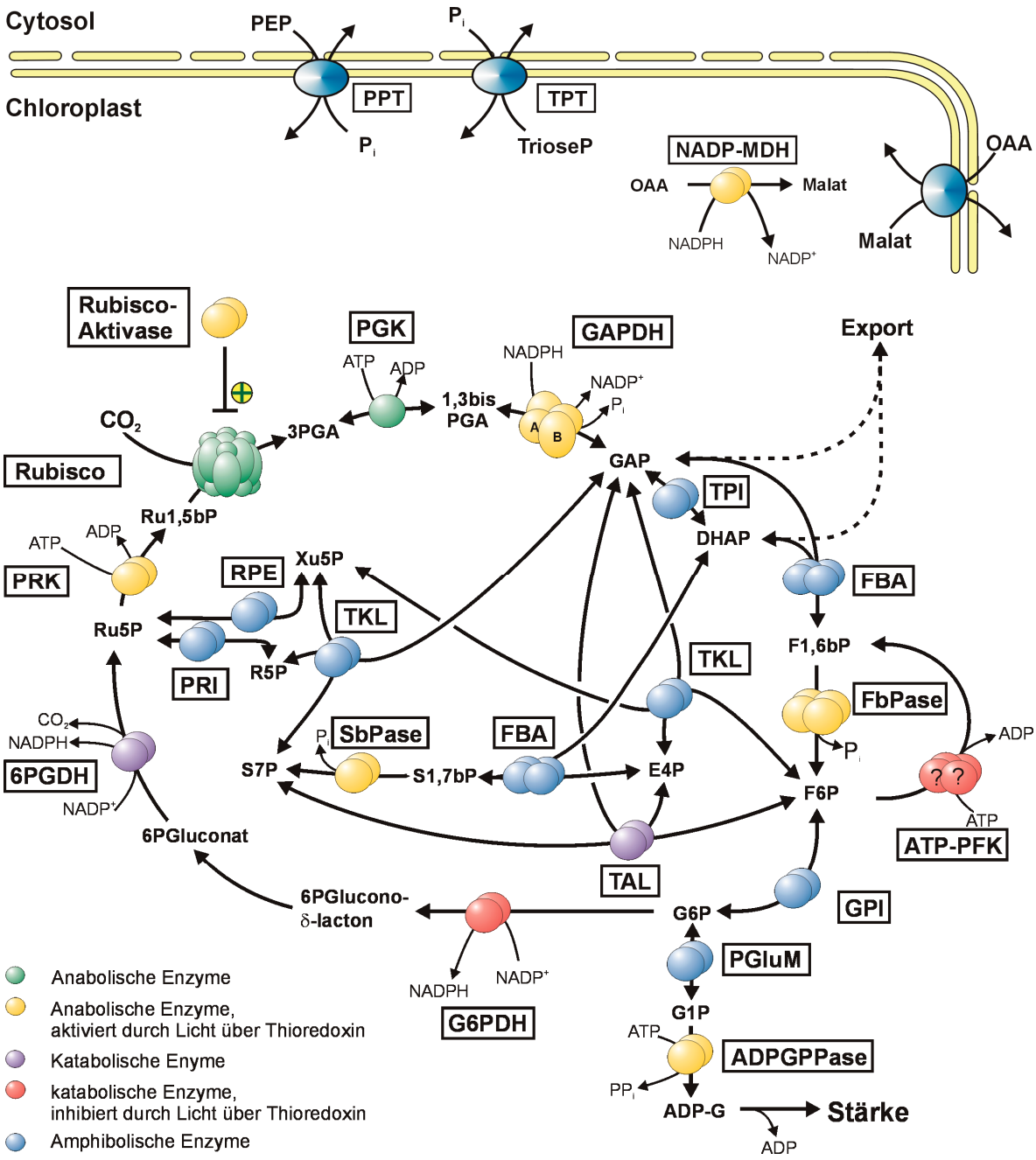


Abb. 1-1: Pentosephosphat Stoffwechsel-Zyklen und damit assoziierte Reaktionen in den Plastiden höherer Pflanzen.

Alle Enzyme sind entsprechend der bekannten Untereinheiten-Struktur in höheren Pflanzen dargestellt (Martin *et al.*, 2000). Die Enzyme sind entsprechend ihrer Funktion in anabolischen (Calvin-Zyklus) oder katabolischen (oxidativer Pentosephosphat-Weg) Stoffwechselwegen farbig dargestellt (siehe Legende). Regulierte Enzyme sind entsprechend des Effekts, den die Reduktion durch Thioredoxin auf die Enzymaktivität hat, gelb (aktiviert) oder rot (inhibiert) dargestellt.

Abkürzungen: ADPGPPase, ADP-Glukose-Pyrophosphorylase; PgluM, Phosphoglukose-Mutase; G6PDH, Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase; 6PGDH, 6Phosphoglukonat-Dehydrogenase; SbPase, Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase; FbPase, Fruktose-1,6-bisphosphatase; FBA, Fruktosebisphosphat-Aldolase; TAL, Transaldolase; GPI, Glukosephosphat-Isomerase; ATP-PFK, plastidäre Phosphofruktokinase, ? zeigen an das die Regulation durch Trx noch nicht sicher ist; PRI, Phosphoriboisomerase; RPE, Ribosephosphat-Epimerase; TKL, Transketolase; TPI, Triosephosphat-Isomerase; GAPDH, $NADP^+$- Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase; PGK, Phosphoglycerat-Kinase; RuBisCo, Ribulosebisphosphat-Carboxylase/Oxygenase; PRK, Phosphoribulokinase; MDH, Malat-Dehydrogenase.

1.3 Die Regulation des Calvin-Zyklus

Die Assimilation von Kohlenstoff zu organischen Verbindungen erfordert nicht nur eine flexible Kooperation zwischen den membrangebundenen und den stromalen Reaktionen der Photosynthese. Diese Reaktionen müssen auch noch mit verschiedenen anderen, anabolen und katabolen Stoffwechselwegen koordiniert werden, die Zucker und andere organische Verbindungen synthetisieren (siehe Abb. 1-1).

Ein besonderes Problem ergibt sich aus der Präsenz des oxidativen Pentosephosphat-Weg in den Plastiden, da der gleichzeitige Ablauf beider Pentosephosphat-Zyklen zu einem Netto-Verbrauch von 3 ATP pro primär fixiertem CO_2 ohne eine Netto-Synthese von Kohlenhydraten führt. Solche „verschwenderischen" Zyklen (*engl.* futile cycle) werden unter anderem durch die Regulation der plastidären Enzyme vermieden.

Mehrere Enzyme des Calvin-Zyklus sind lichtreguliert (siehe Abb. 1-1, gelb und rot markierte Enzyme) und tragen gemeinsam zur Kontrolle des Umsatzes bei. Die Faktoren, die diese Kontrolle vermitteln, lassen sich grob in Veränderungen (1) des stromalen pH und der Mg^{2+}-Konzentration, (2) der Konzentration von Metaboliten, die als Effektoren wirken und (3) des Reduktions-Grades von Enzymen unterteilen.

Die Regulation durch Veränderung des Reduktions-Grades von Enzymen wird auch als Thiol-Modulation bezeichnet. Hierbei reduziert Thioredoxin spezifische (regulatorische) Disulfide der Zielenzyme, wodurch deren Aktivität verändert wird. Vermittelt wird diese Regulation durch das Ferredoxin/Thioredoxin System. (Buchanan, 1980 und 1984; Crawford *et al.*, 1989; Wolosiuk *et al.*, 1993; Ruelland und Miginiac-Maslow, 1999).

1.3.1 Das plastidäre Ferredoxin/Thioredoxin-System

Bereits in den frühen 70er Jahren wurden erste Hinweise dafür gefunden, dass Proteine an der lichtabhängigen Aktivierung der photosynthetischen CO_2-Fixierung beteiligt sind (Buchanan *et al.*, 1971). Diese Proteine, zunächst ARPa und ARPb (Schürmann *et al.*, 1976) genannt, wurden als das bereits aus dem Bakterium *E. coli* bekannte Thioredoxin [Trx (Laurent *et al.*, 1964)] und einem neuen Protein, der Ferredoxin/Thioredoxin-Reduktase (FTR), identifiziert (Wolosiuk und Buchanan, 1977).

Thioredoxine sind kleine, stabile und ubiquitäre Proteine von ca. 12 kDa (Buchanan und Wolosiuk, 1976; Jacquot *et al.*, 1997a). Sie gehören zu der Protein-Superfamilie der Thiol/Disulfid-Oxidoreduktasen, denen das Sequenzmotiv CysXaaXaaCys gemeinsam ist (Chivers *et al.*, 1997a). Diese Enzyme katalysieren die Reduktion, Oxidation und Isomerisierung intramolekularer Dithiol/Disulfid-Gruppen von Zielenzymen.

Die zur Verfügung stehenden kristallographischen Daten zeigen, dass alle Thioredoxine, unabhängig von ihrer Herkunft, eine gemeinsame Tertiärstruktur besitzen, die „Thioredoxin-Faltung“ (Katti *et al.*, 1990; Jacquot *et al.*, 1997a; Capitani *et al.*, 2000). Diese Organisation ist eine Voraussetzung für die Exposition der katalytischen Domäne sowie der Bereiche, die über ionische und hydrophobe Wechselwirkungen den spezifischen Kontakt mit den Zielenzymen vermitteln (Capitani *et al.*, 2000; Wangensteen *et al.*, 2001).

Das Sequenzmotiv der regulatorischen Domäne der Thioredoxine, Trp-Cys-Gly-Pro-Cys (WCGPC), besitzt in der Familie der Thiol/Disulfid-Oxidoreduktasen das reduzierendste Redox-Potential [*E. coli*: –270 mV, Spinat Trx-f: –290 mV und Trx-m: –300 mV (Hirasawa *et al.*, 1999)]. Die physiologische Bedeutung der plastidären Thioredoxine liegt in ihrer Eigenschaft, in der reduzierten Form die Disulfidbrücken von Zielenzymen zu reduzieren und dadurch deren Enzymaktivität zu regulieren (siehe Abb. 1-1, gelb und rot markierte Enzyme und Abschnitt 1.3.2). In höheren Pflanzen wurden zwei plastidäre Thioredoxine gefunden, die Isoformen m und f (Wolosiuk *et al.*, 1979; Crawford *et al.*, 1986). Die Nomenklatur der Isoformen bezieht sich auf die zuerst gefundenen, verschiedenen Spezifitäten in der Aktivierung von Zielenzymen. Trx-m reguliert die Aktivität der $NADP^+$-MDH (Buchanan *et al.*, 1979) und der G6PDH (Scheibe und Anderson, 1981) und Trx-f die Calvin-Zyklus-Enzyme FbPase, SbPase und PRK (Wolosiuk *et al.*, 1979).

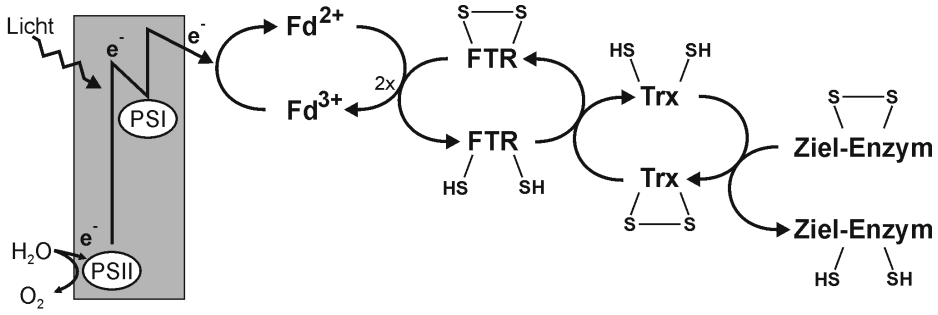


Abb. 1-2: Schematische Darstellung des plastidären Ferredoxin/Thioredoxin-Systems (Fd/Trx-System). Dargestellt sind die Komponenten des plastidären Fd/Trx-Systems (nach Ruelland und Miginiac-Maslow, 1999; verändert). Elektronen aus der Elektronen-Transportkette reduzieren Ferredoxin (Fd). Der größte Teil des reduzierten Fd wird für die Reduktion von $NADP^+$ verwendet. Ein kleiner Teil des Fd^{2+} überträgt die Elektronen in einem sequentiellen Vorgang auf den Zwei-Elektronen-Akzeptor Ferredoxin/Thioredoxin-Reduktase (FTR), wodurch die reaktive Disulfid-Brücke reduziert wird. Reduzierte FTR geht eine Disulfid/Dithiol-Austausch-reaktion mit oxidiertem Trx ein, durch die Trx reduziert wird. Das reduzierte Trx kann wiederum verschiedene plastidäre Zielenzyme reduzieren, deren Enzymaktivität dadurch verändert wird.

Im Gegensatz zu den Thioredoxinen ist die Ferredoxin/Thioredoxin-Reduktase (FTR) nur in Chloroplasten vertreten. Während Thioredoxin in heterotrophen Organismen in der Gegenwart des Flavoproteins NADP/Thioredoxin-Reduktase (NTR) durch NADPH reduziert wird (Reichard, 1968; Wolosiuk *et al.*, 1993), erfolgt die Reduktion im Chloroplasten durch Elektronen aus dem photosynthetischen Elektronentransport. Die katalytischen Cysteine der FTR werden in einem sequentiellen Ein-Elektronen-Transfer durch Ferredoxin reduziert (Droux *et al.*, 1987a und b; Chow *et al.*, 1995; Staples *et al.*, 1996 und 1998). Die so reduzierten Cysteine der FTR reduzieren dann schnell die Thioredoxine m und f (Hirasawa *et al.*, 1999; Knaff, 2000). Damit katalysiert die FTR die Schlüsselreaktion in der regulatorischen Dithiol/Disulfid-Redox-Kette, indem es den Ein-Elektronen-Transfer von Ferredoxin mit dem Zwei-Elektronen-Transfer des Dithiol/Disulfid-Systems von Thioredoxin koppelt.

1.3.2 Die Thiol-Modulation plastidärer Zielenzyme

Die Redox-sensitiven Cysteine der durch Licht regulierten plastidären Enzyme haben auf keiner Strukturebene eine gemeinsame Organisation. Dem entsprechend findet man auch keinen generellen biochemischen Effekt der reduktiven Aktivierung oder Inaktivierung auf die katalytischen Eigenschaften der Enzyme [siehe Abb. 1-3 (Ruelland und Miginiac-Maslow, 1999)].

1.3.2.1 Die Thiol-Modulation der Phosphoribulokinase (PRK)

Die Phosphoribulokinase wird ausschließlich in photosynthetischen Organismen gefunden. Das native Enzym ist ein Homodimer aus ca. 45 kDa Untereinheiten (Porter *et al.*, 1986). Die Sequenz höherer Pflanzen besitzt 4 Cysteine, von denen Cys 244 und 250 (Numerierung nach der Spinat Sequenz) im C-terminalen Bereich und Cys 16 sowie Cys 55 im N-terminalen Bereich innerhalb des aktiven Zentrums liegen. Die Cysteine 16 und 55 wurden zunächst durch Peptid-„mapping“ nach Cystein-Derivatisierung, später auch durch gerichtete Mutagenese, als die das regulatorische Disulfid bildenden Cysteine identifiziert (Porter *et al.*, 1988; Porter und Hartmann, 1990; Brandes *et al.*, 1996). Die Positionierung der regulatorischen Cysteine im Bereich des katalytischen Zentrums gibt es bei anderen plastidären Enzymen nicht. Weitere Mutagenese-Untersuchungen zeigten, dass, obwohl Cystein 16 für eine beschleunigte Nukleotid-Bindung wichtig ist, die Cysteine nicht an der Katalyse beteiligt sind und auch ein sterischer Effekt der Disulfidbrücke nicht den vollständigen Verlust der Kinase-Aktivität des oxidierten Enzyms erklären kann (Porter und Hartmann, 1988). Die oxidative Bildung des Disulfids hat vielmehr einen allosterischen Effekt, indem die Flexibilität des aktiven Zentrums erniedrigt wird

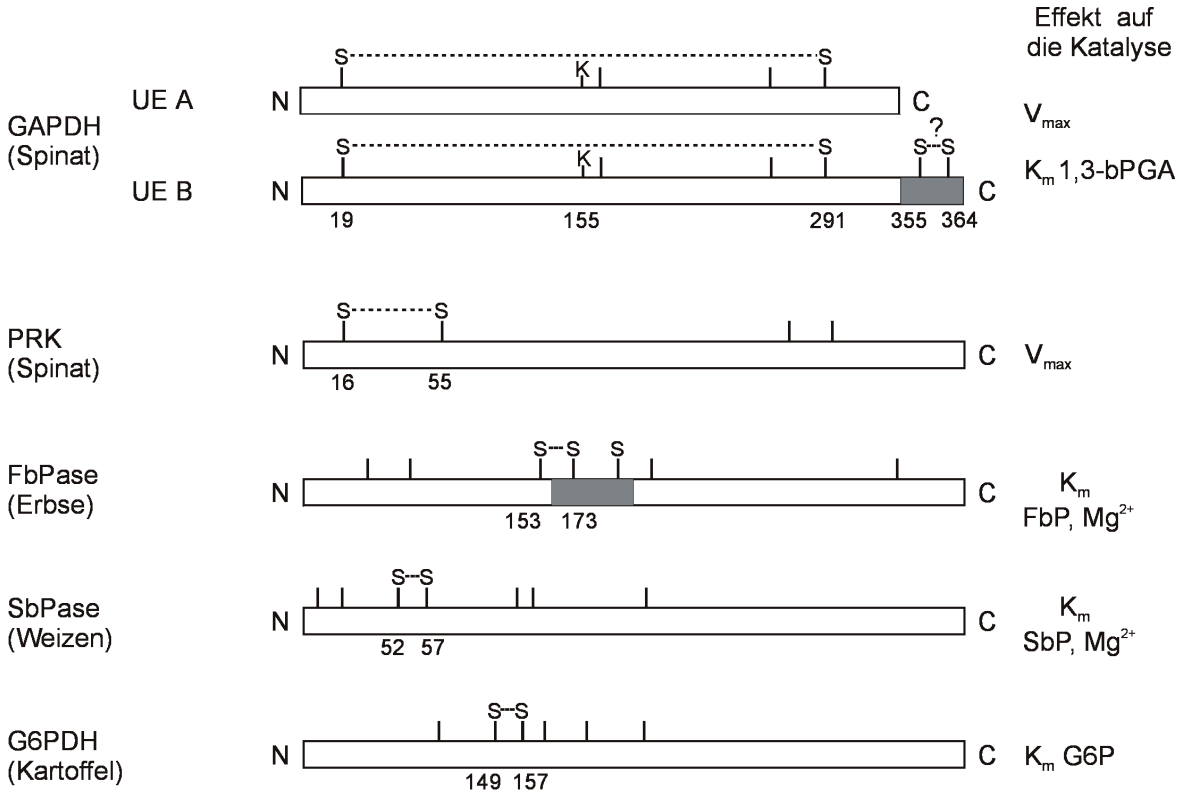


Abb. 1-3: Lineare Darstellung Licht-regulierter, plastidärer Enzyme mit den Positionen der an der Regulation beteiligten Cysteine.

Die Enzyme sind linear und alle Cysteine in der Sequenz als Striche dargestellt. Cysteine, die an der Regulation beteiligt sind, sind mit einem S gekennzeichnet und miteinander verbunden (die korrekte Position ist durch die Aminosäure-Position des Cysteins im reifen Protein angegeben). Das an der Katalyse der GAPDH beteiligte Cystein ist durch ein K markiert. Sequenzbereiche, die im Vergleich zu cytosolischen Isoformen eine Insertion darstellen und potentiell regulatorische Cysteine beinhalten, werden durch einen grauen Kasten repräsentiert. Die Effekte der Reduktion durch Thioredoxin auf die katalytischen Eigenschaften der Enzyme sind angegeben. Die Darstellung [verändert nach Ruelland und Miginiac-Maslow (1999)] ist nicht maßstabsgetreu.

(Ghiron *et al.*, 1988; Brandes *et al.*, 1992). Auf der Basis von frühen Experimenten wurde davon ausgegangen, dass Trx-f der physiologische Aktivator der PRK ist. Innerhalb dieser Untersuchungen wurde Cys 55 als die primäre Position für den nukleophilen Angriff durch Thioredoxin identifiziert (Brandes *et al.*, 1996). Neuere Untersuchungen zeigen jedoch, dass Trx-m die PRK effizienter aktivieren kann als Trx-f (Geck und Hartmann, 2000).

1.3.2.2 Die Thiol-Modulation der Fruktose-1,6-bisphosphatase (FbPase)

Die FbPase liegt in der pflanzlichen Zelle in zwei Isoformen vor, von denen die plastidäre durch das Ferredoxin/Thioredoxin-System reguliert ist. Das Enzym ist ein Homotetramer aus Untereinheiten mit einem Molekulargewicht von ca. 40 kDa. Die plastidäre Isoform besitzt im Vergleich zum cytoplasmatischen Enzym eine Insertion von 12 - 17 Aminosäuren, die zwei konservierte Cysteine enthält (Cys 173 und 178, Numerierung entsprechend der Erbsen-Sequenz). Zusätzlich zu diesen in der Insertion enthaltenen Cysteinen befinden sich zwei weitere Cysteine in unmittelbarer Nachbarschaft (Cys 153 und 203). Durch gerichtete Mutagenese

(Jacqout *et al.*, 1995 und 1997b) in Kombination mit kristallographischen Daten (Villeret *et al.*, 1995; Chiadmi *et al.*, 1999) wurden die Cysteine 153 und 173 als die regulatorischen identifiziert. Das Cystein 178, welches zuvor als regulatorisch beschrieben wurde (siehe Jacqout *et al.*, 1995), hat wahrscheinlich keine physiologische Bedeutung für die Regulation der FbPase.

Aus den kristallographischen Untersuchungen (Villeret *et al.*, 1995; Chiadmi *et al.*, 1999) geht hervor, dass die reduktive Aktivierung einen allosterischen Effekt auf die Katalyse hat. Die Oxidation/Reduktion führt zu einer Veränderung der 3D-Struktur des aktiven Zentrums über eine Entfernung von 20 Å. Damit einher geht eine Erhöhung des K_m für FbP und Mg^{2+} sowie eine Verschiebung des pH-Optimums. Die Aktivierung der FbPase zeigt eine strikte Spezifität für Trx-f und die Positionen, die für die Trx-Bindung wichtig sind, konnten biochemisch identifiziert werden (Sahrawy *et al.*, 1997). Diese vermitteln die Bindung von Trx wahrscheinlich über elektrostatische Wechselwirkungen, wie Aktivierungsstudien mit rekombinantem, bakteriellem Trx belegen (Mora-Garcia *et al.*, 1998; Capitani *et al.*, 2000).

1.3.2.3 Die Thiol-Modulation der Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SbPase)

Die SbPase weist eine hohe Sequenz-Ähnlichkeit zur FbPase auf, die unter Berücksichtigung konservativer Austausche über 50% Übereinstimmung zeigt (Raines *et al.*, 1992). Auch im Bezug auf die Katalyse und die Aktivierung ähneln sich die beiden Enzyme. Phylogenetische Untersuchungen lassen sogar einen gemeinsamen Ursprung in einem bifunktionalen Enzym vermuten, das die Phosphathydrolyse sowohl von SbP als auch FbP katalysierte (Martin *et al.*, 1996; Martin und Schnarrenberger, 1997). Trotz der Ähnlichkeit zwischen FbPase und SbPase findet man die konservierten Cysteine an völlig verschiedenen Positionen und die Insertion in der FbPase-Sequenz, welche die regulatorischen Cysteine trägt, fehlt in der SbPase-Sequenz vollständig. Auf der Grundlage von Struktur-Modellierungen wird davon ausgegangen, dass die Cysteine 52 und 57 an der Regulation beteiligt sind (Dunford *et al.*, 1998a und b).

1.3.2.4 Die Thiol-Modulation der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH)

Die GAPDH ist das erste Enzym, für das die lichtabhängige Regulation gezeigt wurde (Ziegler und Ziegler, 1965). Das Enzym besitzt eine komplexe Quartärstruktur. In den Plastiden höherer Pflanzen ist sie ein Tetramer, bestehend aus jeweils zwei Untereinheiten A und B. Die Untereinheit B zeigt eine hohe Sequenz-Ähnlichkeit (80%) zu A und unterscheidet sich durch eine Extension am Carboxy-Terminus des Enzyms. In Grün- und Rotalgen findet man die Untereinheit B nicht und das Enzym ist ein Homotetramer aus Untereinheiten des A Typs (Baalmann *et al.*, 1996; Liaud *et al.*, 2000).

Die Regulation der GAPDH zeigt ein komplexes Muster. Das A_2B_2-Enzym (150 kDa) der höheren Pflanzen liegt in verdunkelten Plastiden als enzymatisch nicht aktives A_8B_8-Oligomer (600 kDa) vor. Die Aktivierung ist abhängig von der Dissoziation des Oligomers und von der Reduktion der regulatorischen Disulfid-Brücke (Baalmann *et al.*, 1994). Unter reduzierenden Bedingungen (reduziertes Thioredoxin) können niedrige Konzentrationen des Substrates 1,3-Bisphosphoglycerat (K_a 1-2 µM, 1,3-BPGA) den oligomeren GAPDH-Komplex auflösen. In der Abwesenheit von Trx sind dafür unphysiologisch hohe Konzentrationen des Substrates notwendig. Die Dissoziation des Oligomers und die Reduktion führen zu einer Erhöhung der katalytischen Aktivität durch eine um Faktor 20 höhere Affinität für das Substrat (Baalmann *et al.*, 1994 und 1995).

Die Aggregation der GAPDH höherer Pflanzen scheint von der C-terminalen Extension (CTE) der Untereinheit B abhängig zu sein (Baalmann *et al.*, 1996; Scheibe *et al.*, 1996). Neben der Bedeutung für die Bildung höhermolekularer Komplexe trägt die CTE zwei weitere Cysteine, weshalb Scheibe und Mitarbeiter (Scheibe *et al.*, 1996) davon ausgehen, dass diese Cysteine an der Redox-Regulation der GAPDH beteiligt sind. Die plastidären GAPDH´s der Grünalgen besitzen die CTE nicht und aggregieren nicht in die polymere Enzymform, sind aber trotzdem Thiol-moduliert (Li *et al.*, 1997). Dies bestätigt die Bedeutung der CTE für die Bildung der A_8B_8-Form, spricht jedoch gegen eine Bedeutung der Cysteine der CTE an der Thiol-Modulation. Pacold und Mitarbeiter (Li *et al.*, 1994 und 1997) kommen auf der Grundlage von Struktur-Modellierungen auf der Basis von kristallographischen Daten cytosolischer GAPDH´s zu dem Ergebnis, dass das regulatorische Disulfid von den Cysteinen 19 und 291 gebildet wird. Diese Daten werden durch Untersuchungen an GAPDH´s von Rotalgen gestützt, denen Cystein 291 fehlt und die dadurch wahrscheinlich nicht reguliert sind (Pacold *et al.*, 1995). Es gibt bis jetzt keine direkten Nachweise für die Bedeutung der einzelnen Cysteine der GAPDH für die Thiol-Modulation der Enzymaktivität.

1.3.2.5 Die Thiol-Modulation der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH)

Die Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) ist das Schlüsselenzym für den OPPW, da sie die erste und irreversible Reaktion des oxidativen Zweigs dieser Reaktions-Sequenz katalysiert. Das plastidäre Enzym wird über das Fd/Trx-System genau gegenläufig zu den Enzymen des Calvin-Zyklus reguliert, so dass die Reduktion durch Trx zu einer Inhibierung des Enzyms führt. Dem entsprechend ist die plastidäre G6PDH nur im Dunkeln aktiv und somit sind die Reaktionen des oxidativen vom reduktiven Pentosephosphat-Zyklus zeitlich getrennt.

Die potentiell regulatorischen Cysteine liegen in den plastidären G6PDH´s innerhalb eines kurzen Sequenz-Bereichs von 100 Aminosäuren in der Nähe der $NADP^+$-Bindungsdomäne

(Rowland *et al.*, 1994; Wenderoth *et al.*, 1997). Durch gerichtete Mutagenese konnten die Cysteine 149 und 157 (Numerierung nach der *Solanum tuberosum* P1-Sequenz) als die das regulatorische Disulfid bildenden identifiziert werden (Wenderoth *et al.*, 1997). Diese Untersuchung zeigte auch, dass die Oxidation des Enzyms zu einer Erhöhung der Affinität für G6P führt (reduziertes Enzym: K_m = 40 mM; oxidiert Enzym: K_m = 1 mM). Obwohl die beiden Cysteine im Bereich der Coenzym-Bindedomäne liegen, wurden keine Effekte der Reduktion/Oxidation auf den K_m für $NADP^+$ beobachtet. Frühere Untersuchungen zeigten dagegen eine Veränderung des K_m sowohl für das Substrat als auch das Coenzym (Scheibe *et al.*, 1989).

Die cytosolischen Isoformen pflanzlicher Glucose-6-phosphat-Dehydrogenasen besitzen die regulatorischen Cysteine nicht und ihre Enzymaktivität ist nicht Redox-reguliert (Wenderoth *et al.*, 1997; Wendt *et al.*, 1999).

1.3.3 Die Kontrolle der PRK- und GAPDH-Aktivität durch regulatorische Proteinkomplexe

Bisher wurden verschiedene Proteinkomplexe von Calvin-Zyklus-Enzymen beschrieben und die meisten wurden im Zusammenhang mit Substrat-Kanalisierung diskutiert (Gontero *et al.*, 1988; Rault *et al.*, 1993; Süss *et al.*, 1993; Teige,1994).

Ein Komplex von PRK und GAPDH mit einem Molekulargewicht von ca. 500 kDa wurde in den Chloroplasten der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* gefunden (Avilan *et al.*, 1997a). Es konnte gezeigt werden, dass die Dissoziation dieses Proteinkomplexes eine Bedeutung für die Aktivierung der beiden Enzyme hat (Avilan *et al.*, 1997b; Lebreton *et al.*, 1997a und b).

In der Grünalge *Scenedesmus obliquus* sowie in Spinat wurden ebenfalls Proteinkomplexe von PRK und GAPDH mit Molekulargewichten von 560 kDa gefunden (Lazaro *et al.*, 1986; Clasper *et al.*, 1991). Die beiden Enzyme, die im Proteinkomplex keine Enzymaktivität zeigen, konnten durch NADPH, DTT und 1,3-Bisphosphoglycerat (O'Brien *et al.*, 1977; Nicholson *et al.*, 1987) aus diesem Komplex entlassen und aktiviert werden. Weiterhin konnte dieser Komplex nur aus verdunkelten Zellen isoliert werden, wohingegen die Enzyme im Licht unkomplexiert vorlagen. Nicholson und Mitarbeiter (Nicholson *et al.*, 1987) wiesen diesem Komplex eine Bedeutung für die lichtabhängige Regulation der Enzymaktivitäten und für die vollständige Inaktivierung der PRK im Dunkeln zu.

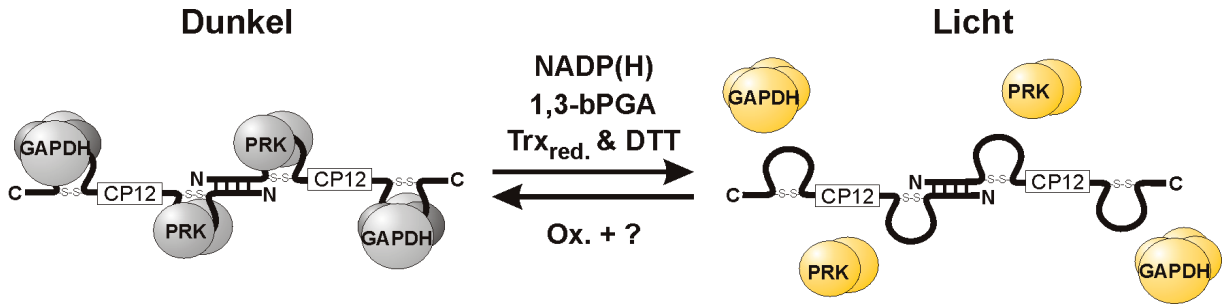


Abb. 1-4: Schematische Darstellung des plastidären PRK:CP12:GAPDH-Komplexes.
Der Kern des Komplexes besteht aus zwei N-terminal dimerisierten CP12-Molekülen. An diesen Kern ist im Dunkeln jeweils ein PRK-Dimer an die beiden N-terminalen Peptid-Schleifen gebunden. Die beiden C-terminalen Peptid-Schleifen tragen jeweils ein tetrameres GAPDH-Molekül. Die Enzyme besitzen im Komplex keine enzymatische Aktivität (grau gefüllte UE). Bei Übergang in die Belichtungsphase werden die Enzyme durch die steigende Konzentration von NADPH und/oder 1,3-bBGA aus dem Komplex freigesetzt. Die reduktive Aktivierung der Enzyme erfolgt durch Trx (gelb gefüllte UE). Die Darstellung wurde nach Wedel *et al.* (1998) verändert.

Unabhängig von diesen Untersuchungen wurde das enzymatisch inaktive, niedermolekulare Plastiden-Protein CP12 für höhere Pflanzen beschrieben (Pohlmeyer *et al.*, 1996). Dieses Protein, welches über Disulfidbrücken zwischen benachbarten Cysteinen zwei Peptid-Schleifen bildet, stellt den Kern für einen ca. 550 bis 600 kDa großen Proteinkomplex dar, bestehend aus PRK, GAPDH und CP12 (Wedel *et al.*, 1997; Wedel und Soll 1998). An zwei N-terminal dimerisierte CP12 Moleküle bindet jeweils ein PRK-Dimer an die N-terminale und ein GAPDH-Tetramer an die C-terminale Peptid-Schleife (siehe Abb. 1-4). Dieser Enzymkomplex dissoziiert, wie bereits für die oben genannten Komplexe beschrieben, durch NADPH, 1,3-bPGA und DTT. Es wird daher davon ausgegangen, dass die zuvor genannten Komplexe identisch mit dem PRK:CP12:GAPDH-Komplex sind (Wedel *et al.*, 1997). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass diese Form der Regulation in photosynthetischen Organismen konserviert ist. Gene für CP12 wurden in Cyanobakterien, Grünalgen, Moosen und höheren Pflanzen gefunden und die Präsenz des Komplexes im Dunkeln durch physiologische Untersuchungen bestätigt (Wedel und Soll, 1998).

1.4 Die Entwicklung und Evolution der Kieselalgen

Die in dieser Arbeit untersuchten Organismen *Coscinodiscus granii* und *Odontella sinensis* sind marine Vertreter der Algen-Klasse Bacillariophyceae (= Diatomeen, Kieselalgen).

Diese Klasse gehört zur Entwicklungslinie der Heterokontophyta, einer Abteilung, die durch die Aufnahme eines phototrophen Eukaryoten durch eine eukaryotische Wirtszelle und die darauf folgende Umwandlung des Endosymbionten in einen Chloroplasten entstanden ist. Diesen Vorgang bezeichnet man als sekundäre Endocytobiose, um sie von dem primären

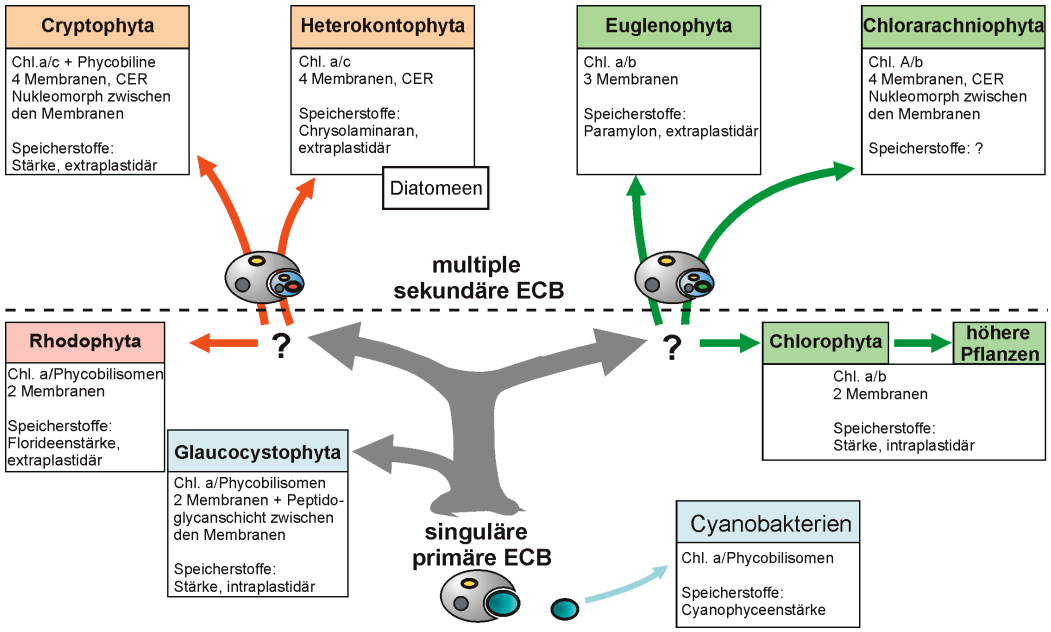


Abb.: 1-5: Schematische Darstellung der Entwicklung von Algen und Pflanzen.
Vereinfachter Stammbaum verschiedener Algenlinien (nach Delwiche, 1999, modifiziert). Gezeigt ist eine Auswahl der wichtigsten Algen-Phyla. Endosymbiose-Ereignisse (ECB) sind markiert und die Plastiden der Symbionten sind entsprechend ihres Ursprungs farbig hervorgehoben. Die nicht näher spezifizierten heterotrophen, eukaryotischen Wirte (Mitochondrien sind gelb, Kerne dunkelgrau hervorgehoben) sind grau und phototrophe Eukaryoten blau dargestellt. Fragezeichen verweisen auf einen nicht bekannten Vorläufer der rezenten Grün- bzw. Rotalgen. Die Pigment-Komposition, die Anzahl der Plastidenmembranen, das taxonomische Merkmal der verwendeten Speicherstoffe und deren Lokalisation sind jeweils angegeben.

Endocytobiose-Ereignis, welches zur Entstehung der ersten phototrophen Eukaryoten führte, zu unterscheiden (siehe Abb. 1-5).

Entsprechend der weitestgehend akzeptierten Endosymbionten-Theorie, wie sie 1905 von Mereschkovsky (Mereschkovsky, 1905) postuliert wurde, entstanden die Chloroplasten der ersten phototrophen Eukaryoten, indem ein heterotropher, eukaryotischer Wirt einen phototrophen Prokaryoten als Endosymbiont aufnahm. Im Laufe der Evolution wurde der aufgenommene Fremdorganismus schrittweise in ein Zellorganell umgewandelt. Es wird heute davon ausgegangen, dass der Ursprung aller primären Plastiden in einem einmaligen Endosymbiose-Ereignis liegt. Die Aufnahme eines frei lebenden Vorläufers der Cyanobakterien durch eine eukaryotische Wirtszelle führte zu einer einzigen evolutionären Linie [siehe Abb. 1-5 (Martin *et al.*, 1998; Delwiche, 1999)]. Aus dieser einen Linie entwickelten sich die zwei großen Äste des Pflanzenreichs. Die Chlorophyll a/b-Linie führt über die einfachen Grünalgen zu den rezenten Vertretern der Chlorophyta und höheren Pflanzen (Lemieux *et al.*, 2000). Die weniger abgeleitete Linie, die weiterhin die Pigment-Komposition des cyanobakteriellen Endosymbionten besitzt, also die Chlorophyll a/Phycobilin-Linie, führt zu den Vertretern der heutigen Rhodophyten. Eine weitere bereits früh getrennte Gruppe, die Glaucocystophyta (Delwiche und Palmer, 1997; Martin *et al.*, 1998; Cavalier-Smith, 2000) besitzt ebenfalls die

gleichen Pigmente wie die Rotalgen und der cyanobakterielle Vorläufer. Dass die Plastiden dieser Gruppe, auch Cyanellen genannt, eine Peptidoglycan-Wand zwischen den beiden Hüllmembranen besitzen (Giddings *et al.*, 1983; Löffelhardt *et al.*, 1994), wurde als weiterer Beleg für den cyanobakteriellen Ursprung der Plastiden gewertet.

Mitglieder der Chloro- und Rhodophyten waren wiederum Vorfahren verschiedener Algengruppen, die wahrscheinlich durch mehrere unabhängige, sekundäre Endosymbiosen entstanden [siehe Abb. 1-5 (Douglas, 1998; Martin *et al.*, 1998; Delwiche, 1999)]. In diesen sekundären Endosymbiose-Vorgängen wurden phototrophe Eukaryoten aus einer der beiden Linien durch einen heterotrophen Eukaryoten aufgenommen. Die Reduktion der aufgenommenen Algen führte dann zu den sekundären Plastiden, die typischerweise entweder drei, meist aber vier Hüllmembranen besitzen, wodurch sie sich von den primären Plastiden, die zwei Membranen besitzen, unterscheiden. Die Existenz eines Kernrudiments (Nucleomorph) zwischen den Plastidenmembranen der Cryptophyta und der Chlorarachniophyta wurde als Beleg für ein solches Endosymbiose-Ereignis gewertet (Douglas *et al.*, 1991).

1.5 Die Kieselalgen

Kieselalgen (Diatomeen, Bacillariophyceae) sind einzellige bisweilen aber koloniebildende Algen, die durch den Besitz einer Kieselschale (Frustulum) charakterisiert sind. Diese ist ein wichtiges Klassifizierungsmerkmal der Diatomeen. Die Kieselalgen mit einer Radiär-Symmetrie (Ordnung Centrales) werden von denen mit einer länglichen Form oder bilateralen Symmetrie (Ordnung Pennales) unterschieden (van den Hoek *et al.*, 1993).

Die Kieselschalen bestehen aus amorphem Silikat mit einer organischen Matrix von Proteinen und Polysacchariden. Die Biogenese dieser Schalen ist zur Zeit noch wenig untersucht. Bekannt ist, dass die Kondensation der Kieselsäure im sauren Milieu spezieller Vesikel stattfindet, den sogenannten “silicon-deposition-vesicle“ [SDV (Vrieling und Gieskes, 1999)], und dass die Protein-Matrix wahrscheinlich das Grundgerüst bildet, in dem polykationische Peptide (Silafine) an der Präzipitation des Silikats beteiligt sind (Kröger und Sumper, 1998; Kröger *et al.*, 1999).

Die Chloroplasten der Diatomeen besitzen insgesamt vier Hüllmembranen, von denen wahrscheinlich die beiden inneren den ursprünglichen Envelopmembranen der Plastide des Endosymbionten entsprechen. Die beiden äußeren Membranen leiten sich wahrscheinlich von der Plasmamembran des Endosymbionten sowie der phagotrophen Membran des Wirtes ab (Whatley *et al.*, 1979). Auf der äußeren der Hüllmembranen befinden sich Ribosomen, weshalb diese Membran wegen ihrer Ähnlichkeit mit dem rauhen Endoplasmatischen Retikulum (rER)

auch als Chloroplasten ER (CER) bezeichnet wird. Es gibt Hinweise, dass das CER eine Verbindung zum cytosolischen ER besitzt (Gibbs, 1981).

Der Raum zwischen den beiden äußeren und inneren Membranen wird periplastidärer Raum genannt. Die Cryptophyta und Chlorarachniophyta enthalten in diesem Raum nicht nur den Nukleomorph, sondern auch Ribosomen (80S) und Stärkekörner (Maier, 1992; McFadden *et al.*, 1994). Dies zeigt, dass im periplastidären Raum auch metabolische Reaktionen ablaufen können. Der periplastidäre Raum der Diatomeen ist sehr viel kleiner und weist weder einen Nukleomorph noch Stärke auf.

Die Diatomeen-Plastiden weisen die Chlorophylle a und c und das akzessorische Pigment Fucoxanthin auf, welches für die typische Färbung der Diatomeen verantwortlich ist (van den Hoek *et al.*, 1993).

Diatomeen bilden als Speicherstoff ein β-1,3-Glucan, das Chrysolaminarin, das in speziellen Vakuolen außerhalb der Plastiden gespeichert wird (Vårum und Myklestad, 1984; Roessler, 1987). Der Ort der Synthese von Chrysolaminarin innerhalb der Zelle ist derzeit noch offen. Da die Plastiden Triosephosphat exportieren können und aufgrund der Lokalisation der Speichervakuolen wird vermutet, dass die Synthese möglicherweise im ER (CER) stattfindet (Wittpoth, 1996; Wittpoth *et al.*, 1998).

Diatomeen sind als photoautotrophe Organismen von Licht und der Verfügbarkeit von anorganischem Kohlenstoff in Form von CO_2 abhängig. Obwohl CO_2 in der See in hohen Konzentrationen existiert, liegt der Großteil als Bicarbonat-Ion (HCO_3^-) vor, so dass die Rubisco unter diesen Bedingungen durch die CO_2-Konzentration limitiert wäre. Diatomeen umgehen dieses Problem, indem sie einen CO_2-Konzentrierungs-Mechanismus besitzen, der das Biocarbonat-Ion zu CO_2 umwandelt (Sültemeyer, 1998).

Ein weiteres Problem für die Photosynthese ergibt sich aus der schwankenden Lichtenergie, die den Algen zur Verfügung steht. Bedingt durch die Entfernung von der Wasseroberfläche kann dem diurnalen Licht/Dunkel-Zyklus eine große Fluktuation der Licht-Intensitäten überlagert sein. Rheinfelder und Mitarbeiter (Rheinfelder *et al.*, 2000) konnten zeigen, dass Diatomeen analog zur C_4-Photosynthese der höheren Pflanzen CO_2 als C_4-Verbindung im Cytosol speichern können; dies könnte der erste Nachweis für C_4-Photosynthese in einem einzelligen Organismus sein. Obwohl dieser Mechanismus noch nicht vollständig bewiesen ist, würde ein solcher den Diatomeen wahrscheinlich einen Vorteil bieten, indem sie in Zeiten mit niedrigen Licht-Intensitäten CO_2 als C_4-Verbindung fixieren könnten. Dieses CO_2 könnte dann während starker Belichtung nahe der Wasseroberfläche freigesetzt werden und zusätzlich zum

CO_2 aus dem Konzentrierungs-Mechanismus der Photosynthese zur Verfügung stehen (Riebesell, 2000).

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Die Regulation der Photosynthese durch die Fd/Trx-System vermittelte Thiol-Modulation plastidärer Enzyme wird meist als ubiquitär in allen photosynthetischen Eukaryoten und Cyanobakterien betrachtet. Es gibt jedoch zunehmend Hinweise, dass dies nicht für alle Enzyme in allen Algenlinien gilt. So gibt es klare Hinweise dafür, dass die PRK, die GAPDH und möglicherweise auch die FbPase in den Cyanobakterien *Synechocystis* und *Synechococcus* nicht Thiol-moduliert sind (Tamoi *et al.*, 1998). Für die Organismen der Rotalgenlinie gibt es Hinweise, dass die GAPDH einiger Rotalgen nicht Redox-reguliert ist (Pacold *et al.*, 1995). Für die Kieselalgen konnte bisher für zwei Enzyme gezeigt werden, dass sie nicht Redox-reguliert sind. In den Diatomeen *O. sinensis* und *C. granii* wird sowohl die ATP-Synthase als auch die plastidäre Malat-Dehydrogenase (MDH) nicht durch Trx reguliert. Der ATP-Synthase fehlt die das regulatorische Disulfid tragende Insertion der γ-Untereinheit und ist dem entsprechend nicht reguliert (Pancic und Strotmann, 1993; Kroth unveröffentlicht). Für die MDH konnte keine $NADP^+$-abhängige Aktivität in den Plastiden nachgewiesen werden und die NAD^+-abhängige plastidäre Isoform ist nicht Redox-reguliert (Mertens, 1997, Ocheretina *et al.*, 2001).

Daraus ergibt sich die Frage, welche Unterschiede sich für die Regulation der Photosynthese der Diatomeen im Vergleich zu höheren Pflanzen ergeben bzw. welche Bedeutung die Redox-Regulation des Calvin-Zyklus in diesen Organismen überhaupt hat.

Ziel der Arbeit ist eine Beschreibung der Thiol-Modulation der Enzyme des Calvin-Zyklus und des oxidativen Pentosephosphat-Wegs in Diatomeen-Plastiden. Dabei sollen Unterschiede im Vergleich zu den höheren Pflanzen auch auf molekularer Ebene der Enzyme untersucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Allgemeines

Alle verwendeten Reagenzien besaßen, wenn nicht anders bezeichnet, den Reinheitsgrad *pro analysis*. Alle Lösungen wurden mit hochreinem doppelt destilliertem Wasser (Hausanlage mit nachgeschalteter Destillationsapparatur, GFL GmbH Burgwedel Deutschland) hergestellt.

Die Sterilisation von Lösungen und Glasgeräten erfolgte, soweit keine Einschränkungen durch die Reagenzien bestanden, durch Dampfdrucksterilisation (20 Min., 121°C). Nicht autoklavierbare Lösungen wurden mittels einer 0,2 µm Membran sterilfiltriert. Die Sterilisation von Glasgeräten erfolgte durch Erhitzen über Nacht bei 180°C. Das für die Kultivierung der Algen verwendete artifizielle Seewasser wurde zur Fremdkeimreduzierung zweimal über Nacht auf 90°C erhitzt.

2.1.2 Biologisches Material

Die Kultivierung der Kieselalgen *Odontella sinensis* und *Coscinodiscus granii* erfolgte in artifiziellem Seewasser bei 16°C und einer Photonenflussdichte von ca. 15 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} in einem 14 h/10 h Licht/Dunkel-Rhythmus unter ständiger Begasung mit gefilterter Raumluft. Die Alge *Phaeodactylum tricornutum* (Stamm UTEX646) wurde in 100% F2-Medium, die Algen *Heterosigma carterae* (*Olisthodiscus luteus* Stamm Plymouth 239) und *Porphyridium purpureum* (Stamm 1380-1a) in 50% F2-Medium, unter den oben genannten Licht- und Begasungsbedingungen kultiviert.

Ausgangsmaterial für die Präparation intakter Chloroplasten höherer Pflanzen war Spinat (*Spinacia oleracea*) der Sorte „Polka“. Die Pflanzen wurden im Gewächshaus der Heinrich-Heine-Universität bei 20°C und einem 12 h/12 h Licht/Dunkel-Rhythmus bei einer Photonenflussdichte von ca. 300 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} angezogen.

2.1.3 Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz
XL1-blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 [F´ proAB lacI^{q}ZΔM15 Tn10 (Tet^r)] relA1 lac	Stratagene Katalog (1994)
LE392	F$^-$ (e14$^-$) hsdR514 supE44 supF58 Δ(lacIZY)6 galK2 galT22 metB1 trpR55	Sambrook *et al.* (1989)
BL21 (DE3)	E. Coli B F$^-$ dcm ompT hsdS(r_B- m_B-) gal λ(DE3)	Studier und Moffat (1986)
BL21 CodonPlus-RP (DE3)	E. Coli B F$^-$ dcm ompT hsdS(r_B- m_B-) gal λ(DE3) Tet^r endA Hte [argU proL Cam^r]	Stratagene Manual Produkt #230255

2.1.4 Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Quelle/Referenz
pTYmatPRK	PRK Sequenz des reifen Proteins von *Odontella sinensis* im Vektor pTYB1. Die Sequenz wurde von cDNA mit den Primern PRK-L1- und PRK-R1- Intein amplifiziert und über die Klonierungs-positionen NdeI (N-terminal) und SapI (C-terminal) im gleichen Leserahmen mit der C-terminalen vektorkodierten Intein-Chitinbindedomäne kloniert.	Diese Arbeit und NEB-Produkt
pTYmatPRKochre	PRK Sequenz des reifen Proteins *von Odontella sinensis* im Vektor pTYB1, jedoch mit dem natürlichem Stopp-Kodon (ochre UAA) und daher ohne Intein-CBD-Addukt.	Diese Arbeit und NEB-Produkt
pTrxm	Die kodierende Sequenz für das reife Thioredoxin der Isoform m aus *Spinacia oleracea* im Vektor pET-23d ohne Histidin-Addukt	Toru Hisabori in Stump *et al.*,1999
pTrxf	Die kodierende Sequenz für das reife Thioredoxin der Isoform f aus *Spinacia oleracea* im Vektor pET-23d ohne Histidin-Addukt.	Toru Hisabori in Stump *et al.*,1999

2.1.5 Antikörper

Antigen / Spezies	Hersteller
CP12 / *Chlamydomonas reinhardtii*	N. Wedel, Universität Kiel
CP12 / *Spinacia oleracea*	N. Wedel, Universität Kiel
GAPDH / *Phaeodactylum tricornutum*	R. Cerff, Universität Braunschweig
GAPDH / *Spinacia oleracea*	N. Wedel, Universität Kiel
PRK / *Odontella sinensis*	K. Weihrauch, Universität Düsseldorf
PRK / *Spinacia oleracea*	N. Wedel, Universität Kiel
Trx f / *Spinacia oleracea*	P. Schürmann, Universität Neuchâtel, Schweiz
Trx m / *Spinacia oleracea*	P. Schürmann, Universität Neuchâtel, Schweiz

2.1.6 Proteine

Rinderserumalbumin (BSA) Fraktion V	Roche, Mannheim
DNaseI (Klasse 1)	Roche, Mannheim
Pyruvat-Kinase	Roche, Mannheim
L-Lactat-Dehydrogenase	Roche, Mannheim
Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase	Roche, Mannheim
Phosphoglukose-Isomerase	Roche, Mannheim
3-Phosphoglycerat-Phosphokinase	Sigma, St. Louis USA
Phosphoribose-Isomerase	Sigma, St. Louis USA
Catalase	Roche, Mannheim
Superoxid-Dismutase	Roche, Mannheim
Restriktionsendonuklasen:	NEB, USA & Roche Mannheim
Proteinstandard 7L und 7Lb	Sigma, St. Louis USA
PNGaseF	Sigma, St. Louis USA
N-Glykosidase A	Roche, Mannheim
Thermolysin	Fluka, Steinheim

2.1.7 Nukleotide und Nukleinsäuren

Nukleotide:	Desoxynukleotid-5´-triphosphate	Roche, Mannheim
	Desoxyadenosin-5´-[α^{32}P]-triphosphat	Amersham
Nukleinsäuren:	kB-Leiter	Roche, Mannheim
	Heringssperm DNA	Roche, Mannheim

Oligonukleotide für die PCR:		MWG Biotech
PRK-L1 Intein	$^{5´}$TCCGCCCTCCATATGGCCCTGAAGGAG$^{3´}$	
PRK-R1 Intein	$^{5´}$GAAGAATAAGCTCTTCCGCAGGCCTCGATCACGGCAAG$^{3´}$	
PRK-R2 His	$^{5´}$GAATAAAACAGCATCTGGGCCTCGATCACGGCAAG$^{3´}$	
PRK-Cter-ochre+	$^{5´}$ATTATGAAGCTCTTCCGCATCATTAGGCCTCGATCACGGC$^{3´}$	
Pe18S+10	$^{5´}$ACGAGCGTATGACTACTGGCAGGATC$^{3´}$	
Pe18S+35	$^{5´}$GCATGGCTTAATCTTTGAGACGAGCG$^{3´}$	
PePRK-8	$^{5´}$CCAAGGGACAGCTTCATGGTTTCA$^{3´}$	
PePRK-1	$^{5´}$GACGATGCCAAGGGACAGCTTCATG$^{3´}$	

2.1.8 Feinchemikalien

6-Phosphoglukonat	Roche, Mannheim
Adenosintriphosphat, ATP	Roche, Mannheim
Ampicillin	Roche, Mannheim
Bicine *ultra pure*	Sigma, St. Louis USA
BioGel A5m	Bio-Rad, Richmond, USA
Bradford-Reagenz	Bio-Rad, Richmond, USA
Butyl 650 m	TosoHaas, Tosoh, Tokyo, Japan
Chitin-Agarose	New England Biolabs, USA
Dithiobisnitrobenzoesäure, DTNB	Sigma, St. Louis USA

Dithiotreitol, DTTred oder DTT	Sigma, St. Louis USA
EGTA	Roche, Mannheim
Formaldehyd	Merk, Darmstadt
Fruktose-1,6-bisphosphat	Roche, Mannheim
Glukose-6-phosphat	Roche, Mannheim
Glutaraldehydlösung 25%	Merk, Darmstadt
Glycerol 98%	Roche, Mannheim
Isopropylthiogalctosid, IPTG	Roth, Karlsruhe
Kieselsäure	Roth, Karlsruhe
Mercaptoethanol	Roth, Karlsruhe
NADH, NAD und NADPH	Roche, Mannheim
Percoll	Pharmacia, Upsala, Schweden
Phenylmethylsulfonylfluorid, PMSF	Roche, Mannheim
Phosphoenolpyruvat, PEP	Roche, Mannheim
Polyacrylamid RothiGel P30 (30:0,8) Rothiphorese Sequenziergel-System	Roth, Karlsruhe
Polyethylenglykol PEG 6000	Serva, Heidelberg
Reactive Red Cl-6b	Sigma, St. Louis USA
RESOURCE Q	Pharmacia, Upsala, Schweden
Ribose-5-phosphat, R5P	Roche, Mannheim
Ribulose-5-phosphat, Ru5P	Sigma, St. Louis USA
Röntgenfilme X-Omat AR	Kodak, USA
XR-100	Fuji, Japan
Sedoheptulose-1,7-bisphosphat	Sigma, St. Louis USA
Sorbitol	Roche, Mannheim
Superose 75	Pharmacia, Upsala, Schweden
Superose S300HR	Pharmacia, Upsala, Schweden
SuperQ 650 m	TosoHaas, Tosoh, Tokyo, Japan
trans-4,5-Dihydroxy-1,2-dithiane, oxidiertes DTT (DTTox)	Sigma, St. Louis USA
Triton X100	Serva, Heidelberg

2.1.9 Verschiedenes

0,2 µm Sterilfilter	Schleicher und Schuell, Dassel
Biospin P6	Biorad, Richmond, USA
Slide-A-Lyzer Dialyserahmen 10 kDa Mw cutoff	Pierce, Rockford, USA
Nitrozellulose, Typ Protran 0,2 µm Porengröße	Schleicher & Schuell, Dassel

2.1.10 Allgemeine Puffer und Medien

Artifizielles Seewasser	33,3	g/l	Marinsalz (Tropic Marin)
	30	µM	Na_2HPO_4 x 2 H_2O
	500	µM	$NaNO_3$
	0,3	‰	Kieselsäure
	160	µg/l	Vitamin B_{12}
	80	µg/l	Biotin
	2	mg/l	Thiamin

F2-Medium	20	mM	Tris
	880	µM	$NaNO_3$
	36	µM	NaH_2PO_4 x H_2O
	50	mg/l	$CuSO_4$ x $5H_2O$
	110	mg/l	$ZnSO_4$ x $7H_2O$
	50	mg/l	$CuCl_2$ x $6H_2O$
	90	mg/l	$MnCl_2$ x $4H_2O$
	31	mg/l	$NaMoO_4$ x $2H_2O$
	16	mg/l	$FeCl_3$ x $6H_2O$
	160	µg/l	Vitamin B_{12}
	80	µg/l	Biotin
	2	mg/l	Thiamin
LB	10	g/l	Pepton
	5	g/l	Yeast Extrakt
	5	g/l	NaCl
			NaOH ad pH 7,3
YT	10	g/l	Pepton
	10	g/l	Yeast Extrakt
	5	g/l	NaCl
			NaOH ad pH 7,5
TAE	40	mM	Tris-Acetat, pH 7,5
	1	mM	EDTA
TBE	90	mM	Tris-Borat, pH 8,3
	2,5	mM	EDTA

2.2 Allgemeine Methoden

2.2.1 UV/Vis-Spektroskopie

Die spektralphotometrische Bestimmung der Konzentrationen von Nukleinsäuren, Nukleotiden, Proteinen und einigen Reagenzien sowie die Reinheitsbestimmung von Nukleinsäuren wurde in einem Spektralphotometer, Modell DU640 (Beckman Coulter, München), vorgenommen. Die Analyse von Enzymkinetiken erfolgte entweder in oben genanntem Gerät oder in einem Photometer, Modell 1101M der Firma Eppendorf (Eppendorf, Hamburg).

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Reagenzien wurde im Spektralphotometer mit einer Quarzküvette bei einer Wellenlänge von 260 nm durchgeführt, wobei die zu messende Lösung so verdünnt war, dass die Extinktionswerte in einem Bereich zwischen 0,1

und 0,9 lagen. Die Messung wurde nach Abgleichung der Referenz vorgenommen. Die Überprüfung der Reinheit von Nukleinsäuren wurde durch Aufnahme eines Absorptionsspektrums im Wellenlängenbereich zwischen 220 nm und 320 nm und der Ermittlung des A260/A280-Quotienten vorgenommen (für eine reine Präparation wurde ein Wert von 1,8 bis 2,0 angenommen).

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleotiden oder Reagenzien erfolgte nach dem Lambert-Beerschen Gesetz bei einer für die Substanz spezifischen Wellenlänge λ, unter Berücksichtigung des entsprechenden Extinktionskoeffizienten. Die Wellenlängen und die verwendeten molaren Extinktionskoeffizienten ε der so quantifizierten Reagenzien sind unten angegeben. Die Konzentrationsbestimmung von Proteinen erfolgte durch die Farbstoffbindung im Bradford-Testsystem (Bio-Rad, Richmond USA). Die Konzentration wurde aus dem Vergleich mit einer Kalibrierung gegen BSA bestimmt.

Substanz	Wellenlänge [nm]	Extinktionskoeffizient ε [M^{-1} cm^{-1}]	Referenz
ATP	259	$1{,}54 \times 10^4$	Fasman (1979)
TNB^{2-}	412	$1{,}415 \times 10^4$	Riddles *et al.* (1979)
NADH und NADPH	340	$6{,}22 \times 10^3$	Fasman (1979)
Protein-Bestimmung Bradford	590	Eichung gegen BSA	
trans-4,5-Dihydroxy-1,2-dithian, oxidiertes DTT	310	110	Iyer und Klee (1973)

2.2.2 Gelelektrophoresen

Für die Auftrennung von DNA wurden horizontale Flachbettgele (Agarose-Gele) und für kleinere Fragmente native, vertikale Polyacrylamidgele verwendet. Die Auftrennung der Terminations-Fragmente der DNA-Sequenzierung nach der Methode von Sanger und Coulson (1975) erfolgte in denaturierenden Harnstoffgelen. Die Auftrennung von Proteinen erfolgte in denaturierenden diskontinuierlichen Polyacrylamidgelsystemen.

2.2.2.1 Agarosegelelektrophorese

Für die analytisch und präparative Auftrennung von Plasmid-DNA und DNA-Fragmenten wurde die Agarose der Firma Seakem verwendet. Die Auftrennung erfolgte je nach Größe der DNA in 1% bis 2%igen Agarose-Gelen, wie von Sambrook *et al.* (1989) beschrieben. Der Laufpuffer war 1x TAE und die Elektrophorese erfolgte bei 8 V/cm. Die Detektion von DNA erfolgte durch die Fluoreszenz des in die DNA interkalierten Ethidiumbromids (mit einer EK von 0,4 µg/ml im Gel enthalten) bei Anregung mit UV-Licht.

2.2.2.2 Polyacrylamidgelelektrophorese unter nativen Bedingungen

Die Analyse kurzer DNA-Fragmente (<1 kB) erfolgte in vertikalen Polyacrylamidgelen. Es wurden Gellösungen mit einer Prozentigkeit von 8% bis 15% PAA und einer Vernetzung von 19:1 Acrylamid:Bisacrylamid) in 1 x TBE Puffer hergestellt und wie in Sambrook *et al.* (1989) beschrieben verwendet. Die Geldimensionen betrugen 90 x 90 x 0,5 mm. Die Elektrophorese erfolgte bei 100 V für ca. 1 Stunde mit 1 x TBE als Elektrophorese-Puffer. Der Nachweis von DNA in der Gelmatrix erfolgte durch Färbung mit Silber nach der Methode von Beidler *et al.* (1982).

2.2.2.3 Sequenziergele

Die Analyse der Terminationsfragmente aus der Sequenzierungs-Reaktion nach Sanger und Coulson (1975) erfolgte in 4%igen Polyacrylamidgelen. Für die Auftrennung von Primer-Extensions-Reaktionen wurden 12%ige Gele verwendet. Die Auftrennung erfolgte unter denaturierenden Bedingungen durch die Gegenwart von 8 M Harnstoff. Zur Herstellung wurde das Rotiphorese Sequenziergelsystem der Firma Roth verwendet. Vollständig polymerisierte Gele wurden vor dem eigentlichen Gellauf für 90 Minuten bei einer konstanten Leistung von 75 W vorgeheizt. Dann wurden die Proben (3 – 5 µl) in 1 x Formamid-Probenpuffer für 3 Minuten bei 95°C denaturiert, danach aufgetragen und elektrophoretisch getrennt.

Gele von Sequenzierungsreaktionen wurden nach dem Gellauf samt Trägerplatte in 10% (w/v) Essigsäure fixiert und bei 80°C getrocknet. Die Detektion erfolgte durch Autoradiographie bei RT über Nacht. Gele von Primer-Extensions-Reaktionen wurden auf Whatman 3MM-Papier aufgezogen und die Exposition erfolgte den Aktivitäten entsprechend für wenige Stunden bis zu mehreren Tagen bei –20°C.

2.2.2.4 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Analyse von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde ein diskontinuierliches Polyacrylamidgelsystem nach Laemmli (1970) verwendet. Das Gelsystem hatte eine Dimension von 300 x 200 x 1 mm und bestand aus einem Sammelgel (35 mm) und einem Trenngel (260 mm). Das Trenngel hatte eine Konzentration von 10% - 15% PAA (375 mM Tris/HCl, pH 8,8 und 0,1% SDS) und das darüber befindliche Sammelgel eine Konzentration von 4% PAA (125 mM Tris/HCl, pH 6,8 und 0,1% SDS), beide mit einem Vernetzungsgrad von 19:0,82 (Acrylamid:Bisacrylamid).

Vor dem Auftrag wurden konzentrationsbedingt 5 bis 50 µl der Proteinlösung mit SDS-Probenpuffer und 2-Mercaptoethanol (EK 20 mM) versetzt und dann zur vollständigen Denaturierung für 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Proteinproben, die zu Cystein-

Quervernetzungen neigen, wurden zunächst für 10 Minuten mit 20 mM DTT vollständig reduziert und dann die reduzierten proteinogenen Sulfhydrylgruppen durch Zugabe von 45 mM Iodacetessigsäure vollständig alkyliert. Danach folgte die Vorbereitung der Proben wie oben beschrieben.

Die Elektrophorese erfolgte zunächst bei 25 mA bis der Bromphenolblau-Marker die Grenzschicht zwischen Sammel- und Trenngel erreicht hatte. Danach wurden die Proben bei einem Stromfluss von 30 - 45 mA für 6 bis 14 Stunden aufgetrennt. Die Detektion der Proteinbanden erfolgte durch Silberfärbung (siehe 1.2.3.1) oder durch spezifische Detektion mit Antikörper (siehe 1.2.3.2).

Elektrophorese-Puffer:		**SDS-Probenpuffer:**	
6 g/l	Tris	125 mM	Tris/HCl, pH 6,8
28,8 g/l	Glycin	2 %	SDS
1 g/l	Natriumdodecylsulfat (SDS)	20 %	Glycerol
		0,1 %	Bromphenolblau

2.2.3 Nachweis von Proteinen in der Gelmatrix

2.2.3.1 Proteinnachweis durch Silberfärbung

Die Silberfärbung von Proteinen in der Gelmatrix erfolgte nach der Methode von Heukeshoven und Dernick (1986), bei der die Nachweisgrenze bei 4 - 10 ng Protein liegt. Im Detail wurden die Gele zunächst für mindestens 1h in 30% Ethanol, 10% Essigsäure fixiert. Eine Inkubation von 30 bis 60 Minuten in Reduktorlösung diente der Signalverstärkung. Nach dreimaligem Waschen mit dest. Wasser für jeweils 10 Minuten wurde das Gel in Silberlösung für 30 Minuten inkubiert. Nach kurzem Spülen mit dest. Wasser wurde dann so lange entwickelt bis die Banden deutlich sichtbar waren. Die Entwicklung wurde entweder durch Zugabe von Zitronensäure (EK 250 mM) oder nach Verwerfen der Entwicklerlösung in 50 mM EDTA gestoppt.

Reduktorlösung:		**Silberlösung:**		**Entwickler:**	
30 %	Ethanol	0,1 %	$AgNO_3$	2,5 %	$NaCO_3$
0,5 %	Na-Acetat	0,02 %	Formaldehyd	0,02 %	Formaldehyd
0,2 %	Na-Thiosulfat				
0,5 %	Glutaraldehyd				

2.2.3.2 Immunodetektion von Proteinen

Transfer von Proteinen auf Nitrozellulose („Western-Blot“)

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen mittels spezifischer Antikörper wurden die durch SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf Nitrozellulose (siehe 2.1.9) übertragen. Der Transfer erfolgte nach der Methode von Kyhse-Anderson (1984) in einer „Semi-Dry-Blotting“-Apperatur (Multiphor II, Nova Blot, Pharmacia). Der Aufbau der „Blotting“-Apparatur war wie folgt: Befeuchtete Kathode, 2 Lagen Whatman Papier 3MM getränkt mit Lösung L1, ein Whatman Papier getränkt in Lösung L2, Nitrozellulosemembran getränkt in Lösung L2, PAA-Gel das zuvor kurz in Lösung L2 geschwenkt wurde, 3 Lagen Whatman Papier getränkt mit Lösung L3 und zuletzt die benetzte Anode. Beim Aufbau wurden eventuell vorhandene Luftblasen entfernt bevor die Anode aufgesetzt wurde. Der Transfer der Proteine wurde bei einem konstanten Stromfluss von 0,8 mA/cm^2 für 90 Minuten durchgeführt. Zur Überprüfung des Transfers wurde die Membran anschließend mit dem Farbstoff Ponceau S gefärbt und die Position von Marker- und abundanten Proteinen markiert.

Blot-L1:
300 mM Tris/HCl pH 10,4
20 % Methanol (v/v)

Blot-L2:
25 mM Tris/HCl pH 10,4
20 % Methanol (v/v)

Blot-L3:
25 mM Tris/HCl pH 9,4
20 % Methanol (v/v)
40 mM ε-Aminocapronsäure
0,5 % SDS (w/v)

Ponceau S-Lösung:
0,5 % Ponceau S
1 % Essigsäure

Immunologischer Nachweis membrangebundener Proteine

Der spezifische Nachweis von Proteinen auf Nitrozellulosemembranen erfolgte durch Antikörperbindung. Die behandelte Nitrozellulose wurde zunächst zur Absättigung der Membran zweimal für jeweils 15 Minuten in Caseinlösung inkubiert. Nach Waschen der Membran mit TBS wurde diese über Nacht bei 4°C auf einem Taumelschüttler mit dem spezifischen Antikörper inkubiert. Die optimale Verdünnung des spezifischen Antikörpers war zuvor in einer Konzentrationsreihe ermittelt worden. Die optimalen Verdünnungen der Antikörper in Casein waren für den OSPRK-Antikörper 1/1.000 und für die Antikörper Thx-m/Spinat und Thx-f/ Spinat 1/5.000. Nach dieser Inkubation wurden unspezifisch gebundene Antikörper durch zweimaliges Waschen der Membran mit TBST für jeweils 15 Minuten entfernt. Nach erneuter Absättigung der Membran wurde bei Raumtemperatur für 90 Minuten mit Anti-Kaninchen-IgG-

Peroxidase-Konjugat (1/10.000 verdünnt) inkubiert. Vor dem Nachweis der Antikörperbindung wurden unspezifisch gebundene Zweitantikörper durch dreimaliges Waschen mit TBST und ein mal TBS für jeweils 15 Minuten entfernt. Der Nachweis erfolgte über die an den Zweitantikörper gebundene Peroxidase mit Hilfe des Luminol-Nachweissystems (Boehringer, Mannheim) oder, wenn die Signale quantifiziert werden sollten, mit ECL-Plus (Amersham Pharmacia, Upsala Schweden).

Casein-Lösung:		**TBS:**		**TBST:**	
1 %	Casein	10 mM	Tris/HCl pH 8	10 mM	Tris/HCl pH 8
10 mM	Tris/HCl pH 8	150 mM	NaCl	150 mM	NaCl
150 mM	NaCl			1 %	Triton X-100

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Amplifizierung von DNA mit der Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Unter Verwendung der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) (Faloona *et al.*, 1987; Saiki, 1988) wurden DNA-Fragmente aus genomischer DNA sowie von Plasmid-DNA und aus cDNA-Banken amplifiziert. Die in dieser Arbeit verwendeten Primer sind unter 2.1.7 zusammengestellt. Die PCR-Bedingungen wurden an das Template, die zu amplifizierende Fragmentlänge, die verwendete Polymerase und die thermodynamischen Eigenschaften der Primer/Template-Wechselwirkungen angepasst. Ein Standard PCR-Ansatz enthielt die folgende Komponenten in der angegeben Konzentration: 1x Reaktionspuffer nach Herstellerangabe, „upstream“- und „downstream“-Primer jeweils 300 nM, dNTP-Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) 350 µM, DNA zwischen 10 und 500 ng. Die Amplifizierungsreaktion wurde in 20 bis 100 µl Gesamtvolumen in einem PCR-Gerät Typ Mastercycler/Gradient (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Die Klonierung der DNA-Fragmente erfolgte entweder unter Verwendung des von der Taq-Polymerase angefügten Desoxyadenosin-„tails“ in den pGEMT-Vektor oder im Falle der Proteinexpressionsklone über die im Primer integrierte Restriktionsschnittstelle.

2.3.2 Klonierung von DNA

Die Klonierung erfolgte nach Standardprozeduren wie von Sambrook *et al.* (1989) beschrieben. Analytische sowie präparative DNA-Restriktionen wurden in der Regel in 1x Reaktionspuffer, der nach den Angaben des Herstellers ausgewählt wurde, durchgeführt. Dabei

wurde pro µg DNA ein Reaktionsvolumen von 20 µl und eine Enzymeinheit (Unit) der entsprechenden Restriktionsendonuklease eingesetzt. Die Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus der PCR oder aus DNA-Restriktionen erfolgte nach der Auftrennung in Agarose-Flachbettgelen aus der excisierten Bande durch Gelelution. Hierfür wurde das QuiaExII-Kit nach Angaben des Herstellers verwendet (Qiagen, Hilden). Die Ligation der Fragmente in Klonierungs- oder Expressionsvektoren erfolgte über die durch die Restriktion eingeführten kompatiblen, kohäsiven Enden mit T4 DNA-Ligase nach Angaben des Herstellers. Die Ligation wurde zur weiteren Amplifizierung der Plasmid-DNA in Bakterien transformiert [Hitze-Schock kompetente $RbCl_2$ Zellen, hergestellt und verwendet nach Sambrook *et al.* (1989)]. Die Präparation von rekombinanter DNA aus transformierten Bakterien (XL1blue) erfolgte mit QuiaquickII (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

2.3.3 Isolation von cDNA- und genomischen DNA-Klonen aus Phagenbanken

Um die vollständige Sequenz eines Gens zu erhalten, für das bruchstückhafte Sequenzinformationen existierten, wurden Phagenbanken gesichtet. Eine cDNA-Bank des Organismus *Odontella sinensis*, die von Prof. Dr. P. Kroth (Kroth, 1995) erstellt wurde, war bereits vorhanden. Eine genomische DNA-Bank der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* wurde von Prof. Dr. A. Grossman [Carnegie Insitution, Stanford USA (Bhaya und Grossman, 1991)] zur Verfügung gestellt.

2.3.3.1 Titer-Bestimmung der DNA-Banken und Vorbereitung zur Sichtung

Bakterien (Stamm LE392) wurden in LB-Medium mit 0,2 % (w/v) Maltose und 10 mM $MgSO_4$ bei 37°C bis zu einer OD_{600} von 0,5 – 0,8 kultiviert. Die Bakterien wurden sedimentiert und in 10 mM $MgSO_4$ resuspendiert, so dass die Suspension eine Dichte von 1 OD_{600} besaß. Die Lagerung erfolgte für maximal 14 Tage bei 4°C.

Zur Titerbestimmung wurden serielle Verdünnungsreihen der Phagenbanken (1:10 bis $1:10^{12}$) in SM-Puffer hergestellt. Jeweils 100 µl der Verdünnungen wurden mit 250 µl der phagenkompetenten Bakterien für 15 - 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze zu 4 ml temperierter (46°C) Top-Agarose gegeben und nach kurzem Mischen auf vorgewärmte (42°C) NZ-Platten (90mm) gegossen. Nach 6 h Inkubation bei 42°C wurden die vor dem Hintergrund des Bakterienrasens sichtbaren Lyse-Höfe (Plaques) ausgezählt. Daraus wurde der Titer an infektiösen Phagen (pfu, *engl.* plaque forming units) bestimmt.

Um in einem Arbeitsgang möglichst viele Phagen zu sichten, wurden in einem primären Screen Licefa-Platten mit den Abmessungen 20 x 40 cm (Licefa, Bad Salzufflen) verwendet. Die

Phagen entsprechend ca. 200.000 pfu wurden, wie oben beschrieben nach Inkubation mit 2,5 ml der kompetenten Bakterien in 40 ml Top-Agar auf der LB-Platte verteilt. Nachdem die Plaques eine Größe von ungefähr 1 mm erreicht hatten, wurden die Platten zur vollständigen Aushärtung des Top-Agar für mindestens 2 h bei 4°C gelagert.

Anschließend wurde eine Nitrozellulosemembran (0,2 µm Porengröße) auf den Agar gelegt und nach 5 Minuten zügig abgezogen. Die Membran wurde dann nacheinander jeweils für 5 Minuten mit der Phagen-Seite nach oben auf Whatman-Papier inkubiert, das mit 1. Denaturierungs-Lösung, 2. Neutralisierungs-Lösung und 3. 2 x SSC vollgesogen war. Die der Membran anhaftende denaturierte Phagen-DNA wurde durch UV-Quervernetzung kovalent gebunden.

Die Detektion von Phagen mit der gesuchten Sequenz erfolgte durch Southern-Hybridisierung (siehe 2.3.3.2). Die in dieser primären Suche identifizierten Plaques wurden ausgestochen und über Nacht in SM-Puffer inkubiert, um die Phagen aus der Gelmatrix herauszulösen. Da diese Phagen-Suspension noch mit Phagen verunreinigt war, die nicht die gesuchte Sequenz enthielten, wurde der gesamte Vorgang mit den isolierten Phagen wiederholt, wobei ca. 100 pfu/Platte untersucht wurden.

SM-Puffer:

50 mM	Tris/HCl, pH 7,5
100 mM	NaCl
10 mM	$MgSO_4$
0,1 %	Gelatine

NZ-Platten:

1 g/l	Casamino Acids	
5 g/l	NaCl	
10 g/l	NZ-Amine	
2 g/l	$MgSO_4$ x 7 H_2O	
15 g/l	Agar	pH 7,5

2 x SSC:

200 mM	NaH_2PO_4
3 M	NaCl
200 mM	NaOH
20 mM	EDTA

Denaturierungs-Lsg.:

500 mM	NaOH
1 M	NaCl

Neutralisierungs-Lsg.:

500 mM	Tris	
3 M	NaCl	pH 7,5

2.3.3.2 Southern-Hybridisierung

Die Herstellung der radioaktiv markierten Hybridisierungs-Sonde wurde mit dem Random-Priming-Kit der Firma Roche nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden 25 ng denaturierter DNA von einem bekannten Sequenz-Fragment des gesuchten Gens in einem 20 µl Ansatz mit 3 µl 0,5 µM dNTP-Gemisch, 2µl Hexanukleotid-Gemisch, 5 µl [α^{32}P]dATP (1000 µCi/ml) und 1 µl Klenow-Enzym bei 37°C inkubiert. Nach 30 Minuten wurde die Reaktion durch Zugabe von EDTA gestoppt und die Sonde durch eine Gelfiltration mit Sephadex G50 (in TAE-Puffer) von den nicht inkorporierten Nukleotiden getrennt. Die präparierte Sonde wurde unmittelbar vor der Verwendung für 10 Minuten bei 100°C denaturiert.

Vor der eigentlichen Hybridisierung wurde die Membran mit der Phagen-DNA für eine Stunde mit der Hybridisierungs-Lösung bei einer Temperatur von 57-65°C im Hybridisierungsofen (Fa. Appligen) unter Rotation vorinkubiert. Danach wurde die Lösung verworfen und die denaturierte Sonde in 20 ml temperierter Hybridisierungs-Lösung zugegeben. Die Hybridisierung fand über Nacht unter Rotation im Hybridisierungsofen bei der oben genannten Temperatur statt. Am nächsten Tag wurde die Membran zur Entfernung unspezifisch gebundener Sonde mehrmals mit Waschmedium unter den Bedingungen der Hybridisierung inkubiert. Die Detektion von hybridisierter Sonde erfolgte durch Autoradiographie über Nacht bei -20°C.

2.3.4 Gensequenzierung

Zur Kontrolle von DNA-Fragmenten und Klonierungspositionen wurden die DNA nach der Methode von Sanger und Coulson (1975) mit dem „T7-Sequenzing Kit“ der Firma Pharmacia sequenziert. Die Durchführung geschah nach Angaben des Herstellers, wobei die Markierung durch Einbau von radioaktivem [α^{32}P]dATP erfolgte. Die Terminationsfragmente wurden durch denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennt (siehe 2.2.2.3)

2.4 Physiologische Methoden

2.4.1 Präparation von stromalen Proteinen

Die Präparation von stromalem Protein erfolgte aus intakten Chloroplasten (2.4.1.1) durch osmotischen Schock. Hierfür wurden die intakten Chloroplasten bei 1.000 x g für 3 Minuten sedimentiert und das Sediment in 50 mM Bicine/KOH pH 8.0 zurückgelöst. Wenn $MgCl_2$ in den folgenden Analysen nicht störte, wurde es bis zu einer Konzentration von 2 mM zugesetzt, da dann die Thylakoide besser sedimentierten. In größeren präparativen Ansätzen (siehe 2.5.1.1) wurde die Ausbeute noch durch Scheren in einem Potter erhöht. Nach einer Inkubation von bis zu 15 Minuten auf Eis wurden die Membranen und Thylakoide bei 20.000 x g für 15 Minuten sedimentiert.

2.4.1.1 Präparation von intakten Chloroplasten aus Kieselalgen

Die Präparation von intakten Chloroplasten der Kieselalgen *Odontella sinensis* und *Coscinodiscus granii* erfolgte nach der Methode von Wittpoth (1996).

Die Kultur wurde zunächst über eine 50 µm Nylongaze filtriert und die Zellen in Isolationsmedium I aufgenommen. Der Aufschluss erfolgte in einer vorgekühlten Yeda-Presse bei 1,5 – 2,5 bar (je nach Größe der Zellen). Die aufgebrochenen Zellen wurden mehrmals mit einer Glaspipette durchmischt, um die Plastiden aus den Silikatschalen auszuspülen. Die Qualität des Aufschlusses wurde lichtmikroskopisch überprüft. Zur Entfernung der Kieselschalen wurde die Zellsuspension erneut über eine 20 µm Nylongaze filtriert.

Die Aufreinigung intakter Chloroplasten aus dem Zellhomogenat erfolgte durch eine modifizierte Methode nach Bartlett *et al.* (1982) durch einen linearen Percoll-Dichtegradienten oder nach Mills *et al.* (1980) mit Hilfe eines unterschichteten Percoll-Kissens. Die Gradienten-Lösungen waren an die Zusammensetzung und Osmolarität des Isolationsmediums I angepasst. Im Falle einer Präparation durch einen Gradienten wurde das Zellhomogenat einem linearen Percoll-Gradienten (40% - 80% Percoll) überschichtet und die Zellkompartimente durch eine Zentrifugation für 30 Minuten, 7.000 x g (4°C, SW45-Rotor), getrennt. Nach der Zentrifugation wurde die untere der zwei erkennbaren Plastidenbanden, die die intakten Chloroplasten enthielt, vorsichtig isoliert. Nach der Methode von Mills *et al.* (1980) wurde dem Zellhomogenat ein Kissen aus einer 40%igen Percoll-Lösung unterschichtet. Durch eine Zentrifugation für 2 Minuten bei 2.000 x g wurden die intakten Plastiden durch das Kissen hindurch pelletiert. Der Überstand enthielt nicht intakte Plastiden sowie andere Kompartimente und wurde verworfen.

Die durch eine der beiden Methoden präparierten Plastiden wurden in Isolationsmedium II resuspendiert, um das Percoll zu entfernen und nach einer weiteren Zentrifugation (1.500 x g, 90 Sek., 4°C) in einem geeigneten Volumen Isolationsmedium II resuspendiert. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Plastiden dunkel und auf Eis gelagert.

Isolationsmedium I:
626 mM Sorbit
6 mM EDTA
5 mM $MgCl_2$
10 mM KCl
1 mM $MnCl_2$
50 mM HEPES
1% BSA
mit KOH auf pH 8,0

Isolationsmedium II:
663 mM Sorbit
6 mM EDTA
5 mM $MgCl_2$
10 mM KCl
1 mM $MnCl_2$
50 mM HEPES
mit KOH auf pH 8,0

Gradientenmedium:
40% oder 80% PBF-Percoll
in IsolationsmediumII

PBF-Percoll:
3 % PEG 6000
1 % BSA
100 % Percoll

2.4.1.2 Präparation von intakten Chloroplasten aus Spinat

Die Isolation der Plastiden höherer Pflanzen basiert mit einigen Veränderungen auf der Methode von Heldt und Sauer (1971). Um eine Akkumulation von Stärke in den Plastiden zu vermeiden, die bei der Präparation zu Problemen führt, wurden die Spinatblätter zu Beginn der

Belichtungsphase (max. 2-3 h belichtet) geerntet. Die von der Mittelrippe befreiten Blätter wurden gewaschen und getrocknet. In einer Standardpräparation wurden bis zu 40 g Blätter in 200 bis 300 ml kaltem Isolationsmedium A in einem gekühlten „Waring-Blender“ in mehreren kurzen Intervallen (2-5 Sek.) homogenisiert. Dieser Ansatz wurde für die chromatographische Reinigung der PRK bis auf 2 kg Blattmaterial, homogenisiert in 2 l Isolationsmedium A, erweitert. Das Homogenat wurde zur Abtrennung von Zelltrümmern schnell über eine Lage Nylongaze und zwei Lagen Verbandmull filtriert. Die Plastiden wurden durch eine Zentrifugation (2.500 x g, 90 Sek., 4°C) sedimentiert und dann in Isolationsmedium B resuspendiert. Eine weitere Zentrifugation (1.000 x g, 60 Sek., 4°C) diente zur Entfernung von Mitochondrien. Aus dem Überstand wurden die Plastiden erneut sedimentiert (3.000 x g, 120 Sek., 4°C), dann in einem geeigneten Volumen Isolationsmedium B resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung dunkel auf Eis gelagert. Für einige Untersuchungen (Thermolysin-Behandlung, siehe 2.4.3) wurden die Plastiden analog zur Präparation der Plastiden von Diatomeen (siehe 2.4.1.1) durch ein 40%iges Percoll-Kissen gereinigt.

Isolationsmedium A:

360 mM	Sorbit
15 mM	MES
5 mM	$MgCl_2$
10 mM	NaCl
pH 6,5	

Isolationsmedium B:

360 mM	Sorbit
50 mM	HEPES
1 mM	$MgCl_2$
1 mM	$MnCl_2$
2 mM	EDTA
10 mM	NaCl
0,8 mM	KH_2PO_4
pH 7,6	

2.4.1.3 Chlorophyll-Bestimmung

Zur Bestimmung des Chlorophyll-Gehalts einer Plastiden-Präparation wurde ein Aliquot in 90%igem Aceton suspendiert. Nach einer Inkubation von 2-5 Minuten wurden Membranen und durch Säure präzipitiertes Protein durch eine Zentrifugation (5 Min., 13.000 x g) abgetrennt. Die Bestimmung der Absorption erfolgte im Spektralphotometer (LKB-UltraspecPlus, Pharmacia, Upsala, Schweden). Die Berechnung der Chlorophyll-Konzentration erfolgte für die Plastiden von Diatomeen nach der von Jeffrey und Humphrey (1975) beschriebenen Formel:

$$x\ \mu g\ \text{Diatom-Chl.} = (11{,}47\ E_{664} - 0{,}4\ E_{630}) + (24{,}36\ E_{630} - 3{,}73\ E_{664})$$

Die Berechnung für Spinat erfolgte nach der Formel:

$$x\ \mu g\ \text{Spinat-Chl.} = 20{,}2\ E_{645} + 8{,}02\ E_{630}$$

2.4.2 Untersuchung der Qualität isolierter Chloroplasten

Die Bestimmung der Intaktheit einer Plastiden-Präparation erfolgte quantitativ nach der Methode von Heber und Santarius (1970) und qualitativ über die CO_2-Fixierung.

Die quantitative Intaktheitsbestimmung (in %) erfolgte über den Vergleich der Sauerstoff-freisetzung unbehandelter und durch osmotischen Schock lysierter Plastiden in Gegenwart des artifiziellen, nicht membranpermeablen Elektronenakzeptors Ferricyanid ($K_4[Fe(CN)_6]$). Die von der Zugänglichkeit des Elektronenakzeptors abhängige photosynthetische O_2-Freisetzung wurde in einer Sauerstoffelektrode des Clark-Typs (Fa. Hansatech) durchgeführt. Das Reaktionsmedium entsprach dem Isolationsmedium I (siehe 2.4.1.1), versetzt mit 2 mM Ferricyanid, 2 mM Ammoniumchlorid sowie 1000 U/ml Katalase und 100 U/ml Superoxid-Dismutase (SOD). Für die Messung der lysierten Plastiden wurden diese zunächst in 500 µl dest. H_2O für 5 Minuten inkubiert und dann durch Zugabe einer 2fach konzentrierten Lösung auf die oben angegebenen Konzentrationen eingestellt. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 16°C und einer Photonenflussdichte von 600 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} durchgeführt.

Die qualitative, substratabhängige O_2-Freisetzung wurde ebenfalls in einer Clark-Elektrode bestimmt. Intakte Plastiden, entsprechend 50 µg Chl./ml, wurden in Isolationsmedium I (siehe 2.4.1.1) mit 1000 U/ml Katalase und 100 U/ml SOD inkubiert. Als Substrat diente 5 mM $NaHCO_3$. Nach Stabilisierung der Grundrate im Dunkeln wurde die Rate der CO_2-Fixierung im Licht über die O_2-Freisetzung bestimmt. Die Temperatur- und Belichtungsbedingungen entsprachen den oben beschriebenen.

2.4.3 Thermolysin-Behandlung intakter Plastiden

Die Präparation intakter Plastiden gewährleistet die mechanische und physiologische Integrität des Kompartiments. Sie kann jedoch nicht vollständig eine Kontamination mit Proteinen anderer Kompartimente, die die Plastide umgeben oder eng mit ihnen assoziiert sind, verhindern. Thermolysin ist eine Protease, die keine oder nur eine geringe Permeabilität über Membranen besitzt. Sie ist eine potente Protease, kann jedoch auch über Entzug des Co-Faktors Ca^{2+} oder den spezifischen Inhibitor Phosphoramidon inhibiert werden (Cline *et al.*, 1984). Diese Protease wurde für die proteolytische Degradation extraplastidärer Proteine eingesetzt, um die Kontamination mit cytoplasmatischen Isoformen einiger untersuchter plastidärer Enzyme zu überprüfen.

Aus den Zellhomogenaten, die in den ersten Schritten der Präparation von Diatomeen- oder Spinat-Plastiden erhalten wurden, konnten die Plastiden durch eine Zentrifugation (90 Sek., 3.000 x g, 4°C) abgetrennt werden. Die Plastiden wurden dann im gleichen Medium zurückgelöst, welches zum Aufbruch verwendet wurde, dabei waren diese Medien in der Weise angepasst, dass sowohl BSA als auch EDTA oder andere Protease-Inhibitoren fehlten. Die ungereinigten Plastiden-Suspensionen wurden durch Zugabe von $CaCl_2$ auf eine Konzentration von 2 mM eingestellt. Eine frisch präparierte Suspension von Thermolysin wurde bis zu einer Endkonzentration von 0,2 mg/ml zugegeben und mit den Plastiden für bis zu 45 Minuten auf Eis inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurde die Protease durch die Zugabe von 3 mM EGTA und 6 mM EDTA inhibiert.

Die weitere Präparation von intakten Chloroplasten erfolgte, wie für die Plastiden der Diatomeen (2.4.1.1) und Spinat (2.4.1.2) beschrieben, über ein Percoll-Kissen, wobei in allen Lösungen zusätzlich 2,5 mM EGTA vorhanden war.

2.5 Proteinchemische Methoden

2.5.1 Expression und chromatographische Reinigung von Proteinen

Die PRK von Spinat wurde aus Spinatblättern über die Präparation von intakten Plastiden und über chromatographische Reinigung aus der stromalen Fraktion gewonnen. Die Thioredoxine wurde nach heterologer Expression in *E. coli* über konservative chromatographische Methoden gereinigt. Die PRK von *O. sinensis* wurde im bakteriellen System als Fusionsprotein mit einer Intein-CBD (Chitin-Binde-Domäne) hergestellt und über diese aufgereinigt.

Alle präparativen Schritte wurden bei 4°C durchgeführt. Chromatographische Reinigungsschritte wurden mit einem FPLC-System der Fa. Pharmacia (Upsala, Schweden) durchgeführt. Verwendete Chromatographiematerialen sind unter 2.1.8 spezifiziert. Alle Lösungen wurden vor der Verwendung in der Chromatographie zur Entfernung von Schwebstoffen über eine 0,2 µm Membran filtriert und entgast. Die Bestimmung der Konduktivität von Lösungen erfolgte mit einem Leitfähigkeitsmessgerät (LF90, WTW, Weilheim). Die während der Präparation anfallenden Fraktionen wurden bezüglich ihrer Proteinzusammensetzung durch SDS-PAGE (2.2.2.4) und bezüglich der Enzymaktivität des zu reinigenden Enzyms durch die unter 2.5.4 beschriebenen gekoppelten Enzymtests untersucht. Standardmethoden wie Proteinfällung folgten den beschriebenen Verfahren (Cooper, 1980).

2.5.1.1 Phosphoribulokinase aus Spinat

Chloroplasten wurden aus bis zu 2 kg Blattmaterial wie unter 2.4.1.2 beschrieben, präpariert. Auf eine Reinigung von intakten Chloroplasten wurde verzichtet. Das Sediment der ungereinigten Plastiden wurde in 300-400 ml Schock-Puffer resuspendiert und im Potter homogenisiert. Danach wurde das Homogenat unter Rühren für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Zellsuspension wurde zur Entfernung der Membranen für 20 Minuten bei 12.000 x g (JA20 Rotor) zentrifugiert. Das zweite Sediment (35%-65% $(NH_4)_2SO_4$) einer fraktionierten Ammoniumsulfat-Fällung wurde in BED-Puffer homogenisiert und die Leitfähigkeit durch Verdünnung auf die von BED50-Puffer eingestellt (ca. 5 mS/cm).

Die Reinigungsschritte Ionenaustausch- und Affinitätschromatographie folgten mit einigen Modifikationen der Präparation von Brandes *et al.* (1996a).

Ionenaustauschchromatographie (IEC), Toyopearl SuperQ-650m

Das Proteinhomogenat wurde über eine 0,2 µm Membran filtriert und mit einer Flussrate von 0,5 ml/Min. auf eine 45 ml IEC-Säule (SuperQ-650m, Toyopearl, 2,2 x 12 cm) aufgetragen. Die Säule wurde mit BED50-Puffer bei einer Flussrate von 2 ml/Min. gewaschen. Nachdem alle nicht gebundenen Komponenten von der Säule gewaschen waren, wurden die Proteine durch einen 500 ml Salzgradienten (50 bis 500 mM NaCl ansonsten wie BED-Puffer; Flussrate 2 ml/Min.) von der Säule eluiert. Die Fraktionen, in denen PRK-Aktivität nachgewiesen werden konnte, wurden vereinigt und mit Ammoniumsulfat präzipitiert (65% $(NH_4)_2SO_4$; Zentrifugation 30 Min., 15.000 x g, JA20). Das Sediment dieser Zentrifugation wurde in wenig BED150-Puffer rückgelöst, erneut zentrifugiert (15 Min., 12.000 x g, JA20) und der Überstand über eine 0,2 µm Membran filtriert.

Größenausschlusschromatographie, BioGel A5m

Die Proteinlösung wurde auf eine 300 ml BioGel A5m (2,8 x 50 cm) Säule aufgetragen und bei einer Flussrate von 0,8 ml/Min. mit BED150-Puffer eluiert. Fraktionen, die PRK-Aktivität zeigten, wurden vereinigt und durch Ammoniumsulfat-Fällung konzentriert (s.o.). Das Sediment wurde in BED-Puffer rückgelöst. Die konzentrierte Proteinlösung wurde über Nacht in Dialyserahmen (Mw-„cutoff“ 10 kDa, siehe 2.1.9) gegen insgesamt 4 l BED-Puffer dialysiert.

Affinitätschromatographie, Reactive Red Cl-6b

Die dialysierte Proteinlösung wurde durch Zugabe von festem Bicine auf einen pH-Wert von 6,5 eingestellt und dann mit einer Flussrate von 0,4 ml/Min. auf eine 9 ml (1,1 x 10 cm) „Reactive Red“-Affinitätschromatograhie-Säule aufgetragen, die mit 10 mM Bicine pH 6,5 equilibriert war. Die Säule wurde erst mit 150 ml RedA-Puffer und dann mit 150 ml RedB-Puffer gewaschen. Dann konnte die PRK mit Elutionspuffer in einem scharfen „Peak“ von der

Säule eluiert werden. Die Fraktionen mit PRK-Aktivität wurden vereinigt und durch Ultrafiltration in einer 10 ml Aminco-Zelle mit einer YM30-Membran (max. 4,5 bar N_2-Druck) konzentriert. Die konzentrierte PRK-Probe wurde über Nacht in Dialyserahmen (siehe 2.1.9) gegen insgesamt 4 l Lagerpuffer (50 mM Bicin/KOH, pH 8.0, 1 mM EDTA, 10 mM DTT und 20 % (v/v) Glycerol) dialysiert. Danach wurde die Präparation bei –80°C gelagert.

Schock-Puffer:

50 mM	Bicine/KOH, pH 8,0
2,5 mM	EDTA
1 mM	PMSF
5 mM	DTT
5 mM	MgCl2
10 mM	NaCl

BED*x*-Puffer:

50 mM	Bicine/KOH, pH 8,0
1 mM	EDTA
10 mM	DTT

x = NaCl in mM

RedA-Puffer:

50 mM	Bicine/KOH, pH 6,5
10 mM	DTT

RedB-Puffer:

10 mM	Na-Phosphat, pH 6,8
10 mM	DTT

Elutions-Puffer:

10 mM	Na-Phosphat, pH 7,2
10 mM	DTT
5 mM	ATP

2.5.1.2 Phosphoribulokinase von *O. sinensis* heterolog exprimiert in *E. coli*

Die Expression der reifen PRK, als eine Fusion mit einem C-terminalen Intein-CBD Proteinaddukt, erfolgte vom Plasmid pTYmatPRK im *E. coli*-Stamm Bl21 (DE3) in LB-Medium mit L-Arabinose (0,2% w/v) und Glycerol (10% v/v). Die Kultur (800 ml Medium im 2 l Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen) wurde mit 1/1000 Volumen einer Vorkultur (üN-Kultur, 37°C) angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bis zu einer OD_{600} von 0,7 bei 30 °C auf einem Rundschüttler (200 upm). Kurz vor Erreichen dieser Zelldichte wurde begonnen, die Kultur auf 16°C herunter zu kühlen. Die Expression wurde dann durch die Zugabe von IPTG induziert (Endkonzentration 0,7 mM). Die Kultur wurde für weitere 16 h bei 16°C unter Schütteln inkubiert, bevor die Zellen durch Zentrifugation (10 Min., 10.000 upm, 4°C, JA10 Rotor) geerntet wurden. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

Zellaufschluss

Die Zellen (bis zu 60 g) wurden in FP-Puffer (150 ml pro 100 g Zellen) resuspendiert und mit dem Potter homogenisiert. Unmittelbar vor dem Aufschluss wurde DNase zugegeben (20 µg/ml EK). Der Aufschluss erfolgte in einer French-Press Zelle (Aminco) bei einem konstantem Druck von 1.200 psi. Aus dem Bakterien-Homogenat wurden zunächst die Zelltrümmer abgetrennt (15 Min., 6.000 x g, 4°C). Der Überstand wurde zur Entfernung von unlöslichen Bestandteilen und Einschlusskörperchen erneut zentrifugiert (30 Min., 12.000 x g, 4°C).

Affininitätschromatographie, Chitin-Agarose

Der Proteinrohextrakt wurde mit einer Stammlösung auf eine Konzentration von 0,1 % (v/v) Triton X100 eingestellt. Das nicht ionische Detergenz minimiert zusätzlich zu der hohen Salzkonzentration von 1 M NaCl unspezifische Wechselwirkungen mit der Säulen-Matrix. Der Proteinrohextrakt wurde über eine 0,2 µm Membran filtriert und dann mit einer Flussrate von 0,4 ml/Min. auf eine 20 ml Chitin-Agarose-Säule (2,2 x 5 cm) geladen. Durch Western-Blot und Immunodetektion wurde nachgewiesen, dass unter diesen Bedingungen kein PRK-Fusionsprotein durch die Säule hindurchläuft. Die Chromatographie-Säule wurde mit insgesamt 300 ml WHST-Puffer gewaschen (Flussrate 1 ml/Min.) und danach mit 60 ml WNS-Puffer auf die Elutionsbedingungen equilibriert. Der Protein-„Splicing"-Mechanismus wurde dann durch die Einstellung der Säule auf 50 mM DTT induziert. Dafür wurde in einem möglichst kurzen Zeitraum (nicht länger als 30 Min.) die Säule mit 60 ml WNSD-Puffer beladen (Flussrate 2 ml/Min.). Danach wurde die Pumpe gestoppt, die Säule verschlossen und für 16 bis 20 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach diesem Zeitraum wurde das Protein mit WNS-Puffer von der Säule eluiert, wobei die PRK in einem scharfen „Peak" ohne die Proteinfusion von der Säule eluierte. Die so präparierte PRK besaß nach Abschätzung durch silbergefärbte SDS-PAGE eine Reinheit von mehr als 95%.

Ionenaustauschchromatographie (IEC), RESOURCE Q

Eine weitere Aufreinigung, die zur Entfernung der primären Kontamination von 75 kDa führte, erfolgte durch Ionenaustauschchromatographie (IEC). Die vereinigten Fraktionen der Affinitätschromatographie wurden nach Überprüfung der Ionenstärke (s.o.) auf eine 2 ml RESOURCE Q Chromatographie-Säule geladen (Flussrate 0,3 ml/Min.), die mit BTPE50 equilibriert war. Nachdem ungebundene Komponenten von der Säule gewaschen waren, wurde gebundenes Protein mit einem 60 ml linearen Salzgradienten (50 – 1000 mM NaCl) von der Säule eluiert (Flussrate 0,5 ml/Min.). Die Fraktionen wurden auf Grund ihrer Enzymaktivität und der Proteinzusammensetzung vereinigt und durch Ultrafiltration in einer 10 ml Aminco-Zelle mit einer YM30-Membran (max. 4,5 bar N_2-Druck) konzentriert. Die konzentrierte Proteinlösung wurde in Dialyserahmen (siehe 2.1.9) gegen insgesamt 4 l Lagerpuffer (50 mM Bicin/KOH, pH 8.0, 1 mM EDTA und 20 % (v/v) Glycerol) dialysiert und danach bei – 80°C gelagert.

FP-Puffer:
20 mM HEPES/KOH, pH 7,85
1 M NaCl
1 mM EDTA
6 mM $MgCl_2$
1 mM PMSF

WHST-Puffer:
Wie FP-Puffer aber ohne $MgCl_2$ und PMSF

WNS-Puffer:
20 mM HEPES/KOH, pH 7,5
50 mM NaCl
1 mM EDTA

WNSD-Puffer:
Wie WNS mit 50 mM DTT

BTPE50:
20 mM BisTris Propan, pH 7,5
1 mM EDTA
50 mM NaCl

2.5.1.3 Thioredoxin-Isoformen m und f von Spinat heterolog exprimiert in *E. coli*

Die reifen Formen der beiden Thioredoxin-Isoformen m und f von Spinat wurden von den Plasmiden pTrxm bzw. pTrxf exprimiert, die von Toru Hisabori zur Verfügung gestellt wurden [siehe 2.1.4 (Stumpp *et al.*, 1999)]. Die Konstruktion der maturen Enzyme erfolgte nach den Sequenzinformationen von Kamo *et al.* (1989) und Wedel *et al.* (1992).

Expression

Die Expression erfolgte im *E. coli*-Stamm Bl21 (DE3) in LB-Medium. Die Kultur (800 ml im 2 l Erlenmeyerkolben mit 3 Schikanen) wurde mit 1/1000 Volumen einer Vorkultur (üN-Kultur, 37°C) angeimpft. Die Kultivierung erfolgte bis zu einer OD_{600} von 0,7 bei 37 °C auf einem Rundschüttler (200 upm). Die Induktion der Synthese von rekombinantem Protein erfolgte durch die Zugabe von IPTG auf eine Endkonzentration von 1 mM. Die Kultur wurde für weitere 90 Minuten bei 37°C unter Schütteln inkubiert bevor die Zellen durch Zentrifugation (10 Min., 10.000 upm, JA10-Rotor, 4°C) geerntet wurden. Die Zellen wurden bis zur weiteren Verwendung bei –80°C gelagert.

Zellaufschluss

Die gefrorenen Zellen wurden in kaltem TEP-Puffer resuspendiert (2,5 ml/g Zellen) und durch Pottern homogenisiert. Zusätzlich zur osmotischen Lyse wurden die Zellen mit Ultraschall behandelt, was auch zur Fragmentierung der hochmolekularen DNA führte. Es wurden Volumina von 4-5 ml in konischen Falcon-Röhrchen über eine Micro-Tip Spitze (Branson Sonifier Cell Disrupter B15) in 4 Intervallen von jeweils 15 Sekunden beschallt (Stufe 5, Puls 50%). Die entstehende Wärme wurde durch ein Eis/Salz-Wasserbad abgeleitet. Zelltrümmer wurden durch eine Zentrifugation (10 Min., 6.000 x g, 4°C, JA20-Rotor) abgetrennt und der Überstand zur Entfernung von unlöslichen Bestandteilen sowie Einschlusskörperchen erneut zentrifugiert. (30 Min., 12.000 x g, 4°C, JA20-Rotor).

Hydrophobe-Interaktions-Chromatographie (HIC), Butyl-650m

Der Proteinrohextrakt wurde mit fein gemörsertem $(NH_4)_2SO_4$ auf eine Konzentration von 1 M eingestellt. Bei dieser Konzentration präzipitierbares Protein wurde in einer Zentrifugation abgetrennt (15 Min., 12.000 x g, 4°C, JA20 Rotor) und der Überstand über eine 0,2 µm Membran filtriert. Die Proteinlösung wurde mit einer Flussrate von 0,5 ml/Min. auf eine 60 ml HIC-Säule geladen (Butyl-650m, Toyopearl, 2,2 x 15 cm), die dann mit insgesamt 120 ml TEA1-Puffer gewaschen wurde (Flussrate 2 ml/Min.). Nachdem alles ungebundene Protein von der Säule gewaschen war, wurde gebundenes Protein durch einen inversen Ammoniumsulfat-Gradienten von der Säule eluiert (500 ml, 1 M nach 0 M $(NH_4)_2SO_4$, Flussrate 2 ml/Min.). Die Isoform m eluierte unter diesen Bedingungen in einem scharfen „Peak“ bei ca. 750 mM $(NH_4)_2SO_4$, wohingegen die Isoform f eine breitere Verteilung zeigte, die bei ca. 900 mM begann. Fraktionen, die den Großteil des Protein enthielten, wurden vereinigt und durch Ultrafiltration in einer 10 ml Aminco-Zelle mit einer YC05-Membran (max. 4 bar N_2-Druck) konzentriert.

Größenausschlusschromatographie, Superose 75

Die konzentrierten Fraktionen der HIC (1,5 –2 ml) wurden mit einer Flussrate von 0,75 ml/Min. auf eine 165 ml große Superose75-Säule (1,8 x 65 cm) geladen, die mit TEN150 equilibriert war. Das Protein wurde unter den gleichen Bedingungen durch die Säule transportiert, wobei fast alle Kontaminationen im Ausschlussvolumen der Säule eluierten und nur die Thioredoxine signifikant retendiert wurden. Die vereinigten Fraktionen wurden durch Ultrafiltration (Amico-Zelle, YC05-Membran) konzentriert, zur Entfernung von Salz mehrfach mit TEGN20 verdünnt und schließlich auf 2 ml konzentriert (1,5 mg Protein/ml). Die gereinigten rekombinanten Trx-Isoformen m und f waren apparent rein (SDS-PAGE, Silberfärbung) und wurden bei –80°C gelagert.

TEP-Puffer:		**TEA1-Puffer:**		**TEN150-Puffer:**	
20 mM	Tris/HCl, pH 8,0	20 mM	Tris/HCl, pH 8,0	20 mM	Tris/HCl, pH 8,0
2,5 mM	EDTA	1 mM	EDTA	1 mM	EDTA
1 mM	PMSF	1 M	$(NH_4)_2SO_4$	150 mM	NaCl

2.5.2 Trennung und Molekulargewichtsbestimmung von Proteinen durch Größenausschlusschromatographie

Die Untersuchung auf die Existenz regulatorischer Proteinkomplexe von Calvin-Zyklus-Enzymen erfolgte durch Größenausschlusschromatographie in Zusammenarbeit mit PD Dr. N. Wedel im Institut für Pflanzenphysiologie der Universität Osnabrück. Wenn eine geeignete Methode für die Präparation von intakten Plastiden existierte (*O. sinensis* und *C. granii*), wurden diese präpariert (siehe 2.4.1.1) und dann die stromalen Extrakte chromatographiert. War dies nicht der Fall wurden Zellrohextrakte verwendet (*P. tricornutum*, *H. carterae*, *P. purpureum*). Zellrohextrakte wurden, nachdem die Zellen durch Filtration oder Zentrifugation aus dem Kulturmedium geerntet wurden, durch Aufbruch in einer French-Press (Aminco) präpariert. Die in BEP-Puffer gewaschenen Zellen wurden mit einer Dichte von 1 g/ml Puffer bei 1.200 psi aufgebrochen. Dieser Rohextrakt wurde von Zelltrümmern befreit (10 Min., 10.000 x g, 4°C, JA20-Rotor) und die Membranen durch eine kurze Ultrazentrifugation (15 Min., 80.000 x g, 4°C, Ti70.1-Rotor) abgetrennt. Da die Konzentration der Proteine meist zu gering für eine Gelfiltration war, wurden die geklärten Rohextrakte durch Ultrafiltration in einer Aminco Zelle mit einer YM30-Membran (max. 4,5 bar N_2-Druck) konzentriert. In Rohextrakten wurden die Proteinkomplexe während des Transports durch Zugabe von 140 µM NAD^+ stabilisiert (Wedel *et al.*, 1997). Intakte Plastiden wurden auf Eis in völliger Dunkelheit transportiert und unmittelbar vor der Chromatographie durch osmotischen Schock und pottern lysiert. Nach Abtrennung der Membranen (15 Min., 12.000 x g, 4°C) wurde der stromale Extrakt auf die Säule geladen. Die Auftrennung erfolgte auf einer Superdex S300HR Gelfiltrations-Säule (400 ml, 2,6 x 65 cm) bei einer Flussrate 1 ml/Min., die zuvor durch die Chromatographie von einem Proteingemisch bekannter Molekulargewichte (Apoferritin, 443 kDa; Alkohol-Dehydrogenase, 150 kDa; Carbonic-Anhydrase, 29 kDa; Cytochrom c 12,4 kDa) kalibriert wurde. Der Chromatographiepuffer BEN150 enthielt 150 mM NaCl, um Protein/Matrix-Wechselwirkungen zu verhindern. Zuvor war gezeigt worden, dass diese Salzkonzentration keinen Einfluss auf die Protein/Protein-Wechselwirkungen der regulatorischen Proteinkomplexe hat. Es wurden 1 ml Fraktionen des Eluats gesammelt und die Präsenz der Proteine durch enzymatische Analyse (siehe 2.5.4) sowie durch "Western-Blot" und spezifischer immunologischer Detektion (siehe 2.2.3.2) nachgewiesen.

BEP-Puffer:

10 mM	Bicine/KOH, pH 7,8
2 mM	EDTA
1 mM	PMSF

BEN150-Puffer:

10 mM	Bicine/KOH, pH 7,8
1 mM	EDTA
150 mM	NaCl

2.5.3 Deglykosylierung von stromalen Proteinen

Intakte Plastiden wurden sedimentiert und durch Resuspendierung in Deglykosilierungs-Puffer lysiert (15 Min. auf Eis). Für die Deglykosylierung mit PNGase F wurde der vom Hersteller (Sigma, St. Louis USA) mitgelieferte Denaturierungs-Puffer verwendet. Wenn mit N-GlykosidaseA deglykosyliert werden sollte, wurde DEGI-Puffer verwendet. Die Membranen wurden abgetrennt (15 Min., 20.000 x g, RT, MicrofugeR) und der stromale Extrakt für 5 Minuten bei 95°C thermisch denaturiert.

Die Deglykosylierung durch N-GlykosidaseA wurde ohne weitere Prozessierung durch die Zugabe des Enzyms (20 U/ml) gestartet und die Reaktion bei 37°C durchgeführt.

Für die Deglykosylierung mit PNGase F wurde der stromale Extrakt mit NP40 versetzt und danach durch Zugabe von Reaktionspuffer auf die Inkubationsbedingungen eingestellt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von PNGase F (30 U/ml) gestartet und bei 37°C inkubiert.

DEGI-Puffer:

10 mM	NaAcetat, pH 5,1
500 mM	NaSCN
100 mM	2-Mercaptoethanol
1 mM	PMSF
5 mM	EDTA

2.5.4 Bestimmung der enzymatischen Aktivität

Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte photometrisch durch die unten angegebenen gekoppelten Testsysteme, die die katalytische Aktivität des zu testenden Enzyms mit der Umsetzung von $NAD(P)^+$/NAD(P)H koppeln. Dehydrogenasen wurden direkt gemessen. Die Substrate Ribulose-5-phosphat (Ru5P) und 1,3-Bisphosphoglycerat (1,3-BPG) wurden durch enzymatische Reaktion unmittelbar vor dem Start der Reaktion in der Messküvette gebildet (3 – 5 Min. vor Test). Für die K_m-Bestimmung wurde gereinigtes Ru5P als Substrat eingesetzt. Die Kalibrierung aller Substrate erfolgte über geeignete direkte spektralphotometrische Methoden oder in Kombination mit enzymatischen Methoden.

PRK-Test:

Puffer-Bedingungen:	**Gekoppeltes Testsystem:** Nach Racker, 1957
50 mM Bicine/KOH pH 7,95	4 U/ml L-Lactat-Dehydrogenase, LDH
40 mM KCl	3 U/ml Pyruvatkinase, PK
10 mM $MgCl_2$	2 mM Phosphoenolpyruvat, PEP
	0,2 mM NADH
	1 mM ATP [1]
	1 mM D-Ribulose-5-Phosphat [1]
	oder: 2 U/ml D-Phosphoribose-Isomerase, PRI
	1 mM D-Ribose-5-Phosphat
	[1] Standardtest, Substrat-Konzentrationen teils variiert

FbPase-Test:

Puffer-Bedingungen:	**Gekoppeltes Testsystem:** Nach Faske *et al.*, 1995
50 mM Bicine/KOH pH 7,95	3 U/ml Glucose-6-Phosphat-Isomerase, GPI
20 mM KCl	2 U/ml Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase, G6PDH
10 mM $MgCl_2$	0,2 mM NAD^+
x mM EGTA[1]	2 mM Fructose-1,6-bisphosphat, FbP
[1] Bei Voraktivierung mit Ca^{2+}/FbP, wurde dem Reaktionspuffer EGTA im 2fachen Überschuß zur Ca^{2+}-Konzentration zugesetzt.	

SbPase-Test:

Puffer-Bedingungen:	**Gekoppeltes Testsystem:** Nach Woodrow, 1982
100 mM Bicine/KOH pH 7,95	2 U/ml Phosphofructokinase, PFK
20 mM KCl	4 U/ml L-Lactat-Dehydrogenase, LDH
10 mM $MgCl_2$	3 U/ml Pyruvatkinase, PK
	2 mM Phosphoenolpyruvat, PEP
	0,2 mM NADH
	0,5 mM ATP
	0,2 mM Sedoheptulose-1,7-bisphosphat

GAPDH-Test:

Puffer-Bedingungen:	**Gekoppeltes Testsystem:** Nach Cerff, 1978
100 mM Tris/HCl pH 7,95	2 U/ml 3-Phosphoglyceratkinase, PGK
1 mM EDTA	5 mM 3-Phosphoglycerat, 3-PGA
8 mM $MgSO_4$	0,35 mM NADPH
	2 mM ATP

3 Ergebnisse

3.1 Überprüfung der Präparation von intakten Chloroplasten aus Diatomeen

Die Calvin-Zyklus-Enzyme Phosphoribulokinase (PRK), Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), Fruktose-1,6-bisphosphatase (FbPase) und Sedoheptulose-1,7-bis-phosphatase (SbPase) können in höheren Pflanzen durch Oxidation/Reduktion von Cysteinen/ Disulfiden reguliert werden (Ziegler und Ziegler, 1965; Buchanan *et al.*, 1971; Wolosiuk und Buchanan, 1978; Nishizawa und Buchanan, 1981; Jacquot *et al.*, 1995). Da entsprechende Untersuchungen über den Calvin-Zyklus der Diatomeen nicht vorliegen, soll im Rahmen der praktischen Arbeiten die Regulation dieser Enzyme untersucht werden.

Für die ersten Untersuchungen wurden ungereinigte Enzyme der stromalen Fraktion von isolierten Plastiden der marinen Diatomeen *Odontella sinensis* und *Coscinodiscus granii* eingesetzt. Durch die Verwendung isolierter Plastiden sollte eine Kontamination mit cytoplasmatischen Isoenzymen vermieden werden. Die Präparation intakter Chloroplasten erfolgte nach der von Wittpoth *et al.* (1998) beschriebenen Methode. Dabei wurde regelmäßig überprüft, ob die so präparierten Chloroplasten intakt waren. Ein aussagefähiges Kriterium für die physiologische Integrität der Chloroplasten ist ihre Fähigkeit zur CO_2-Fixierung. Nur Plastiden mit intakten Envelopmembranen können mit CO_2 als Substrat Photosynthese betreiben; der Ablauf der CO_2-Fixierung wird dabei durch die O_2-Freisetzung gemessen.

Die Abbildung 3-1 zeigt den typischen Verlauf der CO_2-abhängigen O_2-Entwicklung einer Plastiden-Präparation, bestimmt in einer Clark-Sauerstoffelektrode. Der Verlauf der O_2-Entwicklung ist charakteristisch für intakte Chloroplasten, und die Rate entspricht den bereits

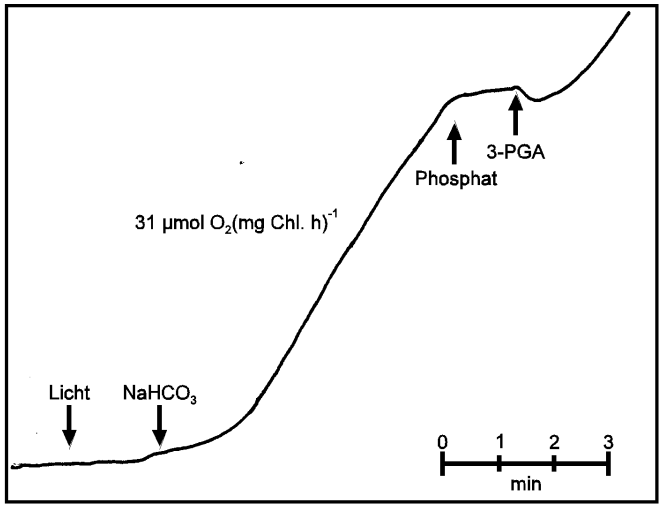


Abb. 3-1: Photosynthetische Sauerstoff-produktion von intakten Plastiden der Diatomee *C. granii*.
Plastiden (entsprechend 50 µg Chl.) wurden in einem Volumen von 1 ml Iso-Medium I in einer Clark-Elektrode bei 16°C mit einer Photonen-flussdichte von 600 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} belichtet. Die Zeitpunkte der Zugabe von Substraten sind durch Pfeile gezeigt, die Konzentrationen waren für $NaHCO_3$ und Phosphat jeweils 5 mM und für 3PGA 7 mM. Weiterhin enthielt das Inkubationsmedium Katalase und Superoxid-Dismutase zum Schutz vor reaktiven Sauerstoff-Formen und vor Wasserstoffperoxid, welches in ungewöhnlich hohen Konzentrationen in Diatomeen-Plastiden entsteht (Wittpoth *et al.*, 1998 und 1996).

früher für Plastiden der Kieselalgen beschriebenen Werten (Wittpoth *et al.*, 1998). Die Inhibierung der Photosynthese durch Phosphat sowie die Wiederherstellung derselben durch 3PGA resultiert wahrscheinlich aus der Funktion des Phosphat/Triosephosphat-Translokators (TPT), einem integralen Protein der Chloroplastenmembran, welches die beiden Substrate in striktem Antiport über die Membran transportiert (Flügge und Heldt, 1991). Ein extraplastidärer Überschuss von Phosphat führt zu einem Export der Intermediate des Calvin-Zyklus, wogegen die Zugabe von 3PGA diesen Effekt wieder ausgleicht.

Die Präsenz der TPT-Aktivität lässt vermuten, dass die Präparation auch die Integrität der Membranen gewährleistet. Frühere Untersuchungen solcher Präparationen zeigten jedoch in elektronenmikroskopischen Aufnahmen, dass zumindest die beiden äußeren der vier Membranen der Diatomeen-Plastiden beschädigt oder nicht vorhanden waren (Wittpoth *et al.*, 1998). Die äußerste Membran der Plastiden ist an ihrer cytoplasmatischen Seite mit Ribosomen besetzt, weswegen sie auch als Chloroplasten Endoplasmatisches Reticulum (CER) bezeichnet wird. Die Abbildung 3-2 zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von intakten Chloroplasten aus *O. sinensis*, die zuvor mit dem Fluoreszenzfarbstoff 3,3`-Dihexyl-Oxocarbocyanin-Iodid ($DiOC_6$) behandelt wurden. Dieser hydrophobe Farbstoff ist membranpermeabel, wodurch er sich auch *in vivo* anwenden lässt und akkumuliert vor allem in ER- und Mitochondrien-Membranen. Innerhalb der Membran fluoresziert er grünlich (λ_E 500 nm). Das CER lässt sich ebenso wie ER-Membranen durch diesen Farbstoff markieren. Neben der Fluoreszenz des Farbstoffs wurde parallel die rote Autofluoreszenz des Chlorophylls für die Lokalisation der Plastiden verwendet.

Die meisten Chloroplasten zeigen keine grüne Fluoreszenz. Nur ein geringer Bruchteil der Plastiden (geschätzt auf 1 ‰) ließ sich durch $DiOC_6$ markieren. Die Aufnahmen D - F (jeweils Ausschnittvergrößerungen von A - C) zeigen eine markierte Plastide. Das Überlagerungsbild (F) der Fluoreszenzen lässt erkennen, dass zwei Plastiden innerhalb einer zusammenhängenden CER-Membran eingeschlossen sind. Dies kann sowohl das Ergebnis der Präparation sein, indem die Plastiden durch ein zusammenhängendes CER-System zueinander gelangen, oder aber das Resultat einer Plastidenteilung, die bei den Heterokontophyten innerhalb der sie umgebenden Membranen abläuft (Magnussen und Gibbs, 1980; Hashimoto, 1997). Diese weiteren Daten zeigen, dass trotz der apparenten Intaktheit der Chloroplasten die angewendete Methode nicht die Integrität aller 4 Membranen gewährleisten kann. Damit erlaubt diese Präparation die Charakterisierung plastidärer Enzyme; eine Untersuchung von Enzymen die möglicherweise im periplastidären Raum lokalisiert sind, ist jedoch wahrscheinlich nicht möglich.

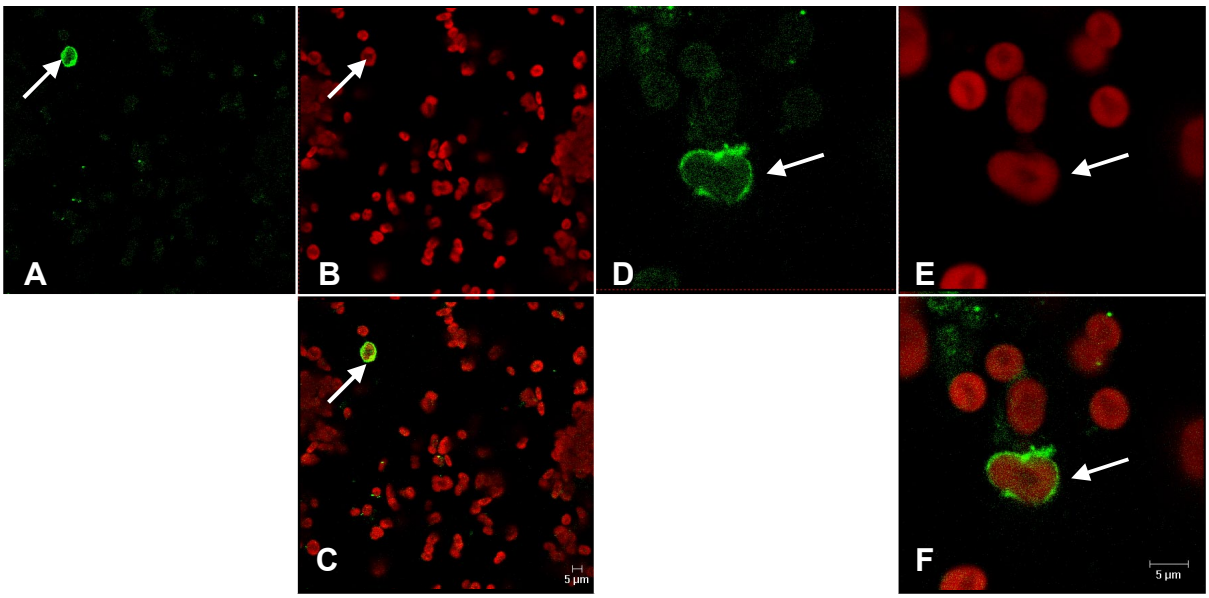


Abb. 3-2: Fluoreszenzmikroskopische Lokalisation von ER-/CER-Membranen in einer Plastiden-Präparation der Kieselalge *Odontella sinensis* durch Markierung mit $DiOC_6$.
Eine verdünnte Plastiden-Suspension wurde für 10 Minuten mit $DiOC_6$ inkubiert und dann die Fluoreszenz im konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop beobachtet. Gezeigt ist die rote Autofluoreszenz des Chlorophylls (B und E), die grüne Fluoreszenz des in die Membran inkorporierten Farbstoffs $DiOC_6$ (A und D) und eine Überlagerung beider Signale (C und F). Durch $DiOC_6$ markierte Plastiden sind mit einem Pfeil markiert. A-C Übersichtsaufnahme, D-F Ausschnittvergrößerung einer markierten Plastide. Unten rechts (C, F) ist jeweils ein Größenstandard, entsprechend 5 µm, gezeigt.

3.2 Regulation der Phosphoribulokinase (PRK)

3.2.1 Einfluss von Reduktions- und Oxidationsmitteln auf die enzymatische Aktivität der PRK

Die Untersuchung der PRK-Aktivität ergab bereits im unbehandelten stromalen Extrakt der Diatomeen eine hohe Enzymaktivität (siehe Abb. 3-3 A). Die Behandlung mit DTTred (50 mM) führte zu keiner weiteren Erhöhung dieser Aktivität. Gleiche Ergebnisse wurden in stromalen Extrakten von Zellen bestimmt, die zuvor für 10 Stunden vorverdunkelt und auch im Dunkeln präpariert wurden. Obwohl die Aktivität im Vergleich zu den Präparationen von belichteten Zellen um einen Faktor von ca. 2,4 erniedrigt war, ergab auch hier die Behandlung mit DTTred keine signifikante Erhöhung der Enzymaktivität. Dies steht im Kontrast zu den Untersuchungen der PRK in Spinat-Plastiden, deren Regulation über die Thiol-Modulation bereits früher gezeigt wurde (Wolosiuk und Buchanan, 1978; Omnaas *et al.*, 1985; Porter *et al.*, 1988; Porter und Hartman, 1988 und 1990). Dort führte die Reduktion der stromalen Proteine durch DTT zu einem starken Anstieg der PRK-Aktivität um einen Faktor von ca. 6,5 gegenüber dem unbehandelten Extrakt (Abb. 3-3 A).

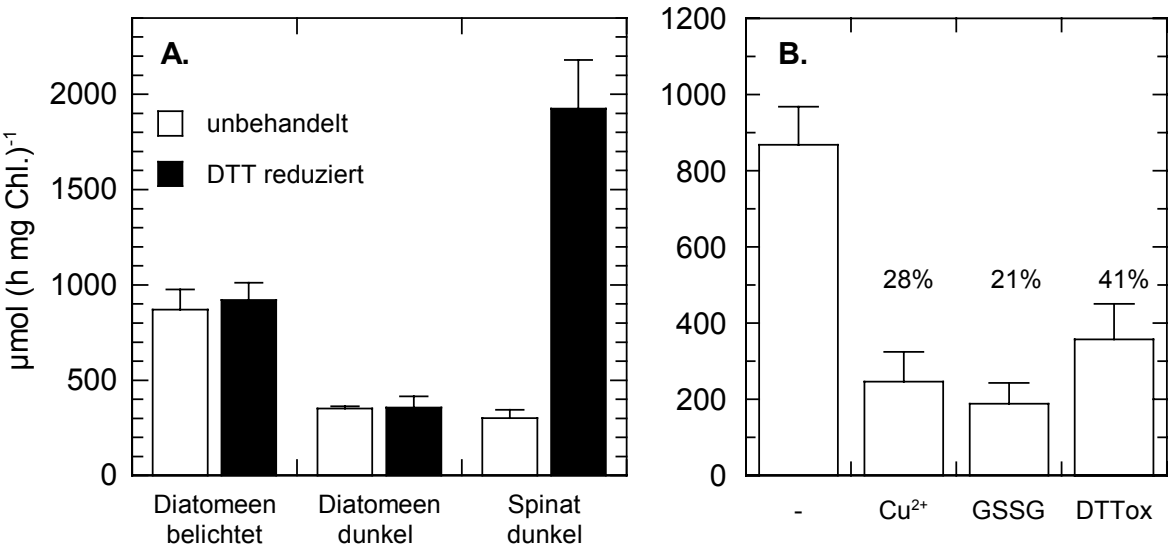


Abb. 3-3: Effekte von reduzierenden und oxidierenden Reagenzien auf die Aktivität der PRK in stromalen Extrakten von Diatomeen.

Die stromale Fraktion intakter Plastiden (siehe 2.4.1.1 für Diatomeen und 2.4.1.2 für Spinat), entsprechend einer Chlorophyll-Konzentration von 150 - 250 µg/ml, wurden für 10 Minuten bei RT mit den angegeben Reagenzien inkubiert. Die Aktivität der PRK wurde darauf folgend im gekoppelten Test-System nach Racker (2.5.4) bestimmt. Angegeben ist der Mittelwert aus mindestens 3 Messungen mit Standardabweichung von (A) 3 unabhängigen Plastidenpräparationen für die Diatomeen und einer Präparation für Spinat bzw. (B) einer Präparation von Diatomeen. **A.** Endkonzentration: DTTred 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM. **B.** Endkonzentration: $CuCl_2$ 5 mM, GSSG 125 mM und DTTox 125 mM. Die Restaktivität in % der Kontrolle ist für die oxidierten Ansätze über den entsprechenden Balken angegeben.

Das Fehlen einer Aktivierung durch Reduktion legt die Folgerung nahe, dass die PRK der Diatomeen sowohl in belichteten als auch in dunkel gehaltenen Zellen vollständig reduziert vorliegt oder aber, dass die Reduktion bzw. Oxidation des Enzyms unter diesen Bedingungen keinen Effekt auf die Katalyse hat. Die Inkubation der stromalen Fraktion von belichteten Diatomeen-Zellen mit oxidierenden Substanzen wie $CuCl_2$ und den Thiol-Oxidanzien GSSG und DTTox zeigte jedoch eine Erniedrigung der PRK-Aktivität (siehe Abb. 3-3 B). Nach 15 Minuten konnte in Ansätzen mit $CuCl_2$ (EK 5 mM) nur noch eine Aktivität von 28% der Kontrollreaktion bestimmt werden. Die Behandlung mit jeweils 125 mM GSSG oder DTTox resultierte in einer Restaktivität von 21% bzw. 41%. Die Unterschiede der oxidativen Inaktivierung durch die beiden Thiol-Verbindungen entsprechen den stärker reduzierenden Eigenschaften von DTT gegenüber GSSG, wie sich aus den Reduktionspotentialen ersehen lässt [DTT = -327 mV und GSSG = -250 mV (Lees und Whitesides, 1993; Lundström und Holmgren, 1993)].

Die Thiol-Modulation des Fd/Trx-Systems resultiert in den Plastiden höherer Pflanzen aus der reversiblen Reduktion/Oxidation regulatorischer Cysteine der Zielenzyme. Dem entsprechend ist die Reversibilität der oxidativen Inaktivierung ein guter Hinweis für eine Regulation über den Redox-Status des Enzyms. Die Oxidation durch die oben verwendeten Substanzen führt jedoch zur Bildung eines Gleichgewichtes zwischen oxidierter und reduzierter Form des

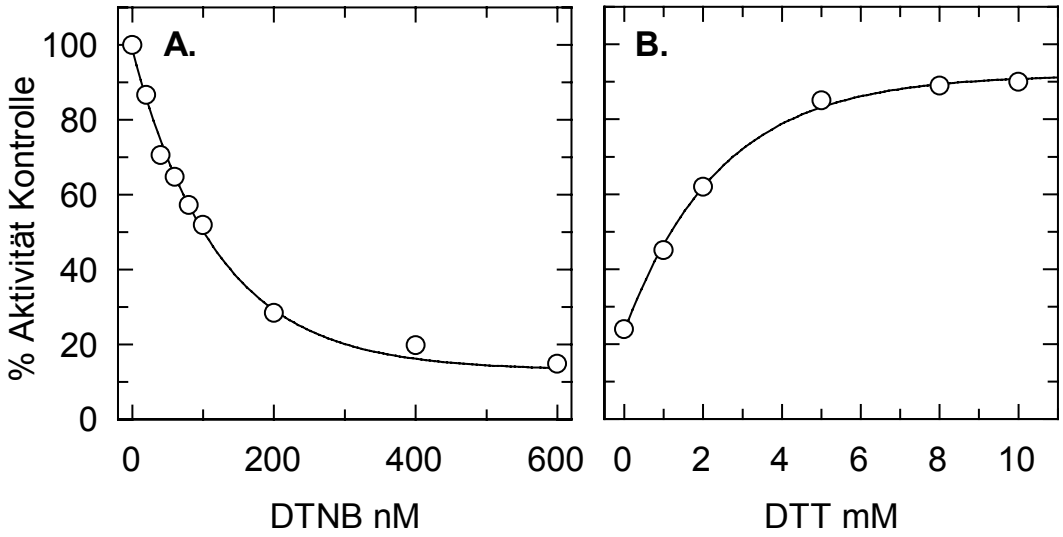


Abb. 3-4: Oxidative Inaktivierung der PRK mit DTNB und darauf folgende reduktive Reaktivierung mit DTTred im stromalen Extrakt von *Coscinodiscus granii*.
A. Die stromale Fraktion intakter Plastiden wurde mit steigenden Konzentrationen einer kalibrierten DTNB-Stammlösung für 10 Minuten auf Eis inkubiert, danach wurde die PRK-Aktivität bestimmt. Dargestellt ist der prozentuale Anteil der spezifischen Aktivität bezogen auf die Kontrollmessungen. **B.** Ein wie unter A mit 300 nM DTNB oxidierter Ansatz wurde mit steigenden Konzentrationen DTTred für 10 Minuten bei RT inkubiert, dann wurde die spezifische Enzymaktivität der PRK bestimmt. Individuelle Messungen mit den angegebenen DTT-Konzentration sind als % spezifischer Aktivität der Kontrolle dargestellt.

Oxidationsmittels und einem damit verbundenen Redox-Potential. Dieses Potential kann sowohl sehr reduzierend als auch oxidierend sein, je nach dem Verhältnis von oxidierter zu reduzierter Form, und würde mit einer weiteren reduktiven Reaktivierung interferieren. Dithionitrobenzoesäure (Ellmanns Reagenz, DTNB) ist eine weitere Cystein-oxidierende Disulfid-Verbindung. DTNB oxidiert räumlich benachbarte Cysteine zu einem Disulfid, wobei zwei Moleküle TNB^{2-} freigesetzt werden. Die Rückreaktion ist unter den angewendeten Bedingungen eine Reaktion dritter Ordnung und findet fast nicht statt (Riddles *et al.*, 1979). Damit führt diese Oxidation nicht zur Bildung eines Redox-Potentials und hat daher, wenn kein Überschuss an DTNB zugegeben wird, keinen Einfluss auf eine anschließende Reduktion.

Wie Abbildung 3-4 zeigt, wird die PRK aus *C. granii* durch DTNB inaktiviert. Man erkennt eine Abnahme der Aktivität mit der DTNB-Konzentration als Folge des steigenden Anteils oxidierter Enzyme. Bei 600 nM DTNB wurde eine maximale Inhibierung auf 15% der Enzymaktivität erreicht. Eine vollständige Inaktivierung war auch durch höhere Konzentrationen DTNB (1 mM) nicht möglich. Anhand der erhaltenen Titrationskurve wurde davon ausgegangen, dass nach einer Oxidation mit 300 nM kein Überschuss DTNB im Ansatz verbleibt. Die Behandlung mit 300 nM DTNB resultierte in einer Restaktivität von 24% der Kontrolle (Abb. 3-4 B). Die Reduktion durch DTTred konnte die Aktivität der PRK wiederherstellen, wobei eine Sättigung bereits ab 8 mM DTT erreicht wurde (Abb. 3-4 B). Die reduktive Aktivierung oxidierter PRK konnte dabei 90% der Aktivität des unbehandelten, voll aktivierten Enzyms

wiederherstellen. Die Zugabe verschiedener Konzentrationen von Trx-f zeigte dabei jedoch keinen Effekt auf die Aktivierung (Daten nicht gezeigt).

3.2.2 Veränderungen der PRK-Menge über die Belichtungsphase

Die bisherigen Daten konnten zeigen, dass die Aktivität der PRK von Diatomeen potentiell über reversible Oxidation/Reduktion regulierbar ist. Die Unterschiede der spezifischen Aktivitäten zwischen belichteten und verdunkelt gehaltenen Zellen konnten mit den durchgeführten Analysen jedoch nicht auf einen veränderten Redox-Zustand der PRK zurückgeführt werden, weshalb eine Regulation durch Thiol-Modulation unter physiologischen Bedingungen nicht anzunehmen ist. Um zu testen, ob die im Vergleich zu belichteten Zellen um den Faktor 2,5 erniedrigte Aktivität im Dunkeln auf Unterschiede in der Expression der PRK beruht, wurden semiquantitative Bestimmungen der PRK-Menge im Gesamtextrakt der Diatomee *C. granii* vorgenommen.

Aus einer Kultur unter Standardbedingungen (siehe 2.1.2) wurden Proben am Ende der Verdunklungsphase und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Beginn der Belichtungsphase entnommen. Es wurden gleiche Mengen (bezogen auf Chlorophyll) daraus präparierter Gesamtextrakte durch Western-Blot und Immunodetektion auf die Konzentration der PRK untersucht. Die Abbildung 3-5 zeigt die Signale für die PRK (A) eines repräsentativen Western-Blots und die davon ermittelten relativen Intensitäten der Signale (B) als Maß für die Konzentration der PRK. Wie aus den Signalen und der Quantifizierung zu ersehen ist, ist die Menge PRK im Dunkeln erniedrigt und zeigt einen schnellen Anstieg innerhalb der ersten 30 Minuten. Die maximale Menge wird nach ein bis zwei Stunden erreicht. Aus den Intensitäten der Signale lässt sich eine Zunahme der PRK-Menge um einen Faktor von ca. 3 ermitteln. Dieser Wert könnte die um den Faktor 2,5 erniedrigte Enzymaktivität im Dunkeln erklären. Weitere Hinweise für eine Kontrolle der Expression wurden durch Analysen der Transkriptmenge des PRK-Gens erhalten (Daten nicht gezeigt). Da diese Ergebnisse nur bedingt reproduzierbar waren, konnten die Unterschiede der PRK-Menge nicht eindeutig auf transkriptionelle Regulation zurückgeführt werden. Die gezeigten Daten können auch nicht klären, ob es sich um einen direkten Effekt von Licht handelt oder ob ein lichtabhängiger Rhythmus Einfluss auf die Expression nimmt, da die Untersuchungen des Protein-Gehalts an einer kontinuierlichen Kultur, die sich im normalen Licht/Dunkel-Rhythmus befand, vorgenommen wurden.

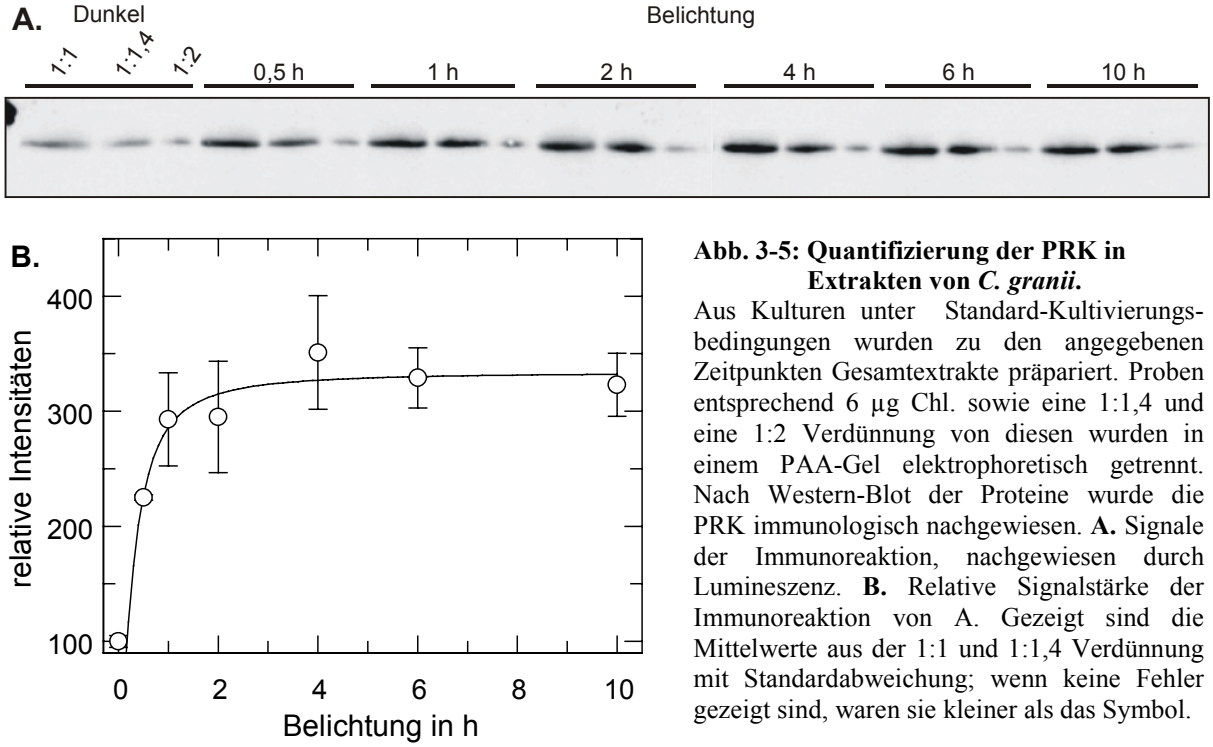


Abb. 3-5: Quantifizierung der PRK in Extrakten von *C. granii*.
Aus Kulturen unter Standard-Kultivierungsbedingungen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Gesamtextrakte präpariert. Proben entsprechend 6 µg Chl. sowie eine 1:1,4 und eine 1:2 Verdünnung von diesen wurden in einem PAA-Gel elektrophoretisch getrennt. Nach Western-Blot der Proteine wurde die PRK immunologisch nachgewiesen. **A.** Signale der Immunoreaktion, nachgewiesen durch Lumineszenz. **B.** Relative Signalstärke der Immunoreaktion von A. Gezeigt sind die Mittelwerte aus der 1:1 und 1:1,4 Verdünnung mit Standardabweichung; wenn keine Fehler gezeigt sind, waren sie kleiner als das Symbol.

3.2.3 Die Sequenz der PRK von *Odontella sinensis*

Die cDNA-Sequenz der PRK von *O. sinensis* ist bekannt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde auch die genomische Sequenz ermittelt. Das Gen für die PRK besitzt keine Introns und kodiert für ein Protein von insgesamt 396 Aminosäuren. Die ersten 42 Aminosäuren bilden die zweigeteilte Kieselalgen-Präsequenz, die den Import in die komplexen Plastiden der Diatomeen vermittelt und die während dieses Vorgangs prozessiert wird (Markus Lang, 2000). Die abgeleitete Aminosäure-Sequenz des reifen plastidären Proteins (354 AS) besitzt eine große Ähnlichkeit zu den Sequenzen anderer eukaryotischer PRK´s (60-80%).

Die Phosphoribulokinasen aller bekannten eukaryotischen Organismen besitzen 4 Cysteine in ihrer Primärsequenz. Die N-terminalen Cysteine (C16 und C55, Numerierung nach der Spinat-Sequenz) liegen beide im Bereich des katalytischen Zentrums. Da keine Daten für die dreidimensionale Struktur eukaryotischer PRK´s vorhanden sind, lässt sich die Position der beiden C-terminalen Cysteine (C244 und C250) im Bezug zum katalytischen Zentrum nicht genau bestimmen. Ein Sequenzvergleich verschiedener eukaryotischer PRK´s und der PRK von *Rhodobacter sphaeroides*, für die eine 3D-Kristallstruktur bekannt ist, ist im Anhang (Abb. A3-A) dargestellt. Die bakteriellen Phosphoribulokinasen weisen nur eine Sequenz-Ähnlichkeit von weniger als 20% zu den eukaryotischen Enzymen auf. Trotzdem erlaubt ein Vergleich unter Berücksichtigung konservierter Aminosäuren eine Positionierung der Sekundärstruktur-Elemente im Bezug zu den eukaryotischen Proteinen.

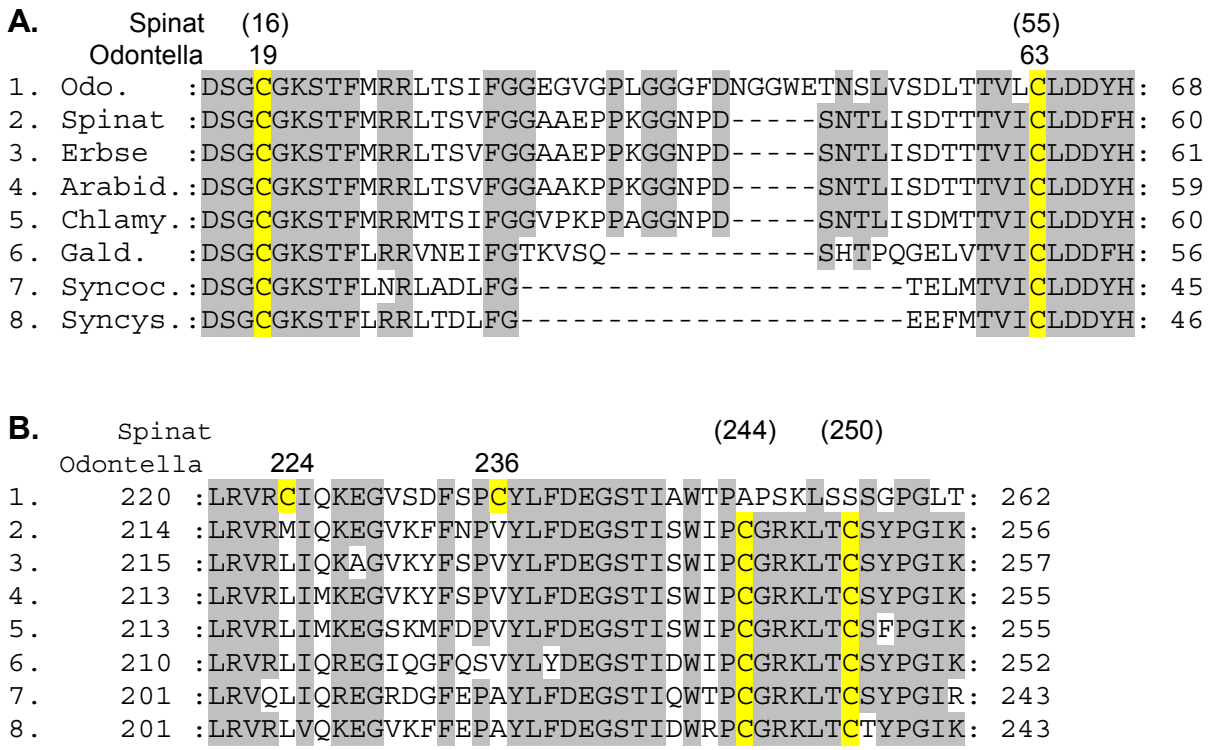


Abb. 3-6: Vergleich der Aminosäure-Sequenzen der PRK´s verschiedener Organismen im Bereich der vier Cysteine.

Konservierte Aminosäuren sind grau unterlegt. Die Cysteine sind gelb unterlegt und ihre Positionen innerhalb der *O. sinensis* bzw. *S. oleracea* (in Klammern) Sequenz sind angegeben. Start und Ende der Teilbereiche sind flankierend für jede Sequenz angegeben. 1: *Odontella sinensis* (Y08610); 2: *Spinacia oleracea* (X07654); 3: *Pisum sativum* (Y11248); 4: *Arabidopsis thaliana* (X58149); 5: *Chlamydomonas reinhardtii* (M36123); 6: *Galdieria sulphuraria* (persönliche Mitteilung R. Krauß, Pflanzenphysiologie Osnabrück); 7: *Synechococcus* PCC7942 (AB035257); 8: *Synechocystis* PCC6803 (M77134) .

Für höhere Pflanzen wurde in verschiedenen Untersuchungen gezeigt, dass die Cysteine 16 und 55 (Spinat-Numerierung) an der Regulation beteiligt sind. Den Cysteinen 244 und 250 konnte hingegen keine Bedeutung für die Regulation zugewiesen werden (Omnaas *et al.*, 1985; Porter *et al.*, 1988; Porter und Hartman, 1990; Milanez *et al.*, 1991; Brandes *et al.*, 1996). Die Abbildung 3-6 zeigt den Sequenzvergleich von eukaryotischen PRK´s in den Teilbereichen, in denen sich die beiden Cystein-Paare befinden. Die Sequenzen höherer Pflanzen, der Grün-, Rot- und Kieselalgen, sowie der cyanobakteriellen PRK´s, die miteinander verglichen wurden, weisen eine Sequenzidentität von mindestens 60% auf. Größere Unterschiede finden sich nur im Bereich der beiden N-terminalen, regulatorischen Cysteine (siehe 3-6 A). Dort finden sich in den Sequenzen der Cyanobakterien und Rotalgen größere Deletionen von 22 bzw. 12 Aminosäuren im Vergleich zu den höheren Pflanzen. Die Sequenz der Kieselalge *O. sinensis* weist in diesem Bereich eine Insertion von 5 Aminosäuren auf. Im Gegensatz zu allen anderen Sequenzen ergibt sich aus dem Sequenzvergleich auch eine andere Position der beiden C-terminalen Cysteine von *O. sinensis* (siehe 3-6 B). Diese sind 10 Aminosäuren näher zum N-Terminus und haben einen anderen Abstand zueinander (11 AS bei *O. sinensis* gegenüber 5 AS bei allen anderen).

3.3 Untersuchungen an gereinigter PRK

3.3.1 Reinigung der PRK von *O. sinensis* nach Expression in *Escherichia coli*

Die bisherigen Untersuchungen wurden mit stromalem Extrakt durchgeführt. Um genauere Untersuchungen anhand des gereinigten PRK-Enzyms durchzuführen, war es notwendig, größere Mengen zur Verfügung zu haben. Die Präparation aus Kieselalgen-Plastiden schied aufgrund der niedrigen Ausbeuten und der aufwendigen Kultivierung der Kieselalgen aus. Daher wurde das cDNA-Fragment genutzt, um das Diatomeen-Enzym in *E. coli* zu exprimieren. Für die Herstellung eines Expressionsklons wurde das gesamte Leseraster ohne die N-terminalen Signal- und Transit-Sequenzen verwendet. Die vermutliche Prozessierungsposition der stromalen Peptidase ($^{-3}$LNM / ALK^{+3}) wurde durch Vergleich mit anderen kernkodierten, plastidären Proteinen der Diatomeen und der Proteinsequenz der PRK von *Heterosigma carterae* (Hariharan *et al.*, 1998) ermittelt. Das an Position –1 gelegene Methionin wurde als Start-Methionin verwendet. Dieses Leseraster wurde so in den Expressions-Vektor pTYB1 eingebracht, dass der C-Terminus der PRK an die Vektor-kodierte Intein-Sequenz fusionierte, die wiederum in eine Chitinbindedomäne übergeht (siehe Abb. 3-7). Dieses Konstrukt, pTYmatPRK, erlaubt die Reinigung durch Affinitätschromatographie an Chitin-Agarose. Dabei wird das Protein durch den induzierbaren Protein-„Splicing"-Mechanismus des Intein-Fragments von der Säule eluiert, ohne dass zusätzliche Aminosäuren am präparierten Enzym verbleiben.

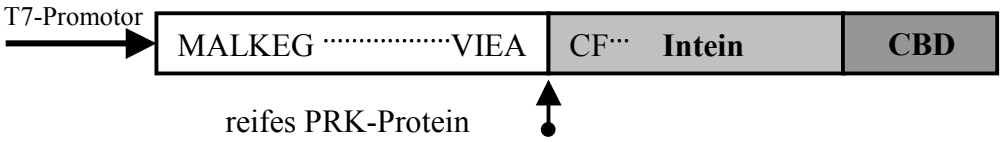


Abb. 3-7: Schematische Darstellung des PRK-IntCBD-Konstruktes für die Expression und Reinigung der PRK von *O. sinensis* in *E. coli*.
Der für das Fusionsprotein kodierende Bereich ist schematisch dargestellt. Die verschiedenen Bereiche sind durch Kästen dargestellt. Die Vektor-kodierten Bereiche der Intein-Sequenz und der Chitinbindedomäne (CBD) sind grau hinterlegt. Die ersten und letzten Aminosäure der PRK-Sequenz sind angegeben. Die Intein-Domäne ist für den Protein-„Splicing"-Mechanismus verantwortlich; sie ist ein Derivat der Intein-Sequenz des VMA1-Gens von *S. cerevisiae*. Das angegebene Cystein an Position 1 der Intein-Sequenz bildet durch einen Acyl-„Shift" einen Thioester zur letzten Aminosäure der PRK, der durch DTTred angegriffen und aufgelöst wird. Dadurch wird das reife PRK-Protein ohne weitere Aminosäuren freigesetzt. Die Prozessierungsstelle ist durch einen Pfeil markiert. Die Transkription erfolgt von einem T7-Promotor. Die Abbildung ist nicht maßstabsgetreu.

Die PRK ließ sich als Fusionsprotein (PRK-IntCBD) in löslicher Form in *E. coli* exprimieren (Abb. 3-8 A). Über den Zeitraum der Induktion akkumulierte das Fusionsprotein mit einer Größe von ca. 90 kDa. Von diesem konnte die rekombinante PRK nach Induktion des „Splicing"-Mechanismus freigesetzt werden. Da die Expression insgesamt gering war, wie bereits für die

Expression eukaryotischer PRK im bakteriellen System bekannt (Brandes *et al.*, 1996), wurde versucht, das Expressionssystem zu optimieren. Weder die Kompensation der ungünstigen „Kodon-Benutzung“ durch Transformation in den Stamm Bl21-CodonPlus noch die Kotransformation mit dem Plasmid pLysE konnten die Zellausbeute oder die Menge an akkumulierter PRK verbessern. Obwohl die Expression in Bl21-CodonPlus zu einer stark erhöhten Akkumulation des Fusionsproteins führte, lag die gesamte exprimierte PRK in Einschlusskörperchen vor (Daten nicht gezeigt). Eine Verbesserung des Wachstums wurde in Medien mit L-Arabinose (0,2% w/v) und Glycerol (10% v/v) erzielt, die den Umsatz von Ru5P bzw. ATP durch die PRK kompensieren (Milanez *et al.*, 1991). Eine weitere Verbesserung der Ausbeute wurde durch Expression bei 16°C über Nacht erreicht. Dies führte zu einer maximalen Ausbeute von ca. 0,1 mg Fusionsprotein pro Liter Kulturmedium.

Das so exprimierte Fusionsprotein wurde aus den Bakterienhomogenaten durch Affinitätschromatographie an Chitin-Agarose aufgereinigt. Nach DTT-induzierter Abspaltung der PRK vom am Säulenmaterial gebundenen Intein-CBD-Protein konnte das rekombinante Protein schon relativ sauber eluiert werden (Abb. 3-8 B, Spur 2 und 3). Die geringen erkennbaren Kontaminationen, hauptsächlich ein Protein von ca. 75 kDa, wurden in einer anschließenden Ionenaustauschchromatographie (IEC) mit ResourceQ entfernt (Abb. 3-8 B, Spur 1). Dabei eluierte jedoch eine Bande von ca. 90 kDa zusammen mit der PRK, die zuvor nicht sichtbar war. Diese Bande konnte ebenfalls nach Oxidation der PRK mit DTNB beobachtet werden und war

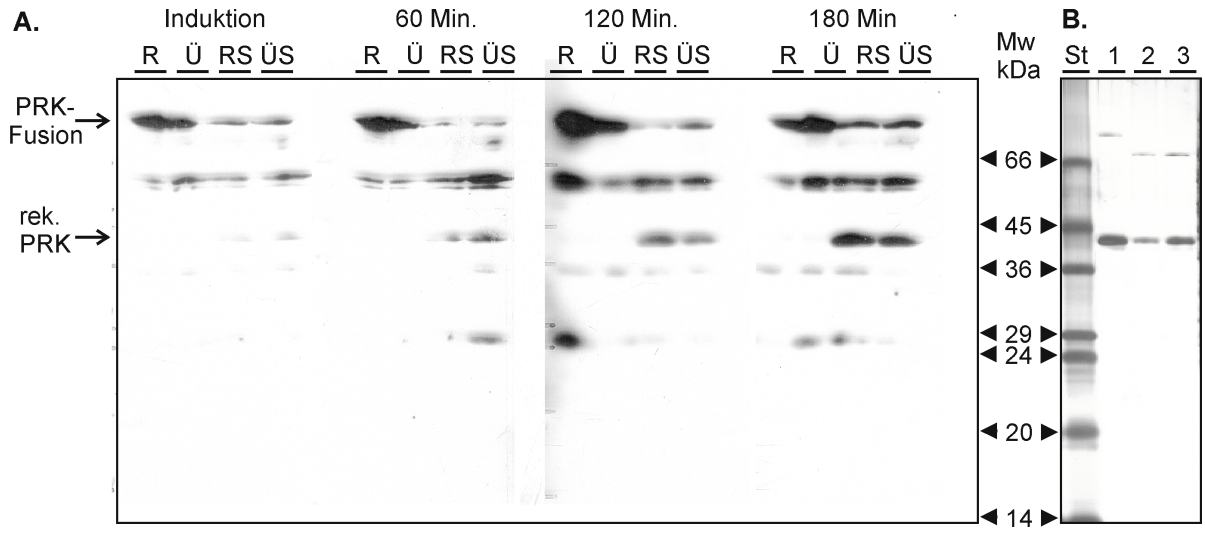


Abb. 3-8: Expression von rekombinanter PRK als Intein-Chitinbindedomäne-Fusionsprotein in *E. coli* und Aufreinigung über Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie (IEC).
A. Zunahme des Fusionsproteins über den Induktionszeitraum im Rohextrakt (R) und in der löslichen Fraktion (Ü) nach Detektion durch Western-Blot. Die Spuren RS und ÜS zeigen den Rohextrakt bzw. die lösliche Fraktion nach Entfernung der Fusion durch den DTT-induzierten „Splicing“-Mechanismus. **B.** Auftrennung der PRK-Präparation im PAA-Gel (Silberfärbung) nach Reinigung durch Affinitäts- und Ionenaustauschchromatographie (IEC). Spur 1, DTT-Eluat der Affinitätschromatographie nach weiterer Reinigung durch IEC mit ResourceQ; Spur 2 und 3, DTT-Eluat direkt nach der Affinitätschromatographie mit Chitin-Agarose (Spur St, Proteinstandard, Größen wie angegeben).

	O. sinensis	Spinat[1]	*H. carterae*[2]
V_{max} [U mg^{-1}] [a]	300 ± 14	300	218
K_m ATP [µM] [a]	84 ± 6,5	65	208
K_m Ru5P [µM] [b]	118 ± 13	66	226
Umsatzzahl s^{-1} (min^{-1})	25 (1500)		
pH-Optimum [pH]	7,95		

Tab. 3-1:
Katalytische Eigenschaften der in *E. coli* exprimierten und gereinigten PRK aus *O. sinensis*.
Angegeben sind die Mittelwerte mit Standardabweichung ([a] n =5, [b] n=3). Die Werte anderer Organismen [1]*Spinacia oleracea*, [2] *Heterosigma carterae* sind aus: [1]Gardemann *et al.*, 1983 und Geck und Hartmann, 2000; [2]Hariharan *et al.*, 1998.

nach vollständiger Reduktion mit anschließender Alkylierung der Cysteine durch Iodacetessigsäure nicht mehr sichtbar (siehe 3.3.4, Abb. 3-12). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass diese Bande das Ergebnis eines intermolekularen Disulfids der PRK ist. Damit ist die so präparierte PRK von *O. sinensis* apparent rein.

Die gereinigte PRK besitzt eine hohe spezifische Aktivität (siehe Tabelle 3-1), die mit der von rekombinanter Spinat-PRK vergleichbar ist (Geck und Hartmann, 2000). Eine Untersuchung der Enzym-Kinetik ergab eine einfache hyperbolische Abhängigkeit der Kinase-Aktivität von der Konzentration der Substrate. Die Bestimmung der Michaelis-Konstanten ergab K_m-Werte, die mit den Werten von PRK´s aus anderen Organismen vergleichbar sind. Bei der Bestimmung des K_m-Werts für Ru5P wurde für höhere Konzentrationen Produkt-Inhibierung beobachtet, entsprechend dem für die Spinat-PRK beschriebenen kompetitiven Effekt von Ru-1,5-bP (Gardemann *et al.*, 1983). Ein Überschuss von Mg^{2+} scheint keinen Einfluss auf die Aktivität der PRK aus *O. sinensis* zu haben, das Ion musste jedoch in ausreichenden Mengen zugegeben werden, um die Bildung des ATP:Mg^{2+} Komplexes sicherzustellen. Dies wurde in K_m-Wert Bestimmungen, in denen Mg^{2+} limitierend war und die Konzentration des ATP:Mg^{2+}-Komplexes aus der Komplexbildungskonstante (pK_d 4,32) bestimmt wurde, bestätigt (Daten nicht gezeigt). Auch wenn Mg^{2+} keinen Einfluss auf die Kinetik zeigte, so veränderte eine Erhöhung der Konzentration um 5 – 10 mM das pH-Optimum der PRK von *O. sinensis*. Das Optimum wurde breiter und für pH-Werte bis 9,5 konnte keine Verringerung der Aktivität beobachtet werden, wohingegen bei limitierenden Mg^{2+}-Konzentrationen bei diesem pH nur noch eine Aktivität von 20% beobachtet wurde (Daten nicht gezeigt).

3.3.2 Präparation und Reinigung der PRK aus Spinat

Für einige der folgenden Untersuchungen (siehe 3.3.4 und 3.4.1) der PRK von *O. sinensis* wurden die Versuchsbedingungen anhand der PRK von Spinat, für die diese Untersuchungen

bereits durchgeführt wurden, überprüft. Hierfür wurde die PRK von Spinat, ausgehend von intakten Plastiden, durch mehrere Chromatographieschritte gereinigt. Die Präparation (für Details siehe 2.5.1.1) erfolgte in den ersten Schritten durch fraktionierte Ammoniumsulfat-Fällung und Ionenaustauschchromatographie (IEC, SuperQ650m). Diese beiden Schritte führten bereits zu einer Aufreinigung um einen Faktor von 4 bezogen auf die spezifische Aktivität (siehe Tab. 3-2), wobei die Präparation jedoch noch stark mit Rubisco kontaminiert war (Abb. 3-9 Spur 1 und 2). Da Rubisco in der folgenden Affinitätschromatographie zu Problemen führt, wurde sie durch Größenausschlusschromatographie entfernt (Abb. 3-9 Spur 3). Im letzten Chromatographieschritt wurde die PRK selektiv durch „Reactive-Red"-Agarose, eine Affinitäts-Matrix für Nukleotid-bindende Enzyme, gebunden. Ein Enzym, das, obwohl sein katalytischer Mechanismus nicht die Bindung von ATP beinhaltet, ebenfalls an der Matrix gebunden wird, ist die Fruktosebisphosphat-Aldolase (FBA). Dieses Enzym kann durch einen speziellen Waschvorgang von der Säule eluiert und so von der PRK getrennt werden (Porter *et al.*, 1986). Trotz intensivem Waschen eluierte jedoch ein großer Teil der FBA (enzymatisch nachgewiesen) zusammen mit der PRK (Abb. 3-9 Spur 4). Da die FBA kein Redox-reguliertes Enzym ist und auch keinen Einfluss auf das PRK-Messsystem hat wurde die Präparation ohne weitere Aufreinigungsschritte für die weiteren Untersuchungen verwendet.

Die so präparierte PRK besitzt eine spezifische Aktivität von 175 µmol min^{-1} mg^{-1} Protein (siehe Tab. 3-2), entsprechend einer Reinheit von 65% (siehe Tab. 3-1 für die spezifische Aktivität einer reinen Präparation), wobei die FBA die einzige apparente Kontamination ist.

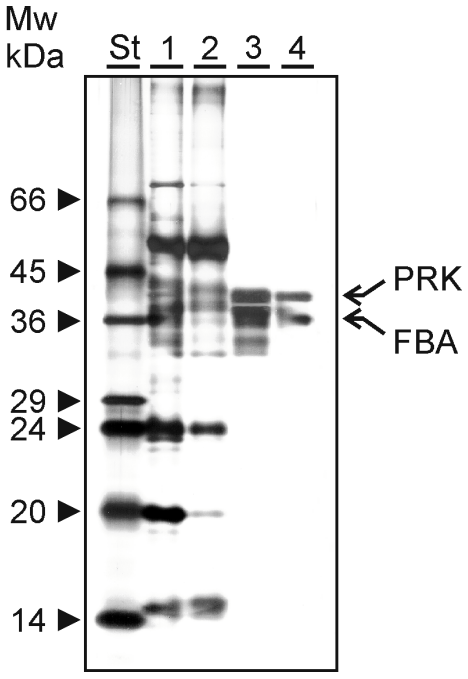


Abb. 3-9: Chromatographische Reinigung der PRK aus Spinat-Plastiden.
Auftrennung der Proteine zu verschiedenen Stadien der PRK-Präparation aus Spinat-Plastiden im PAA-Gel (Nachweis durch Silberfärbung). Spur 1, 35-65% Ammoniumsulfat-Fraktion der fraktionierten Fällung; Spur 2, vereinigte Fraktionen der IEC mit SuperQ650m; Spur 3, vereinigte Fraktionen der Gelfiltration mit Biogel A5m; Spur 4, vereinigte Fraktionen der Affinitätschromatographie mit „Reactive-Red"-Agarose. Spur St, Proteinstandard, Größen der Proteine in kDa wie angegeben. Die Position der PRK und FBA ist durch Pfeile markiert.

	Spez. Aktivität [U mg^{-1} Protein]	Aufreinigung [Faktor]	U Gesamt	Ausbeute [%]
Stromaler Rohextrakt Aus intakten Plastiden	6		1520	
Post Fällung 35-65% $(NH_4)_2SO_4$	16	2,8	990	65
Post IEC SuperQ650m	22	1,4	300	19
Post Gelchromatographie Biogel A5m	49	2,2	320	17
Post Affinitätschromatographie „Reactive-Red"-Agarose.	176	3,6	180	12

Tab. 3-2: Zusammenfassung der PRK-Reinigung aus Spinat-Plastiden.
Die Präparation erfolgte aus 1,5 kg Blatt-Material. Angegeben ist die spezifische Aktivität und der daraus berechnete Aufreinigungsfaktor. Die Ausbeute bezieht sich auf den stromalen Rohextrakt.

3.3.3 Hinweise für eine Glykosylierung der PRK von *O. sinensis in vivo*

Eine genauere Untersuchung der in *E. coli* exprimierten PRK von *O. sinensis* zeigte im Vergleich zum Protein aus stromalen Extrakten eine veränderte Mobilität in der SDS-PAGE. Wie die Abbildung 3-10 A belegt, unterscheidet sich die apparente Größe der rekombinanten PRK von *O. sinensis* um ca. 1,5 kDa von dem Protein der Zelle (Spur Os und rek). Da das angehängte Intein bei der Aufreinigung abgetrennt wird, wurde zunächst überprüft, ob sich die Unterschiede durch eine fehlerhafte Abspaltung des Inteins oder aber durch das Fehlen von eukaryotischen posttranslationalen Modifizierungen wie Glykosylierung oder Phosphorylierung in *E. coli* erklären lassen. Hierfür wurde das Expressions-Plasmid pTYmatPRK so verändert, dass in dem Konstrukt das native Stopp-Kodon (Ochre, UAA-Kodon) der PRK vorhanden war. Ein Vergleich der Größen von Proben mit und ohne Intein zeigten das gleiche Laufverhalten. Zudem sind beide Proteine kleiner als das Protein im stromalen Extrakt von *O. sinensis* (Abb. 3-10 B).

Eukaryotische Proteine können posttranslational modifiziert werden, wie zum Beispiel durch Phosphorylierung oder Anbindung von Zuckerkomplexen. Beide Modifikationen führen zu einer mehr oder minder großen Veränderung der apparenten Größe in der SDS-PAGE. Um die Möglichkeit einer Phosphorylierung oder Glykosylierung zu überprüfen, wurden stromale Extrakte der Diatomeen *O. sinensis* und *C. granii* mit Phosphatasen und Amidasen behandelt. Die Inkubation der Extrakte von *C. granii* mit PNGaseF führte zu einer Verkleinerung des PRK-Proteins, wie Abbildung 3-10 C zeigt. Aus dem veränderten Laufverhalten lässt sich eine Verkleinerung um ca. 1,4 kDa ableiten. Die Amidase PNGaseF (Peptide-N-Glykosidase F) entfernt Glykosylierungen durch Spaltung der Amidbindung zwischen Asparagin und dem ersten

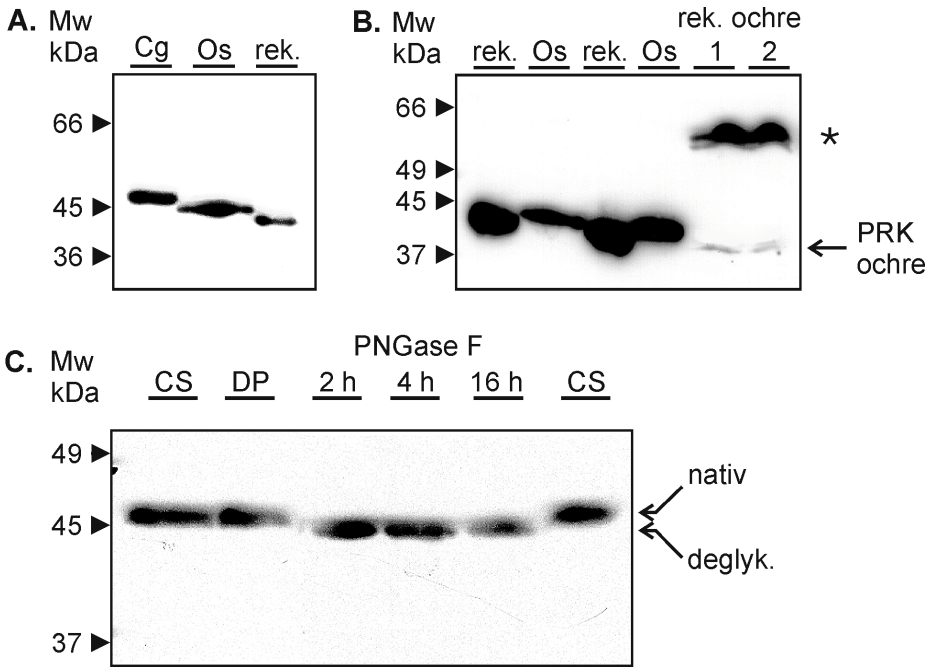


Abb. 3-10: Größenvergleich der nativen PRK mit dem in *E. coli* exprimierten Enzym und der nativen PRK nach Behandlung mit Phosphatasen und Amidasen.
Proteine wurden durch SDS-PAGE aufgetrennt und nach Western-Blot immunologisch nachgewiesen. **A.** Vergleich der apparenten Größen der PRK von *C. granii* (Cg), *O. sinensis* (Os) und dem rekombinanten Protein (rek.). **B.** Die apparenten Größen der PRK im stromalen Extrakt aus *O. sinensis* (Os) und dem gereinigten, rekombinanten Protein (rek.) sowie dem rekombinanten Protein mit nativem Stopp-Kodon (rek. Ochre) im Bakterienhomogenat (* = Kreuzreaktion mit bakteriellem Protein). **C.** Die apparente Größe der PRK im stromalen Extrakt von *C. granii* (CS) und nach Inkubation mit Phosphatase (CIP, 1U/µl) (Spur DP) oder der Amidase PNGase F (10 U/µl) für den angegebenen Zeitraum. Proteinstandard, Größen in kDa wie angegeben.

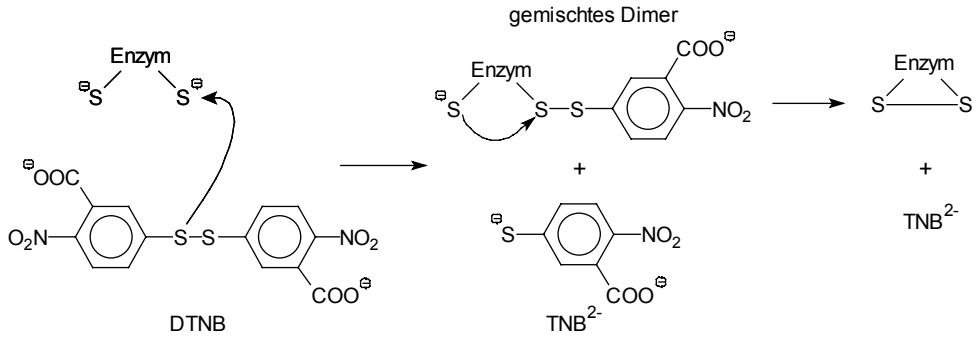
Zuckerbaustein (N-Glykosylierung). Dies lässt vermuten, dass die PRK von *C. granii in vivo* N-glykosyliert wird. Da die Aminosäure-Sequenz der PRK aus *C. granii* nicht bekannt ist, ist ein Vergleich mit der Sequenz von *O. sinensis* nicht möglich. Die Untersuchung der PRK-Sequenz von *O. sinensis* zeigte jedoch in Berechnungen drei potentielle Glykosylierungs-Positionen (116-V**N**GTL; 300-S**N**TST; 324-N**N**GTG). Für der PRK aus *O. sinensis* wurde jedoch nach Zugabe von Phosphatasen oder Amidasen keine Veränderung beobachtet (Daten nicht gezeigt). Möglicherweise kann die PRK von *O. sinensis* durch eine weitere Modifizierung des Zuckerbausteins nicht durch PNGaseF deglykosyliert werden.

Die gezeigten Daten lassen vermuten, dass die PRK von *O. sinensis* auch glykosyliert wird, da sich so die beobachteten Größenunterschiede zum überexprimierten Protein erklären lassen.

3.3.4 Untersuchungen zum Mechanismus der Inaktivierung

Die bisherigen Daten zeigen, dass die Aktivität der PRK durch Oxidation und Reduktion beeinflusst werden kann. Die Untersuchungen konnten jedoch nicht direkt zeigen, dass der Effekt auf der reversiblen Bildung eines Disulfids beruht.

Die Dithiol-Verbindung DTNB wurde bereits für die Oxidation von Enzymen im stromalem Extrakt verwendet. DTNB ermöglicht weiterhin die Quantifizierung von Cysteinen sowie die der Bildung von Disulfiden (Porter *et al.*, 1988 und 1990). Die Methode basiert auf der Reaktion des Thiols mit DTNB, die zu der Bildung eines gemischten Disulfids und der Freisetzung eines Moleküls 2-Nitro-5-Thiobenzoesäure (TNB^{2-}) führt. Falls eine weitere benachbarte Thiol-Gruppe vorhanden ist, die ein Disulfid bilden kann, reagiert das primäre gemischte Dimer unter Bildung eines intramolekularen Disulfids und Freisetzung eines weiteren TNB^{2-}-Moleküls.



Entsprechend diesem Mechanismus führt die Oxidation einer einzelnen oder mehrerer Thiolgruppen, die kein Disulfid bilden können, zur Freisetzung von einem Mol TNB^{2-} pro Mol DTNB. Dem gegenüber setzen Thiol-Gruppen, die ein Disulfid bilden können, zwei Mole TNB^{2-} pro Mol DTNB frei. Die Bestimmung von TNB^{2-} erfolgt photometrisch (412nm, ε = 14,15 mM^{-1} cm^{-1}) mit hoher Empfindlichkeit (Riddles *et al.*, 1979).

Die aufgereinigte PRK aus *O. sinensis* wurde in einer Küvette mit schrittweise steigenden Konzentrationen DTNB inkubiert. Nach jeder Zugabe von DTNB wurde nach Erreichen einer stabilen Absorption bei 412 nm eine Probe entnommen, in der die Aktivität der PRK bestimmt wurde. Eine stabile Absorption wurde in der Regel nach 5 Minuten erreicht. Die Titration der PRK (Konzentration 5,7 µM) mit DTNB führte reproduzierbar zu einer Inaktivierung der PRK

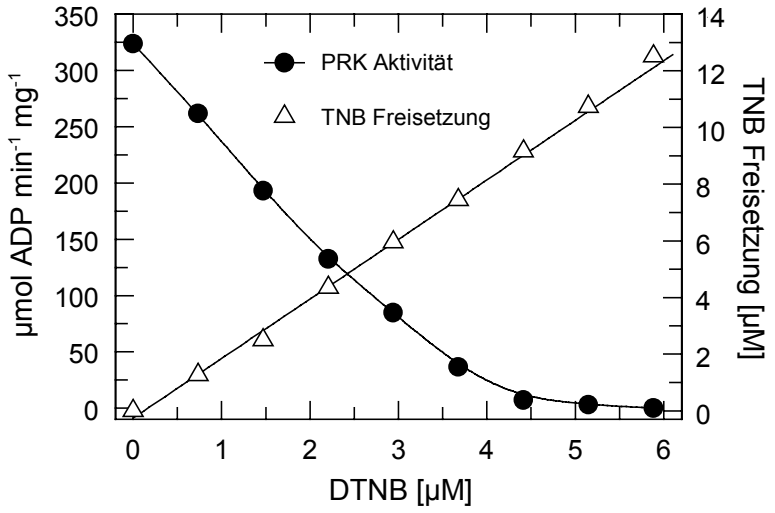


Abb. 3-11: Titration regulatorischer Cysteine der PRK mit DTNB.
Die gereinigte PRK (siehe 3.3.1) wurde in einer Küvette durch die schrittweise Zugabe von DTNB oxidiert. Die DTNB Stammlösung wurde zuvor kalibriert (siehe 2.2.1). Nach jeder Zugabe wurde die Veränderung der Absorption bei 412 nm verfolgt. Nach Einstellung einer stabilen Extinktion wurde aus dieser die Konzentration von freigesetztem TNB^{2-} bestimmt (Dreiecke). Parallel dazu wurde die Enzymaktivität der PRK (Kreise) in entnommenen Proben ermittelt. Während der Titration wurde die Küvette auf 15°C temperiert.

(siehe Abb. 3-11). Die PRK-Aktivität fällt dabei bis zu einer Konzentration von ca. 4,5 µM DTNB annähernd linear ab. Bei dieser Konzentration ist die Aktivität kleiner als 2% der maximal gemessenen Aktivität. Dies entspricht einem Verbrauch von ca. 0,8 µmol DTNB pro µmol PRK. Die vollständige Inaktivierung benötigte jedoch ca. 5,5 µM DTNB, entsprechend einer 1:1 Stöchiometrie. Eine leichte Abweichung von der 1:1 Stöchiometrie wurde auch in Untersuchungen der PRK von Spinat beobachtet (Porter *et al.*, 1988).

Die Quantifizierung des freigesetzten TNB^{2-} ergab einen linearen Anstieg mit einer Steigung von 2,1 über den gesamten Bereich der Titration (Abb. 3-11). Wie oben erklärt, ist dies ein eindeutiger Hinweis für die Bildung eines Disulfids. Untersuchungen mit DTNB Konzentrationen über 6 µM zeigten, dass die TNB^{2-}-Freisetzung auch nach vollständiger Inaktivierung der PRK fortschreitet. Bis zu einer Konzentration von 11 µM DTNB wurde eine Freisetzung mit einer 1:2 Stöchiometrie bestimmt; danach war fast keine Zunahme von TNB^{2-} mehr zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Dies könnte auf ein weiteres Dithiol/Disulfid Paar in der PRK von *O. sinensis* hinweisen. In gleichen Untersuchungen für das Spinat-Enzym konnten keine Hinweise für ein zweites Dithiol/Disulfid-Paar gefunden werden (Porter *et al.*, 1988).

Da die Reaktion des gemischten Disulfids theoretisch auch zur Bildung eines intermolekularen Disulfids führen kann, wurde in einer nicht reduzierenden SDS-PAGE überprüft, ob die Oxidation mit DTNB zur Bildung von hochmolekularen Cystein-Quervernetzungen führt. Die vollständig reduzierten PRK-Proteine zeigten keine hochmolekularen Aggregate (Abb. 3-12, Spur 1). Banden von ca. 90 kDa, entsprechend einem PRK-Dimer, konnten bei Auftrennung größerer Mengen der mit DTNB oxidierten PRK beobachtet werden (Abb. 3-12, Spur 3-5). Der Anteil dieser Bande nimmt mit der Konzentration des Oxidationsmittels zu, ist aber nach Abschätzung immer sehr viel kleiner als 5% und hat

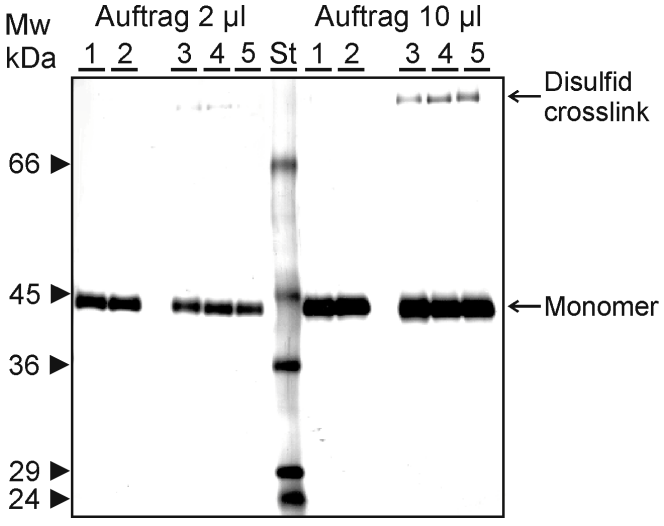


Abb. 3-12: Überprüfung der durch DTNB oxidierten PRK auf intermolekulare Disulfid-Quervernetzungen.
SDS-PAGE von unbehandelter und mit verschiedenen Konzentrationen DTNB oxidierter PRK (siehe Abb. 3-11). Spur 1, unbehandelte rekombinante PRK (5,7 µM); Spur 2, Protein wie in Spur 5 nach Reduktion mit DTT und Methylierung mit Iodacetessigsäure; Spur 3 – 5, Protein nach Oxidation mit 1,5 µM, 2,9 µM und 5,8 µM DTNB. Es wurden im linken Teil 2 µl und im rechten Teil 10 µl der Probe aufgetragen. Größen des Proteinstandards (St) wie angegeben. Die Visualisierung der Proteine erfolgte durch Silberfärbung.

damit keine signifikante Bedeutung für die Stöchiometrie der Inaktivierung. Um zu zeigen, dass es sich tatsächlich um Cystein-Quervernetzungen handelt, wurde die Probe mit der höchsten Konzentration DTNB vor dem Auftrag vollständig reduziert und die Thiole durch Methylierung modifiziert, so dass keine weitere Oxidation möglich ist. Die so behandelte Probe zeigte unter denaturierenden Bedingungen keine andere Bande als die des Monomers bei 45 kDa (Abb. 3-12, Spur 2).

Die Aktivität der durch DTNB oxidierten PRK konnte durch Reduktion vollständig wiederhergestellt werden (siehe auch 3.4.2). Es konnte jedoch kein eindeutiger Effekt von Thioredoxin beobachtet werden. Beide Isoformen von Spinat, Trx-m und Trx-f, die nach Überexpression in *E. coli* präpariert und aufgereinigt wurden (siehe 2.5.1.3), zeigten keinen klaren Einfluss auf die Aktivierung (Daten nicht gezeigt). Eine Reaktivierung mit bakteriellem Thioredoxin zeigte jedoch eine Erhöhung der Aktivierungsrate.

Vergleichende Untersuchungen an gereinigter Spinat PRK zeigten eine Erhöhung der Aktivierungsrate durch die pflanzlichen Trx-Isoformen. Dabei konnte zunächst kein auffälliger Unterschied zwischen Trx-m und Trx-f beobachtet werden. Bei höheren Trx-Konzentrationen führte die Isoform m allerdings zu einem erhöhtem V_{max} gegenüber Trx-f (Daten nicht gezeigt). Dies ist in Übereinstimmung mit neueren Untersuchungen der Trx-abhängigen Aktivierung der PRK von Spinat (Geck und Hartmann, 2000). Die spezifische Aktivierung der Spinat-PRK durch diese Thioredoxine zeigt auch, dass die präparierten heterolog exprimierten Spinat-Isoformen m und f (siehe 2.5.1.3) katalytisch aktiv sind.

3.4 Bestimmung des Redox-Potentials der regulatorischen Cysteine der PRK

Die bisher dargestellten Untersuchungen der PRK-Regulation zeigen im stromalen Extrakt aus Diatomeen und für das gereinigte Enzym von *Odontella sinensis* eindeutig die Möglichkeit zur Modulation der Enzymaktivität über den Redox-Status. Es konnten jedoch keine Hinweise für eine Bedeutung dieser Regulation unter physiologischen Bedingungen gefunden werden. Da die PRK nur unter stark oxidierenden Bedingungen inaktiviert werden konnte, könnte ein verändertes Redox-Potential der regulatorischen Cysteine, d.h. ein Potential, welches unter physiologischen Bedingungen in den Plastiden nicht erreicht wird, diese Widersprüche erklären. Daher wurde ein System etabliert, welches die Bestimmung des mittleren Redox-Potentials der regulatorischen Cysteine ermöglicht.

Unter den möglichen experimentellen Methoden wurde auf Grund des geringsten apparativen Aufwands die biochemische Methode der Redox-Gleichgewichts-Titration ausgewählt [*engl.* Redox-Poising-Technik (Hutchinson und Ort, 1995)]. Diese Methode der Oxidations-Reduktions-Titration verwendet Mischungen von oxidiertem und reduziertem DTT, um einen Redox-Puffer mit einem definierten Redox-Potential (E_h) herzustellen. Der Reduktions-Grad des regulatorischen Disulfids, im Gleichgewicht mit dem eingestellten E_h des Redox-Puffers, ist eine intrinsische Eigenschaft des Enzyms, die über die Enzymaktivität abgeleitet werden kann. Daher ermöglicht eine Analyse der Enzymaktivität bei verschiedenen E_h-Werten die Bestimmung des mittleren Redox-Potentials dieses Disulfids.

3.4.1 Einstellung geeigneter experimenteller Bedingungen für die Redox-Gleichgewichts-Titration

3.4.1.1 Einstellung geeigneter Inkubations-Bedingungen

Die Einstellung eines Gleichgewichts zwischen dem Reduktions-Grad des Enzyms und dem Redox-Puffer ist eine grundlegende Voraussetzung für die Redox-Gleichgewichts-Titration. Es wurde nach Bedingungen gesucht, unter denen sich das Gleichgewicht einstellt und die Stabilität des Enzyms über den Messzeitraum gewährleistet ist. Für die Optimierung geeigneter Messbedingungen wurde die PRK aus Spinat verwendet (siehe 3.3.2). Die Abbildung 3-13 A zeigt die Zunahme der Enzymaktivität der PRK von Spinat über die Zeit, ausgehend vom oxidierten Enzym, bei verschiedenen E_h-Werten und einem pH von 7,0. Dargestellt ist der Quotient aus aktueller Aktivität und maximaler Aktivität. Die Enzymaktivität ist ein Maß für den Anteil reduzierter Enzyme [E_{red}], da die oxidierte Form [E_{ox}] keine Aktivität aufweist. Damit

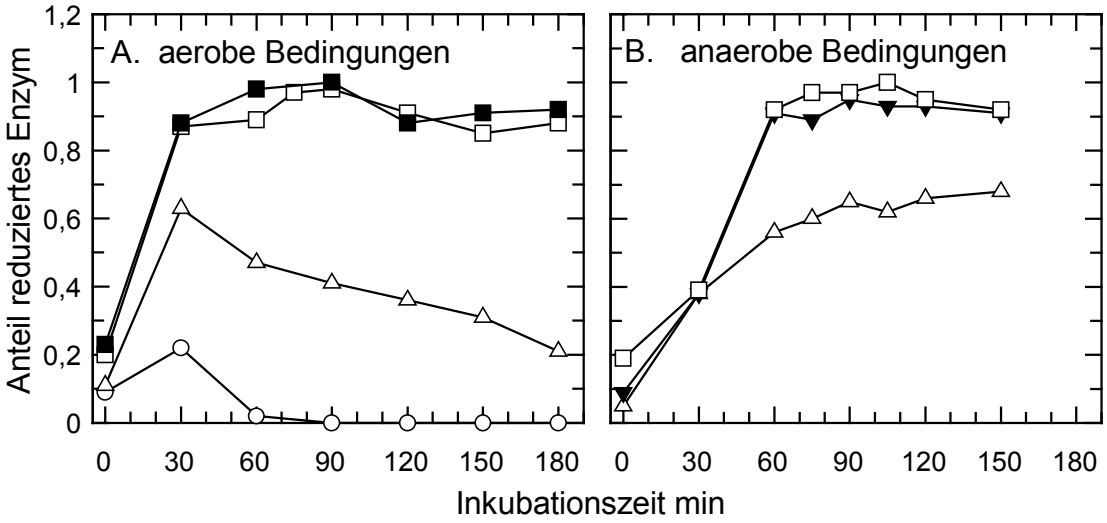


Abb. 3-13: Zeitverlauf der Reaktivierung oxidierter Spinat-PRK in Redox-Puffersystemen.
Betrachtung des Quotienten von aktueller und maximaler Enzymaktivität als Maß für den Reduktions-Grad des regulatorischen Disulfids im zeitlichen Verlauf der Reaktivierung. Die Reaktivierung oxidierter PRK (1 µM Untereinheiten) wurde in 150 mM MOPS, pH 7,0 bei 25°C durchgeführt. **A.** Aerobe Bedingungen, Redox-Potentiale (E_h) waren –260 mV (Kreise), -290 mV (Dreiecke), -330 mV (Quadrate), bei einer DTT-Gesamtkonzentration von 80 mM oder 100 mM reinem reduziertem DTT (gefüllte Quadrate). **B.** Anaerobe Bedingungen, (Details siehe Text), E_h-Werte –290 mV (Dreiecke), -330 mV (Quadrate), bei einer DTT-Gesamtkonzentration von 80 mM und E_h –330 mV bei einer DTT-Gesamtkonzentration von 50 mM (gefüllte Dreiecke).

spiegelt die maximale Enzymaktivität die Gesamtkonzentration [E_{total}] an Enzymen wider, und der Quotient ist ein Maß für den Anteil reduzierter Enzyme.

Unter aeroben Bedingungen wird für positivere Redox-Potentiale (-270 mV und –290 mV) kein Gleichgewicht erreicht, und der Reduktions-Grad geht nach einem Anstieg zu Beginn im weiteren Verlauf gegen Null. Obwohl dieser Effekt für die negativeren Reduktionspotentiale nicht so ausgeprägt ist, ist offensichtlich, dass diese Bedingungen die Einstellung eines Gleichgewichts nicht erlauben. Gelöster Sauerstoff kann Reduktionsmittel oxidieren. Direkte Oxidation von Cysteinen durch O_2 benötigt meist katalytische Mengen von Metallionen, im Besonderen Cu^{2+} (Ahmed *et al.*, 1975). Kontrollexperimente zeigten keine direkte Oxidation des Enzyms in der Gegenwart des Metall-Chelators EDTA (Daten nicht gezeigt), der auch in allen Redox-Titrationen anwesend war. Obwohl DTT gegenüber Oxidation durch O_2 selbst nicht besonders empfindlich sein soll, deuten die stärkeren Effekte bei positiveren E_h-Werten auf einen direkten Effekt von O_2 auf das Redox-Puffersystem hin.

Eine Reaktivierung unter anaeroben Bedingungen bestätigt dies. Hierfür wurden alle Puffer mit Stickstoff begast und die Inkubation unter Stickstoffatmosphäre durchgeführt. Unter diesen Bedingungen etabliert sich ein Gleichgewicht zwischen Enzym und Redox-Puffer, welches über den Messzeitraum stabil bleibt (Abb. 3-13 B). Der Reduktions-Grad des Enzyms befindet sich

nach ca. 90 Minuten im Gleichgewicht und zeigt für weitere 60 Minuten keine Veränderung. Unter diesen Bedingungen und einer Inkubation von 120 Minuten ist der Reduktions-Grad des Disulfids nur noch abhängig von dem eingestellten E_h-Wert des Redox-Puffersystems.

3.4.1.2 Einstellung und Stabilität des Redox-Potentials

In der Redox-Gleichgewichts-Titration ist das Redox-Potential (E_h) die variable Größe. Die reproduzierbare und korrekte Einstellung von E_h sowie die Stabilität über den Inkubationszeitraum ist die Voraussetzung für die Bestimmung vergleichbarer und aussagekräftiger mittlerer Redox-Potentiale (E_m) von regulatorischen Cysteinen.

Die Einstellung eines Redox-Puffers benötigt zuallererst das genaue Standard-Reduktionspotential der verwendeten Thiol-Verbindung unter den angewendeten Versuchsbedingungen. Der üblicherweise in der Literatur zugängliche Wert ist $E^{0\prime}$, das Standard-Reduktionspotential bei pH 7,0 und 25°C. Für den generellen Fall einer Reduktions-Halbreaktion mit dem Gleichgewicht:

$$ox + ne^- \longleftrightarrow red$$

lässt sich das Reduktionspotential nach der Nernst-Formel wie folgt berechnen:

$$E = E^0 - \frac{RT}{nF} \ln\left(\frac{[red]}{[ox]}\right) \qquad (1)$$

Wenn das Gleichgewicht jedoch den Austausch von Protonen beinhaltet, wie im Fall von Thiolen, ist das Reduktionspotential pH-abhängig. Entsprechend dem Gleichgewicht errechnet sich das Reduktionspotential dann wie folgt:

$$S\|S + 2H^+ + 2e^- \xleftrightarrow{K1} HS\|S^- + H^+ \xleftrightarrow{K2} HS\|SH$$

$$E = E^0 - \frac{RT}{2F} \ln\left(\frac{[HS\|SH]}{[S\|S]\,[H^+]^2}\right) \qquad (2)$$

mit S||S der oxidierten Form, HS||S$^-$ der reduzierten Thiol/Thiolat-Form und HS||SH der reduzierten Dithiol-Form. Aus dieser Form der Nernst-Gleichung kann ein pH-abhängiger Term abgeleitet werden, indem man die formalen, d.h. die absoluten Konzentrationen der oxidierten

($F_{S\|S}$) und reduzierten ($F_{HS\|SH}$) Form des Thiols verwendet (Chivers *et al.*, 1997a). Der Anteil der voll protonierten reduzierten Form ist, wie aus dem Gleichgewicht folgt, gegeben durch:

$$\frac{[HS\|SH]}{F_{HS\|SH}} = \frac{[H^+]^2}{[H^+]^2 + [H^+]K1 + [H^+]K2 + K1\,K2} \qquad (3)$$

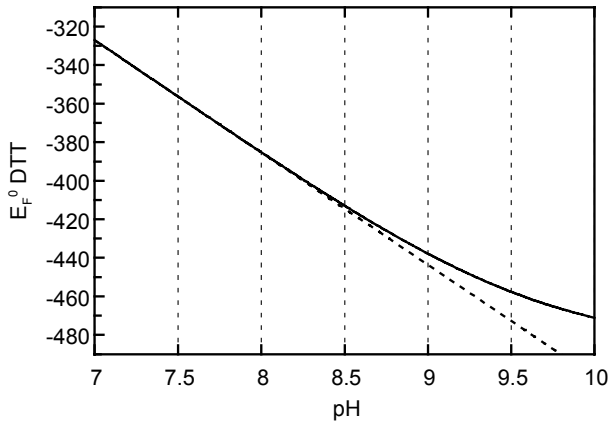
mit K1 und K2, den Säure-Dissoziationskonstanten entsprechend den pK_a-Werten der Dithiol-Form. Dieser Term beschreibt die Säure/Base-Gleichgewichte der reduzierten Form. Dann resultiert durch Substitution dieses Terms in Gleichung 2 die Nernst-Gleichung in der Form:

$$E = \underline{E^0 - \frac{RT}{nF}\ln\left(\frac{1}{[H^+]^2 + [H^+]K1 + [H^+]K2 + K1\,K2}\right)} - \frac{RT}{nF}\ln\left(\frac{F_{HS\|SH}}{F_{S\|S}}\right) \qquad (4)$$

Die beiden unterstrichenen Terme der Gleichung (4) beschreiben das formale Reduktionspotential und werden im folgenden als E_F^0 definiert (Gleichung 5). Im Falle das $F_{HS\|SH} = F_{SS}$ ist, ist $E = E_F^0$. Bei pH 7,0 ist E_F^0 als $E^{0\prime}$ definiert.

$$E_F^0 = E^0 - \frac{RT}{2F}\ln\left(\frac{1}{[H^+]^2 + [H^+]K1 + [H^+]K2 + K1\,K2}\right) \qquad (5)$$

Gleichung (5) erlaubt, ausgehend von $E^{0\prime}$, die Berechnung des Standard-Reduktionspotentials E^0 und des formalen Standard-Reduktionspotentials E_F^0 von DTT für andere pH-Werte als pH 7,0. Dabei wurde für $E^{0\prime}$ der von Lees und Whitesides (1993) beschriebene Wert von –327 mV verwendet. Die Werte für die Säure-Dissoziationskonstanten (K1 und K2) ergeben sich aus den für DTT beschriebenen pK_a-Werten von 9,21 und 10,1 (Whitesides *et al.*, 1977). Um die Notwendigkeit der Berechnung von E_F^0 für DTT über Gleichung 5 zu verdeutlichen, zeigt Abbildung 3-14 die pH-Abhängigkeit von E_F^0, berechnet nach Gleichung 5 (durchgezogenen Linie), im Vergleich zu der vereinfachten linearen Beziehung zwischen E^0_x und pH (gestrichelte Linie), wie sie aus Gleichung 2 abgeleitet werden kann [$E^0_x = E^{0\prime} – 59$ mV (pH_x – pH 7,0), siehe Hutchinson und Ort (1995)]. Die für die weiteren Messungen verwendeten E_F^0-Werte für DTT sind tabellarisch für die verschiedenen pH-Werte aufgeführt.



pH	E_F^0 mV
7	-327 = $E^{0'}$
7,5	-356
8	-385
8,5	-412
9	-437

Abb. 3-14: pH-Abhängigkeit des E_F^0 und E^0_x von DTT.
Die pH-Abhängigkeit von E_F^0 (durchgezogene Linie) wurde mit Gleichung 5 bestimmt. Die Berechnung von E^0_x (gestrichelte Linie) erfolgte nach der linearen Beziehung $E^0_x = E^{0'} - 59$ mV (pH x – pH 7). Die berechneten E_F^0-Werte sind in der Tabelle explizit aufgeführt.

Die Betrachtung der anhand dieser Parameter und unter Verwendung von Gleichung 1 eingestellten E_h-Werte nach einer Inkubation für zwei Stunden unter den Bedingungen der Redox-Gleichgewichts-Titration zeigt sowohl deren Stabilität als auch deren Reproduzierbarkeit (Abb. 3-15). Dargestellt ist die Abweichung der nach der Inkubation bestimmten E_h-Werte vom eingestellten Redox-Potential. Die Abweichung ist für fast alle Werte kleiner als 0,5%. Es wurden auch keine signifikanten Unterschiede zu den E_h-Werten festgestellt, die vor der Inkubation bestimmt wurden (Daten nicht gezeigt). Die größere Abweichung (<2,3%) für die am stärksten oxidierenden und reduzierenden Redox-Potentiale ergibt sich, in Analogie zur Säure/Base-Titration schwacher Proteolyte, aus deren Nähe zu den Grenzen des Pufferbereichs vom Redox-System. Um die sich daraus ergebenden Fehler gering zu halten, wurden höhere

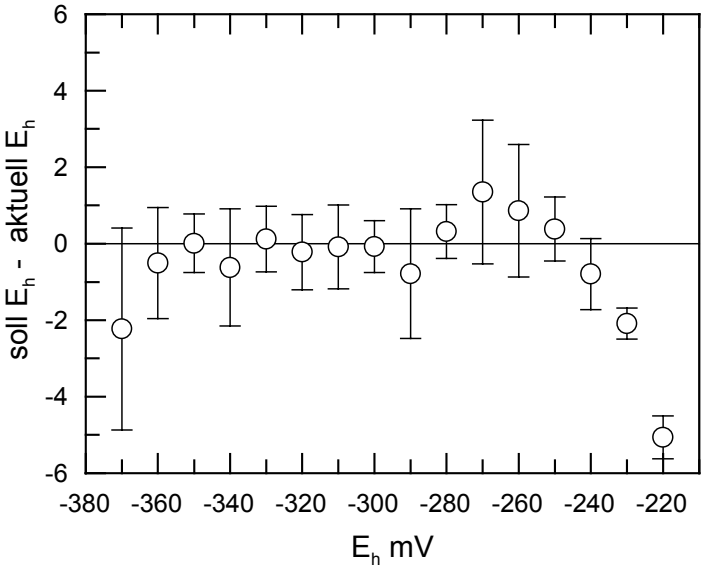


Abb. 3-15: Genauigkeit und Stabilität der eingestellten Redox-Potentiale.
Abweichung der experimentell ermittelten E_h-Werte vom theoretisch eingestellten E_h-Wert. Die E_h-Werte wurden nach einer zweistündigen Inkubation unter anaeroben Bedingungen (wie unter Abb. 3-13 beschrieben) ermittelt. Angegeben ist der Mittelwerte ± Standardabweichung aus 4 unabhängigen Messreihen.

Konzentrationen des Redox-Systems eingesetzt (wie hier 80 mM DTT Gesamtkonzentration). Da DTT nur für die Herstellung eines Redox-Potentials benötigt wird, mit dem das Protein ins Gleichgewicht kommt, sollte der Redox-Status des Enzyms unabhängig von der totalen Konzentration des Redox-Puffersystems sein, vorausgesetzt die Konzentration ist hoch genug für die Einstellung eines Gleichgewichts. Wie in Abbildung 3-13 B gezeigt, wurden keine signifikanten Unterschiede im Redox-Status der PRK zwischen Ansätzen mit einer totalen DTT-Konzentration von 50 mM und 80 mM festgestellt.

Die damit mögliche zuverlässige und stabile Einstellung eines Redox-Potentials, mit dem das Enzym ins Gleichgewicht kommt, stellt die Grundlage für die quantitative Bestimmung der mittleren Redox-Potentiale E_m regulatorischer Cysteine dar.

3.4.1.3 Das mittlere Redox-Potential E_m der PRK von Spinat

Bevor die Redox-„Poising"-Technik auf die PRK von *O. sinensis* angewendet wurde, sollte sie an einem Referenz-System überprüft werden. Hierfür wurde die PRK von Spinat verwendet (siehe 3.3.2), deren thermodynamischen Eigenschaften des Sulfhydryl/Disulfid-Austausches bereits mit dieser Methode bestimmt wurden (Hirasawa *et al*., 1998 und 1999). Für diese Messungen wurde das oxidierte Enzym unter den zuvor etablierten Bedingungen in Redox-Puffersystemen verschiedener E_h-Werte inkubiert. Nach zwei Stunden wurde in Proben der Ansätze parallel die Enzymaktivität (siehe 2.5.4) sowie die Konzentration von oxidiertem und reduziertem DTT (siehe 2.2.1) bestimmt. Die maximale Enzymaktivität, die bei stärker reduzierenden Potentialen gemessen werden konnte, wurde als voll aktiviert, also vollständig reduziert, betrachtet. Für die anderen Ansätze wurde der Reduktions-Grad des Enzyms, wie oben beschrieben, berechnet. Aus den Konzentrationen für die oxidierte und reduzierte Form von DTT wurde das aktuelle Redox-Potential am Ende der Inkubation bestimmt. Die Bestimmung des mittleren Redox-Potentials der Cysteine (E_m) erfolgte durch Anpassung der Nernst-Funktion an die experimentellen Daten (Abb. 3-16). Die gemessene Enzymaktiviät ist ein Maß für die Konzentration der reduzierten Enzym-Form [E_{red}]. Für die maximale Enzymaktivität spiegelt sie die Gesamtkonzentration an Enzym [E_{total}] wider. Die Konzentration der oxidierten Form des Enzyms ergibt sich aus der Summenformel:

$$\left[E_{total}\right] = \left[E_{red}\right] + \left[E_{ox}\right]$$

Substitution in der Nernst-Gleichung (Gleichung 1) und Umformung ergibt die Beziehung:

$$\left[E_{red}\right] = \left[E_{total}\right] \Big/ \left(10^{\left(E_h - E_m\right) / 59 \cdot n} + 1 \right) \qquad (6)$$

mit E_h dem eingestellten Redox-Potential (h weist auf den Bezug auf die Standard-Wasserstoffelektrode hin), E_m dem zu bestimmenden mittleren Redox-Potential der Cysteine und n der Anzahl der übertragenen Elektronen pro Reduktion.

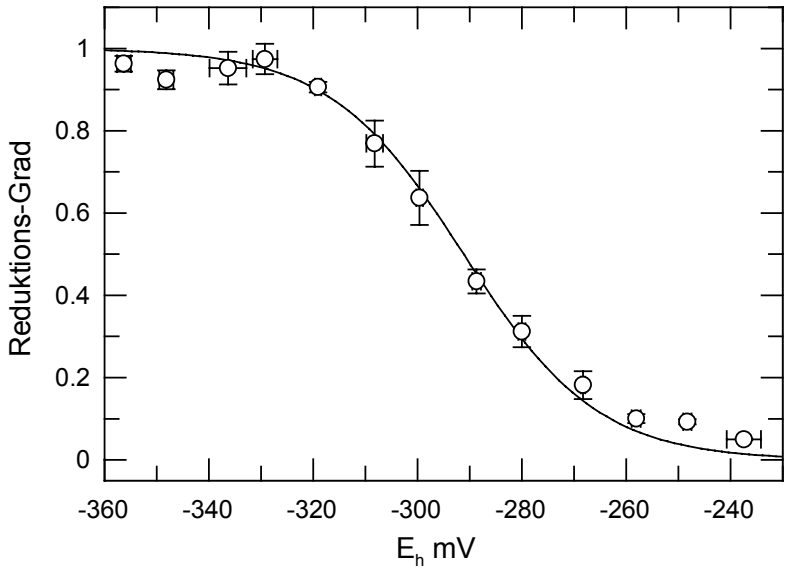


Abb. 3-16: Redox-Gleichgewichts-Titration der Spinat PRK, bei pH 7,0.
Phosphoribulokinase aus Spinat mit einer Endkonzentration von 1 µM Untereinheiten wurde in einem Gesamtvolumen von 100 µl 150 mM Mops, pH 7,0 inkubiert. Der Puffer enthielt zur Einstellung der E_h-Werte verschiedene Verhältnisse von oxidiertem zu reduziertem DTT mit einer Gesamtkonzentration von 80 mM. Nach 120 Minuten Inkubation bei 25°C wurde die Enzymaktivität sowie das Reduktionspotential (über die Konzentration von oxidiertem und reduziertem DTT), wie unter 2.2.1 und 2.5.4 beschrieben, bestimmt. Jeder Datenpunkt repräsentiert den Mittelwert aus 6 Messungen, die in drei unabhängigen Titrationen ermittelt wurden. Wenn keine Fehlerbalken angegeben sind, sind diese kleiner als das Symbol.

Die Anpassung der Daten in Abbildung 3-16 an die Nernst-Gleichung der oben gezeigten Form ergab eine gute Übereinstimmung für eine Reduktion einer Zwei-Elektronen-Komponente, wie für ein Disulfid/Dithiol-Paar zu erwarten ist. In drei unabhängigen Titrationen wurde ein E_m Wert von –289 mV mit einem experimentellen Fehler von ± 4 mV ermittelt. Diese E_m-Werte wurden unabhängig davon ermittelt, ob n gleich Zwei gesetzt oder ebenfalls an die experimentellen Daten angepasst wurde. Die durch Anpassung ermittelten Werte für n wichen nicht signifikant von Zwei ab und bestätigen die Reduktion einer Zwei-Elektronen-Komponente. Die ermittelten E_m-Werte zeigen eine gute Übereinstimmung mit den bereits publizierten Werten

von –295 ± 10 mV für die aus Spinat präparierte PRK und –290 ± 10 mV für die in *E. coli* exprimierte PRK von Spinat (Hirasawa *et al.*, 1998; persönliche Mitteilung David Knaff, Texas Tech University, Lubbock USA).

3.4.2 Redox-Gleichgewichts-Titration der regulatorischen Cysteine der PRK von *Odontella sinensis*

3.4.2.1 Überprüfung der experimentellen Bedingungen

Die bisher durchgeführten Experimente zeigten, dass die ermittelten Versuchsbedingungen für die Bestimmung aussagefähiger und vergleichbarer E_m-Werte regulatorischer Cysteine geeignet sind und sollten nun für die PRK von *O. sinensis* verwendet werden.

Eine erste Redox-Gleichgewichts-Titration unter den für die Spinat-PRK ermittelten Bedingungen bei 25°C zeigte, dass die Enzymaktivität über den Zeitraum der Inkubation nicht stabil war (Daten nicht gezeigt). In früheren Experimenten wurde bereits festgestellt, dass die Stabilität der PRK von *O. sinensis* bei Temperaturen über 20°C nur für kürzere Zeiträume gewährleistet ist. Eine Untersuchung der Enzymstabilität bei verschiedenen Temperaturen unter den Bedingungen der Redox-Gleichgewichts-Titration zeigt Abbildung 3-17. Auch bei einer Temperatur von 15°C führt die Reaktivierung des oxidierten Enzyms zu keinem stabilen Gleichgewicht. Erst eine weitere Erniedrigung der Temperatur auf 10°C führt zu einer

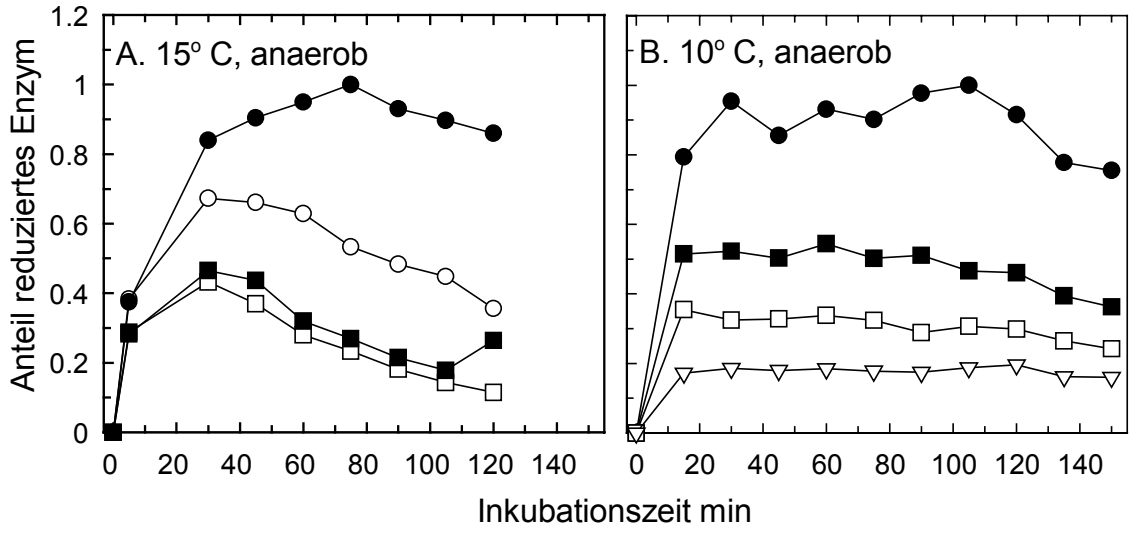


Abb. 3-17: Zeitverlauf der Reaktivierung oxidierter PRK von *O. sinensis* bei verschiedenen Temperaturen. Betrachtung des Reduktions-Grads der PRK im zeitlichen Verlauf der Reaktivierung bei verschiedenen Temperaturen. Mit Ausnahme der Temperatur entsprachen die Bedingungen den unter Abb. 3-13 beschriebenen. **A.** 15°C, **B.** 10°C. E_h-Werte –330 mV (gefüllte Kreise), -320 mV (offene Kreise), -290 mV (gefüllte Quadrate), -260 mV (offene Quadrate) und –240 mV (offene Dreiecke).

Stabilisierung des Enzyms über den benötigten Inkubationszeitraum (Abb. 3-17 B). Bei dieser Temperatur etabliert sich innerhalb von ca. 30 Minuten ein Gleichgewicht zwischen dem eingestellten E_h und dem Reduktions-Grad des Enzyms. Das Gleichgewicht bleibt unter allen getesteten Reduktionspotentialen für weitere 60 Minuten stabil.

Damit ist unter diesen Versuchsbedingungen die Enzymaktivität als ein Maß für den Reduktions-Grad des Enzyms zwischen 60 und 90 Minuten nur vom eingestellten Reduktionspotential abhängig und erlaubt die Bestimmung der E_m-Werte für die regulatorischen Cysteine der PRK von *O. sinensis*.

3.4.2.2 Das mittlere Redox-Potential E_m der PRK von *O. sinensis*

Die Redox-Gleichgewichts-Titration wurde mit Ausnahme der Inkubationstemperatur, die wie oben gezeigt 10°C war, wie für die Spinat-PRK beschrieben, durchgeführt. Die Abbildung 3-18 zeigt die Redox-Titrationen der PRK bei verschiedenen pH-Werten. Dargestellt ist der Anteil reduzierter Enzyme bei verschiedenen E_h-Werten nach einer Inkubation von 75 Minuten.

Für die korrekte Bestimmung des Reduktions-Grades ist es notwendig, innerhalb einer Titration mindestens einen Wert zu messen, der dem voll reduzierten Enzym entspricht. Um zu verdeutlichen, dass die niedrigsten Reduktionspotentiale, bei denen gemessen wurde, zur vollständigen Reduktion des Enzyms führen, ist die maximale spezifische Aktivität, die dem Reduktions-Grad 1 entspricht, innerhalb der Graphen angegeben. Die für die Titrationen bestimmten Werte zeigen keine signifikante Abweichung von der spezifischen Aktivität des voll reduzierten unbehandelten Enzyms (300 U/mg Protein).

Entgegen der Erwartung (Abb. 3-16) zeigte bereits die Titration bei pH 7,0 einen Verlauf, der nicht durch die Nernst-Funktion für einen einzelnen Zwei-Elektronen (n = 2) Reduktionsprozess beschrieben werden kann. Der Reduktions-Grad des Enzyms nimmt über einen zweiphasigen Verlauf mit dem Redox-Potential ab (Abb. 3-18 A). Diese Abhängigkeit ist in den Titrationen bei pH 7,5 und pH 8,0 noch deutlicher zu beobachten (Abb. 3-18 B und C). Die Redox-Eigenschaften des Enzyms lassen sich in diesem pH-Bereich nicht durch eine einfache regulatorische Komponente beschreiben. Die zwei Phasen deuten vielmehr auf die Beteiligung von mindestens zwei Dithiol/Disulfid-Paaren hin, die durch verschiedene E_m-Werte charakterisiert sind. Dem entsprechend ließen sich die experimentellen Daten für die pH-Werte 7,0 sowie 7,5 und 8,0 nicht durch die einfache Nernst-Gleichung (Gleichung 6) beschreiben. Die Anpassung der experimentellen Daten an eine Nernst-Funktion für einen Zwei-Komponenten, Zwei-Elektronen-Reduktionsprozess ergab jedoch eine sehr gute Übereinstimmung mit den Daten (Abb. 3-18 A - C). Die so ermittelten E_m-Werte für die beiden Komponenten sind

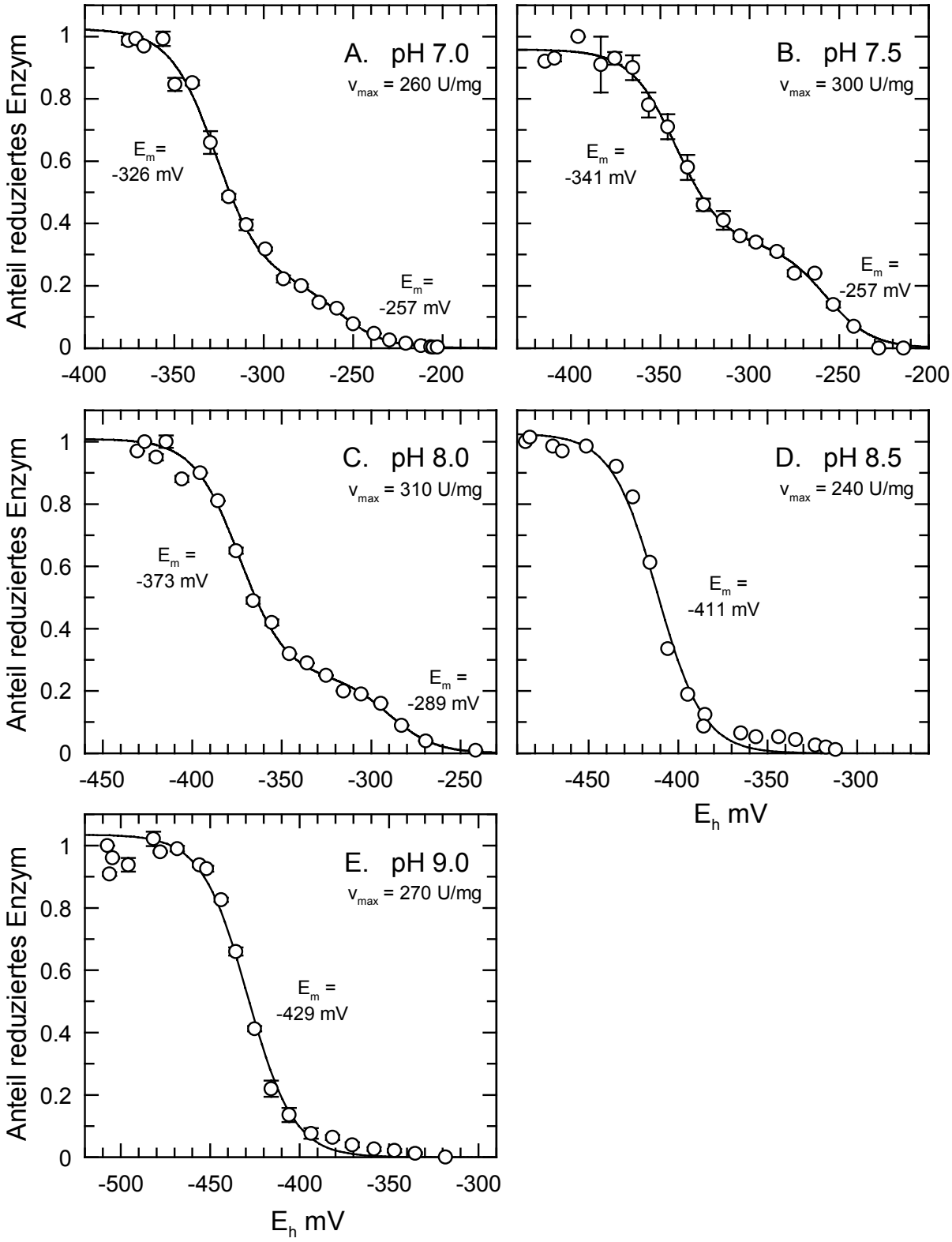


Abb. 3-18: Redox-Gleichgewichts-Titration der PRK von *O. sinensis* bei verschiedenen pH-Werten.
Die oxidierte PRK von *O. sinensis* mit einer Endkonzentration von 0,5 µM Untereinheiten wurde für 75 Minuten bei 10°C in 150 mM Puffer inkubiert. Die verwendeten Puffer waren Mops pH 7,0 und pH 7,5; Bicine pH 8,0; BisTris Propan pH 8,5 und pH 9,0. Zur Einstellung der Reduktionspotentiale enthielten die Puffer Gemische von oxidiertem und reduziertem DTT mit einer Gesamtkonzentration von 80 mM. Die Ermittlung der Daten erfolgte wie unter Abb. 3-16 beschrieben. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus 2 Messungen. Wenn keine Standardabweichung angegeben ist, ist sie kleiner als das Symbol.

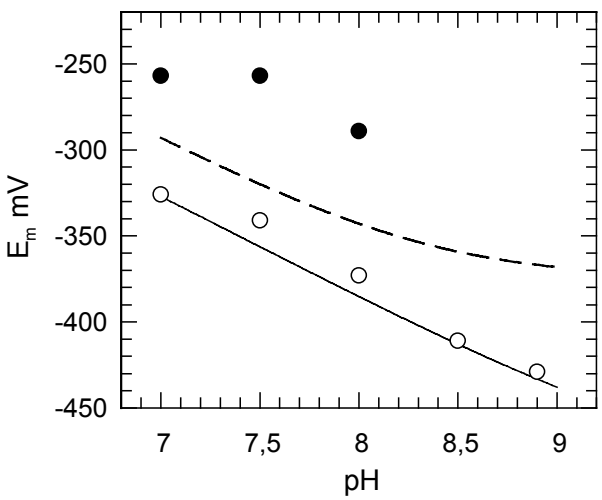


Abb. 3-19: E_m-Werte der PRK von *O. sinensis* im Vergleich mit dem Spinat-Enzym.
Dargestellt sind die in Abb. 3-18 ermittelten E_m-Werte der PRK von *O. sinensis* bei den verschiedenen pH-Werten. Das positivere Potential ist als gefüllter Kreise und das negativere als offener Kreis dargestellt. Zum Vergleich sind die E_m-Werte von Spinat, wie sie sich nach Berechnung mit Gleichung 5 (siehe 3.4.1.2) aus dem E_m' und den pK_a Werten der Cysteine ergeben (Hirasawa *et al.*, 1999), abgebildet (gestrichelte Kurve). Weiterhin ist der E_f^0-Wert von DTT dargestellt (durchgezogene Linie, wegen Details siehe Abb. 3-15).

innerhalb der Graphen angegeben. Obwohl sich die Daten für pH 8,5 und 9,0 sehr gut durch ein Ein-Komponenten-System beschreiben lassen und die E_m-Werte so bestimmt wurden, zeigen auch hier die Aktivitäten bei niedrigeren E_h-Werten eine Abweichung von der Nernst-Funktion. Diese Unterschiede sind jedoch zu gering, als dass diesen Daten ein E_m-Wert zugeordnet werden kann.

Eine Betrachtung der so bestimmten E_m-Werte zeigt (Abb. 3-19), dass das im physiologischen pH-Bereich beobachtete positivere Potential der PRK von *O. sinensis* sehr viel positiver ist als das der Spinat-PRK. Dies würde relativ einfach die ständige Aktivierung der PRK erklären können. Das zweite, negativere Potential, welches auch bei höheren pH-Werten ermittelt werden konnte, ist jedoch im Vergleich zu dem Potential des Spinat-Enzyms negativer. Dieses Ergebnis bietet keine einfache Erklärung für die permanente Aktivierung des Diatomeen-Enzyms, da das zweite, negativere Potential sogar eine oxidative Inaktivierung erleichtern würde. Das Potential dieser Komponente zeigt eine sehr gute Übereinstimmung mit dem Standardpotential von DTT, was darauf hindeuten könnte, dass für diese Komponente möglicherweise ein reiner Konzentrationseffekt von DTTred vorliegt.

Die Bestimmung von E_m durch die Redox-Gleichgewichts-Titration basiert auf der Annahme, dass im Gleichgewicht ein Gemisch von oxidiertem und reduziertem Enzym vorliegt. Ist im Gleichgewicht jedoch eine signifikante Menge eines gemischten Disulfids vorhanden, welches sich durch die Reaktion von reduziertem DTT mit oxidiertem Enzym bildet, kann dies zu ungewöhnlichen Ergebnissen führen (persönliche Mitteilung David Knaff, Texas Tech University, Lubbock USA). Die Zugabe von katalytischen Mengen Trx zu den Ansätzen könnte solche Probleme beheben, unter der Voraussetzung, dass das verwendete Trx das Enzym aktivieren kann. Die durchgeführten Untersuchungen konnten jedoch keinen Einfluss der beiden Trx-Isoformen von Spinat auf die Reaktivierung der PRK von *O. sinensis* zeigen (siehe 3.3.4). Die Auflösung eines gemischten Dimers zwischen DTTred und oxidierter PRK wäre

wahrscheinlich unmittelbar von der DTTred-Konzentration abhängig und könnte daher zu einem Redox-Potential, ähnlich dem negativeren der beiden bestimmten Potentiale, führen. Auch die Bildung eines gemischten Dimers zwischen PRK und TNB, resultierend aus der Oxidation der PRK durch DTNB, welches über sterische Effekte die Aktivität der PRK beeinflusst, könnte den beobachteten Effekt erklären. Die DTNB-Titration der regulatorischen Cysteine (siehe 3.3.4, Erläuterung zu Abb. 3-11) liefert jedoch keinen Hinweis dafür, dass die Oxidation mit DTNB zur Bildung eines stabilen gemischten Dimers zwischen PRK und TNB führt.

Redox-Potentiale die sich auf ein gemischtes Dimer zurückführen lassen, wären als artifiziell zu betrachten und hätte keinen Bedeutung für die Redox-Regulation der PRK *in vivo*. Das positivere, mittlere Redox-Potential könnte dann eine schlüssige Erklärung für die ständige Aktivierung der PRK von *O. sinensis* liefern.

3.5 Untersuchung regulatorischer Proteinkomplexe des Calvin-Zyklus

Für die Chloroplasten höherer Pflanzen ist bekannt, dass zwei der Thiol-modulierten Enzyme auch über die lichtabhängige, reversible Bildung von Proteinkomplexen reguliert werden (Wedel *et al.*, 1997; Wedel und Soll, 1998). Das enzymatisch nicht aktive Protein CP12 bildet den Kern, mit dem die Proteine PRK und GAPDH einen ca. 560 kDa großen Proteinkomplex bilden, in dem die Enzyme keine Aktivität zeigen. Die Dissoziation der Enzyme aus diesem Komplex ist eine Voraussetzung für eine vollständige Aktivierung. Da diese Form der Regulation bei Cyanobakterien, Grünalgen und höheren Pflanzen konserviert ist (Wedel und Soll, 1998), wurde untersucht, ob diese Komplexe in Diatomeen an einer Regulation beteiligt sein könnten. Da keine Daten für Rotalgen, den Vorläufern der komplexen Plastiden von Kieselalgen, existierten, wurde auch dort die Existenz von regulatorischen Komplexen überprüft. Zur Stützung der Daten für die Diatomeen wurde eine weitere chromophytische Alge der Klasse Raphidophyceae analysiert.

Um zu überprüfen, ob sich jeweils ein stabiler PRK:CP12:GAPDH-Komplex nachweisen lässt, wurden entweder Gesamtzellextrakte (*Porphyridium purpureum,* Rhodophyceae; *Heterosigma carterae*, Raphidophyceae; *Phaeodactylum tricornutum* Bacillariophyceae) oder die stromale Fraktion gereinigter Chloroplasten (*O. sinensis* und *C. granii*, Bacillariophyceae) durch Größenausschlusschromatographie in einer Superdex-S300HR-Säule aufgetrennt. Die enzymatische Aktivität der PRK und GAPDH wurde in den gesammelten Aliquots der Chromatographie untersucht. Die Proteine wurden weiterhin nach Auftrennung der Fraktionen durch SDS-PAGE über Immunoblot-Analyse mit monospezifischen Antiseren gegen GAPDH, PRK und CP12 spezifisch nachgewiesen. Die Bestimmung der Molekulargewichte aus dem Retentionsverhalten der Proteine wurde über eine Kalibrierung im Bereich zwischen 443 kDa und 12,4 kDa vorgenommen. Da die Komplexe in belichteten Zellen gegenüber den freien Enzymen unterrepräsentiert sind, wurden die Zellen vor der Präparation der Extrakte für 10 Stunden verdunkelt und unter Grünlicht präpariert.

Die Analyse der Rotalge *Porphyridium purpureum* zeigte eine maximale enzymatische Aktivität von PRK und GAPDH bei einem Elutionsvolumen von 73 bis 76 ml (siehe Abb. 3-20.1 A). Dies entspricht einem Molekulargewicht von ca. 380 kDa und unterscheidet sich damit eindeutig vom Molekulargewicht einer homodimeren PRK (ca. 90 kDa) bzw. homotetrameren GAPDH (ca. 130 kDa). Auffällig war bei dieser Untersuchung, dass die Verteilung der Aktivität auf einen nicht so engen Bereich beschränkt ist wie bei anderen untersuchten Organismen.

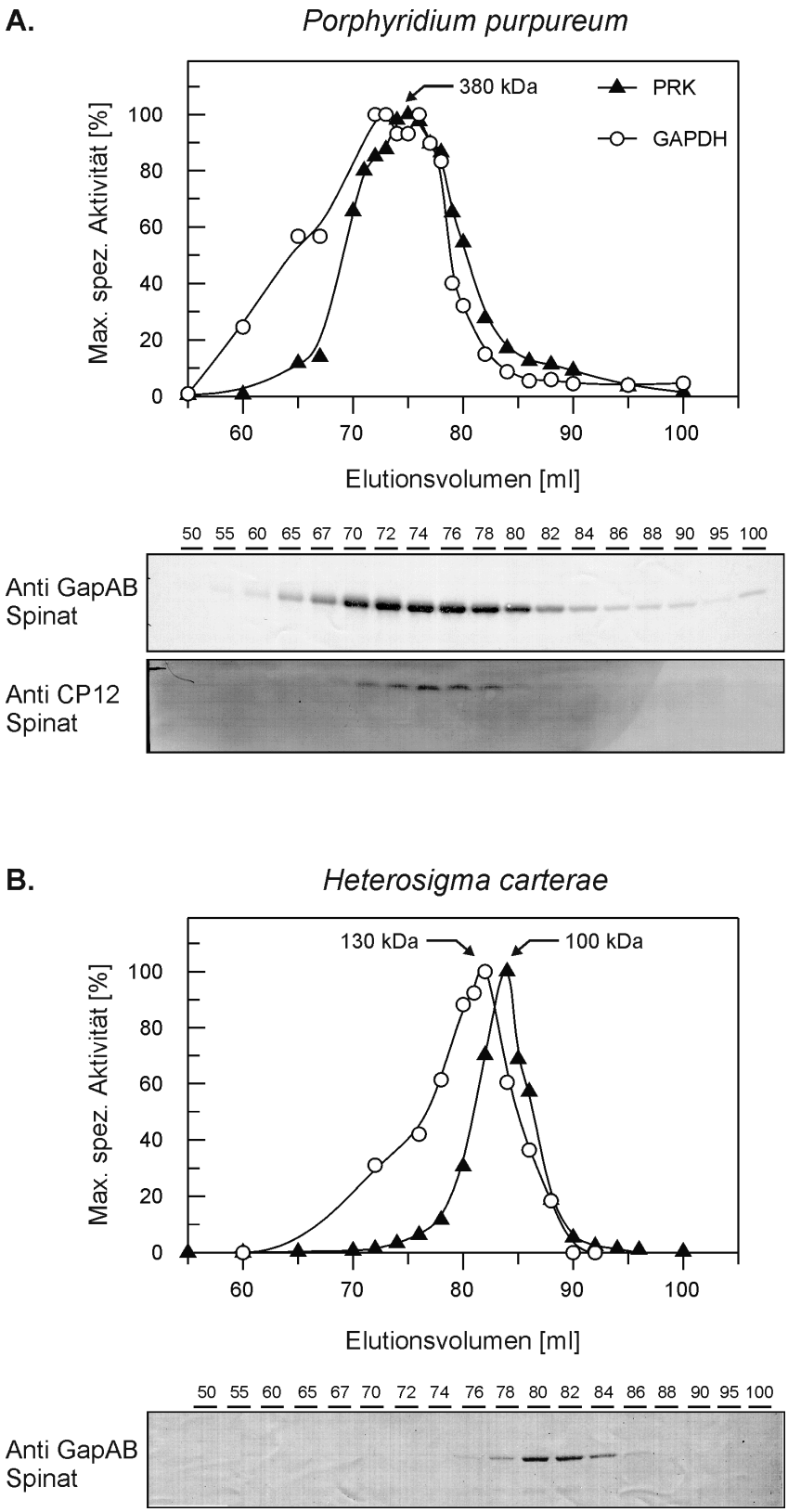


Abb. 3-20.1: Identifikation und Charakterisierung von regulatorischen PRK:CP12:GAPDH-Komplexen in der Rotalge *Porphyridium purpureum* und der Raphidophyceae *Heterosigma carterae.*

Die lösliche Fraktion von Gesamtextrakten der beiden Algen wurde auf einer SuperdexS300HR-Säule aufgetrennt. Die Fraktionen wurden auf die Aktivität der PRK und der GAPDH untersucht. Aliquots der Fraktionen wurden durch Präzipitation mit Trichloressigsäure konzentriert. Nach SDS-PAGE wurden die Proteine durch Western-Blot und Immunodekoration mit monospezifischen Antikörpern nachgewiesen (siehe 2.1.5).

Dies gilt vor allem für die GAPDH und ist wahrscheinlich eine Folge der relativ hohen Viskosität des aufgetragenen Zellextraktes, die aus einer hohen Konzentration an Phycobilisomen resultierte. Ähnliche Probleme ergaben sich auch bei der Analyse der Rotalge *Chondrus crispus* (Daten nicht gezeigt). Das gleiche Retentionsverhalten von PRK und GAPDH aus *P. purpureum* und das hohe apparente Molekulargewicht des gemeinsamen Aktivitäts-Maximums weist auf einen PRK:CP12:GAPDH-Komplex hin. Dies wird durch Western-Blot-Analysen bestätigt, durch die in den „Haupt"-Fraktionen sowohl die GAPDH als auch CP12 immunologisch nachgewiesen werden konnte (Abb. 3-20.1 A). Für die PRK konnte mit keinem der zur Verfügung stehenden heterologen Antiseren (siehe 2.1.5) ein Signal detektiert werden. Die Präsenz von CP12 ist ein weiterer Hinweis auf die Komposition des Komplexes aus PRK, GAPDH und CP12. Allerdings ist das beobachtete Molekulargewicht von 380 kDa ca. 70 kDa kleiner als für einen PRK:CP12:GAPDH-Komplex dieses Organismus erwartet. Dies kann ebenso ein Effekt der hohen Konzentration der Phycobilisomen sein.

Die Daten geben einen guten Hinweis für einen stabilen regulatorischen PRK:CP12:GAPDH-Komplex in der Rotalge *P. purpureum* und belegen, dass ebenso wie in den höheren Pflanzen, den Grünalgen und Cyanobakterien, dieser regulatorische Mechanismus in Rotalgen anscheinend konserviert ist.

Bei der Untersuchung der Raphidophyceae *Heterosigma carterae* zeigte sich hingegen kein Hinweis auf die Existenz eines Proteinkomplexes der Enzyme PRK und GAPDH. Die Enzyme zeigten ein eindeutig unterschiedliches Retentionsverhalten. Die GAPDH hatte eine maximale Enzymaktivität bei einem Elutionsvolumen von 81 ml entsprechend einem Molekulargewicht von 130 kDa und die PRK eluierte bei 85 ml entsprechend einem Molekulargewicht von ca. 100 kDa (siehe Abb. 3-20.1 B). Diese apparenten Molekulargewichte entsprechen den erwarteten Größen für eine homotetramere GAPDH bzw. eine homodimere PRK dieses Organismus. Das Elutionsverhalten der GAPDH konnte auch durch Western-Blot und immunologischen Nachweis bestätigt werden, wohingegen die PRK mit keinem der heterologen Antiseren nachgewiesen werden konnte. Für CP12 wurde in keiner der untersuchten Chromatographiefraktionen ein Signal detektiert.

Die Auftrennung stromaler Proteine der Kieselalgen *C. granii* und *O. sinensis* durch Gelchromatographie ergab ebenfalls keine Hinweise für einen PRK:CP12:GAPDH-Komplex in den Plastiden dieser Algen. Die PRK und GAPDH der beiden Diatomeen zeigten (Abb. 3-20.2 C und D) mit einer maximalen Enzymaktivität der GAPDH bei einem Elutionsvolumen

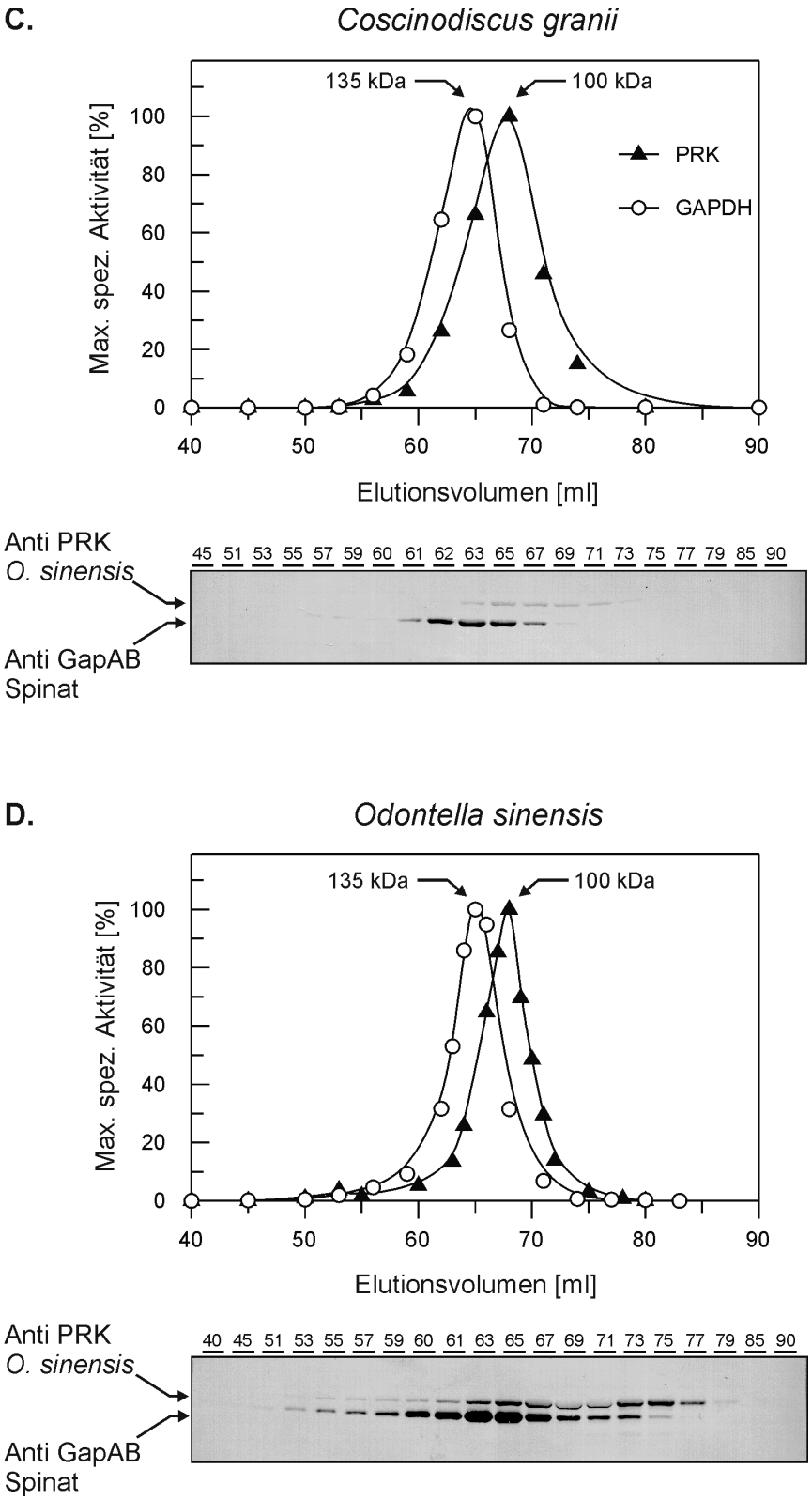


Abb. 3-20.2: Identifikation und Charakterisierung von regulatorischen PRK:CP12:GAPDH-Komplexen in den Diatomeen *Coscinodiscus granii* und *Odontella sinensis.*

Die Analyse wurde wie für 3-20.1 beschrieben durchgeführt, mit dem Unterschied, dass für beide Diatomeen die stromale Fraktion von gereinigten Chloroplasten durch Größenausschlusschromatographie aufgetrennt wurden. Unterschiede im Elutionsvolumen (vergl. 3-20.1, A-B und 3-20.2, C-D) resultieren aus einer neuen Packung der Chromatographie-Säule; die hier gezeigte Auftragung wurde entsprechend der Kalibrierung so angepasst, dass die Graphen jeweils den gleichen Molekulargewichtsbereich abdecken.

von 65 ml und der PRK bei 69 ml ein deutlich unterschiedliches Retentionsverhalten. Das durch die enzymatische Aktivität bestimmte Retentionsverhalten wird durch Western-Blot-Analysen und Immunodetektion für beide Proteine bestätigt. Die PRK-Signale von *O. sinensis* lassen allerdings zwei Maxima vermuten (Fraktion 65 und 75). Eine genauere Betrachtung zeigte jedoch, dass in den Fraktionen 67-73 die PRK von einem anderen Protein überlagert wird und so die Signale abgeschwächt werden. Unter Berücksichtigung dieses Effektes ist wahrscheinlich in der Fraktion 69 die größte Menge PRK vorhanden. Das aus dem Retentionsverhalten errechnete Molekulargewicht entspricht für beide Organismen dem einer homotetrameren GAPDH (ca. 135 kDa) bzw. einer homodimeren PRK (ca. 100 kDa). In keiner der Chromatographiefraktionen der beiden Kieselalgen konnte ein Signal mit dem Antikörper gegen CP12 detektiert werden.

Keine der drei untersuchten heterokontophytischen Algen, die beiden Diatomeen (*O. sinensis und C. granii*) und die Raphidophyceae (*H. carterae*), liefern unter diesen Bedingungen einen Hinweis für einen PRK:CP12:GAPDH-Komplex. Die Untersuchungen zeigen jedoch auch, dass die Rotalgen, die als Vorläufer der Plastiden dieser Algen gelten, diese Form der Regulation noch besitzen.

Organismus	Enzym	Aktivierung [Faktor]
C. granii	GAPDH	1,4
	PRK	1,5
O. sinensis	GAPDH	n.b.
	PRK	1,0
H. carterae	GAPDH	1,5
	PRK	1,0
P. purpureum	GAPDH	n.b.
	PRK	.1,6

Tab.: 3-3: Aktivierung der GAPDH und der PRK in den „Haupt“-Fraktionen der Gelchromatographie durch Reduktion mit DTT.
In den „Haupt“-Fraktionen der in Abbildungen. 3-20.1 und 3-20.2 gezeigten Gelchromatographien wurde nach Reduktion mit 50 mM DTT (15 Minuten bei RT) erneut die Enzymaktivität bestimmt. Aus den beiden Messungen wurden die Aktivierungs-Faktoren errechnet. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte aus 2 – 3 Fraktionen, die im Bereich des Aktivitätsmaximums lagen (n.b. = nicht bestimmt). Die Fehler sind nicht angegeben, diese lagen jedoch im Bereich von ± 10% der angegebenen Werte.

In den Diatomeen scheint also die PRK weder durch die Thiol-Modulation (siehe 3.2.1) noch durch den regulatorischen Enzymkomplex kontrolliert zu sein. Eine Untersuchung der reduktiven Aktivierung der PRK und GAPDH in den „Haupt“-Fraktionen der Chromatographien (siehe Tab. 3-3) bestätigte, dass die PRK der Diatomeen wahrscheinlich nicht Redox-reguliert wird. Die enzymatische Aktivität der Diatomeen-PRK steigt nur um einen Faktor von maximal 1,5, wohingegen die Thiol-modulierten Enzyme der höheren Pflanzen nach Reduktion mindestens eine Aktivierung um einen Faktor von 8 zeigen. Auch die PRK von *H. carterae* zeigt nach Reduktion keine Erhöhung der Enzymaktivität. Untersucht man die reduktive Aktivierung der GAPDH von Kieselalgen, so zeigt sich auch für dieses Enzym kein direkter Hinweis auf eine

Thiol-Modulation unter physiologischen Bedingungen. Dies gilt ebenso für *H. carterae*, deren GAPDH durch Reduktion mit DTT ebenfalls nur um einen Faktor von 1,4 bis 1,5 aktiviert wird.

3.6 Untersuchung der plastidären Fruktose-1,6-bisphosphatase (FbPase) und der Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SbPase)

Die plastidäre FbPase und SbPase sind Teil des regenerativen Zweigs des Calvin-Zyklus und beide Enzyme werden in höheren Pflanzen durch das Ferredoxin/Thioredoxin-System (Fd/Trx-System) reguliert. Die durch Thioredoxin vermittelte reduktive Aktivierung führt dort zu einem Anstieg der Enzymaktivität um einen Faktor von 10 bis 15 (Wolosiuk *et al.*, 1980; Nishizawa und Buchanan, 1981; Woodrow *et al.*, 1984; Faske *et al.*, 1995).

Für diese beiden Phosphatasen konnte in unbehandelten stromalen Extrakten von *C. granii* keine oder nur eine sehr geringe Aktivität bestimmt werden. Dies war unabhängig davon, ob die Extrakte aus belichteten oder verdunkelten Zellen präpariert wurden (Tabelle 3-4). Eine Behandlung der stromalen Extrakte mit 50 mM DTTred für 20 Minuten führte zu einer etwa 10fachen Stimulation der Aktivität beider Enzyme.

	Unbehandelt	Aktiviert
Enzym	µmol (h mg Chl.)$^{-1}$	µmol (h mg Chl.)$^{-1}$
FbPase	0	10,1 ±1,8
SbPase	2,5 ± 0,8	23,9 ± 3,2

Tab. 3-4: Stimulierung der Aktivität von FbPase und SbPase durch DTT im stromalen Extrakt aus *C. granii*.
Stromale Extrakte, unbehandelt oder nach Inkubation mit 50 mM DTT für 30 Minuten bei RT, wurden auf Aktivitäten der FbPase und der SbPase untersucht. Angegeben sind die Mittelwerte von 3 unabhängigen Messungen einer Plastiden-Präparation mit Standardabweichung.

Eine detailliertere Betrachtung der Aktivierung der FbPase durch DTT und den Einfluss von Trx-f sowie des Substrats (Mg^{2+}:FbP) auf die Aktivierungsgeschwindigkeit zeigt Abbildung 3-21. Die Inkubation stromaler Extrakte nur mit DTT zeigte eine langsame Aktivierung der FbPase. Eine Erhöhung der DTT-Konzentration auf 10 mM sowie die Zugabe von rekombinantem Trx-f (EK 10 µM) ergab keine signifikante Erhöhung der Aktivierungs-geschwindigkeit (Daten nicht gezeigt). Die Anwesenheit von FbP im Komplex mit Ca^{2+} (Ca^{2+}:FbP) führte zu einer drastischen Steigerung der Aktivierungsgeschwindigkeit. Fruktosebisphosphat im Komplex mit Ca^{2+} hat die gleichen Effekte wie das Substrat (Mg^{2+}:FbP) auf die Aktivierung, wird jedoch nicht durch den katalytischen Mechanismus der FbPase umgesetzt (Hertig und Wolosiuk, 1983; Faske *et al.*, 1995). Unter diesen Bedingungen zeigt auch Trx-f einen größeren Einfluss auf die Aktivierung. Diese Effekte sind noch deutlicher für höhere DTT und Trx-f Konzentrationen (10 mM und 10 µM). Die FbPase verhält sich damit im

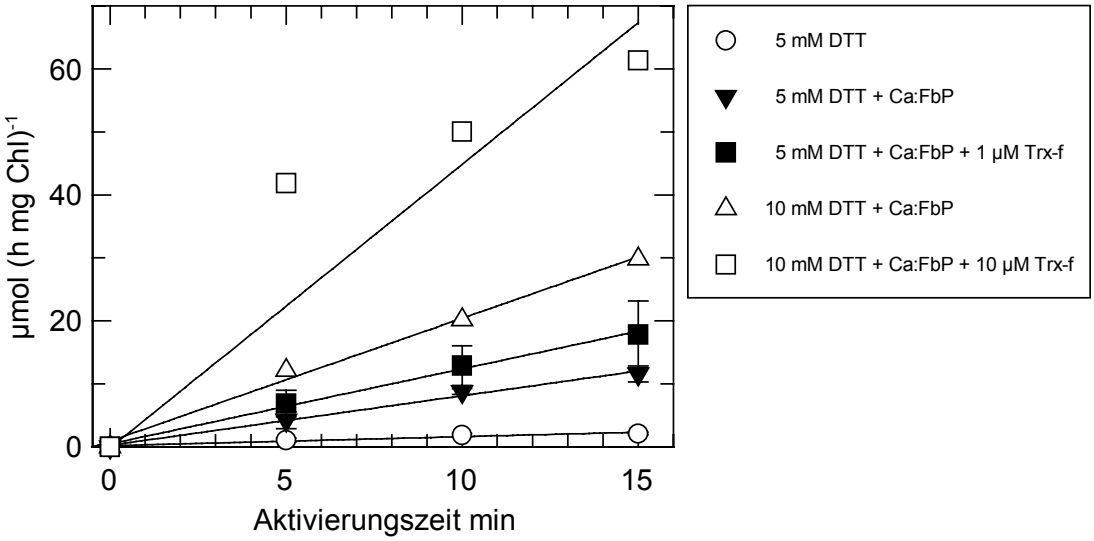


Abb. 3-21: Zeitverlauf der FbPase-Aktivierung durch DTTred und der Einfluss von FbP und Trx. Stromale Extrakte aus unabhängigen Präparationen, entsprechend 150 – 250 µg Chl./ml, wurden mit den angegebenen Konzentrationen von DTT, Trx-f und Ca:FbP inkubiert. Das Ca:FbP System hatte die Konzentrationen 5 mM FbP und 1 mM $CaCl_2$. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde die Aktivität bestimmt; zusätzlich war EGTA im Test vorhanden, um Ca^{2+} zu komplexieren. Mit Ausnahme der Kinetiken für 10 mM DTT entsprechen die Werte dem Mittelwert aus drei unabhängigen Messungen. Wenn keine Fehler angegeben sind, waren sie kleiner als das Symbol.

Bezug auf den aktivierenden Effekt von DTT und dem synergistischen Effekt von FbP auf die Aktivierung wie das Enzym der höheren Pflanzen (Wolosiuk *et al.*, 1980; Faske *et al.*, 1995). Die erhöhte Aktivierungsrate von DTT-reduziertem Thioredoxin im Vergleich zu der Rate, die mit gleichen Konzentrationen von DTT alleine erreicht wurde, liefert einen guten Hinweis dafür, dass der Effekt von DTTred durch Thioredoxin spezifisch verstärkt wird. Obwohl für die SbPase keine genaueren Untersuchungen durchgeführt wurden, deutet die Stimulation der Aktivität durch DTT auch für dieses Enzym auf eine Regulation über den Redox-Status des Enzyms hin (Tab. 3-4).

3.7 Untersuchung von Enzymen des oxidativen Pentosephosphat-Wegs in den Plastiden der Diatomeen

In den Plastiden der höheren Pflanzen gibt es neben dem reduktiven Pentosephosphat-Zyklus (Calvin-Zyklus) auch den oxidativen Pentosephosphat-Weg (OPPW). Der gleichzeitige Ablauf von Calvin-Zyklus und OPPW würde zu einer unproduktiven Reaktions-Sequenz führen (*engl.* futile cycling). Dies wird dadurch verhindert, dass die Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH), die die erste irreversible Reaktion des oxidativen Zweigs des OPPW katalysiert, durch Thiol-Modulation reguliert wird. Die plastidäre G6PDH wird während der Belichtung durch Trx reduziert und dadurch inhibiert (Wenderoth *et al.*, 1997; Wendt *et al.*, 1999). Da die PRK und die GAPDH der Diatomeen anscheinend nicht durch Thiol-Modulation und regulatorische Proteinkomplexe kontrolliert werden, wurde überprüft ob möglicherweise auch die Regulation der G6PDH verändert ist.

Erste Untersuchungen der stromalen Fraktion intakter Plastiden von *C. granii* zeigten, dass die Plastiden-Präparation nachweisbare Aktivitäten der G6PDH enthielt. Wie die Abbildung 3-22 zeigt, war die Aktivität der G6PDH in den Diatomeen-Präparationen jedoch nicht durch Reduktion beeinflussbar. Da die reduktive Inaktivierung eine charakteristischen Eigenschaft der plastidären G6PDH höherer Pflanzen ist [siehe Abb. 3-22 (Wenderoth *et al.*, 1997; Wendt *et al.*, 1999)], gab dies Grund zu der Annahme, dass die gemessene Aktivität auch eine Kontamination einer nicht plastidären Isoform sein könnte, zumal häufiges Waschen der Plastiden vor der Präparation des stromalen Extraktes zu einer Verringerung der spezifischen Aktivität der G6PDH führte (Daten nicht gezeigt).

Um dies zu testen, wurden intakte Chloroplasten von *C. granii* mit der Protease Thermolysin inkubiert. Da diese Protease nicht durch die Membran permeieren kann (Cline *et al.*, 1984), sind

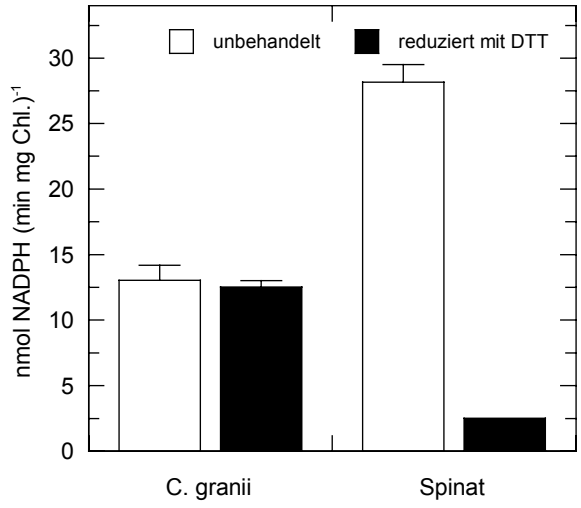


Abb. 3-22: Aktivität der G6PDH in isolierten nicht mit Protease behandelten Plastiden von *C. granii*.
Die stromale Fraktion intakter Plastiden wurde, wie unter 2.4.1 beschrieben, präpariert. Die Aktivität der G6PDH wurde in den Extrakten bestimmt, entweder ohne weitere Behandlung oder nach Reduktion mit 50 mM DTT für 15 Minuten bei RT. Dargestellt ist die spezifische Aktivität, bezogen auf Chlorophyll (Chl.). Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus drei Messungen mit Standardabweichung.

plastidäre Proteine vor der Proteolyse geschützt. Bei längerer Inkubation mit Thermolysin wird jedoch auch die Plastidenmembran zunehmend geschädigt, wodurch sie auch für Thermolysin keine Barriere mehr darstellt. Daher wurde die Inkubation der Diatomeen-Plastiden mit Thermolysin zunächst im zeitlichen Verlauf betrachtet (Abb. 3-23). Eine homogene Plastiden-Präparation einer für 10 Stunden verdunkelten Kultur wurde geteilt und jedes Aliquot für den angegebenen Zeitraum mit Thermolysin behandelt. Nach der angegebenen Inkubationszeit wurde die Protease-Reaktion durch den Entzug von Ca^{2+} gestoppt (Zugabe eines 2,5fachen molaren Überschusses EGTA). Darauf folgend wurden aus jedem Ansatz die intakten Plastiden und daraus die stromale Fraktion präpariert (siehe 2.4.3). Der gesamte Versuch wurde in Dunkelheit (schwaches Grünlicht) durchgeführt, um eine volle Aktivität der OPPW-Enzyme zu gewährleisten. Für jeden Zeitpunkt wurde die spezifische Aktivität der zwei für den OPPW charakteristischen Enzyme G6PDH und 6Phosphogluconat-Dehydrogenase (6PGDH) gemessen. Die Aktivität des stromalen Proteins PRK wurde als Referenz für den Schutz des Stromas vor der Protease bestimmt.

Beide Dehydrogenasen des OPPW werden durch Thermolysin angegriffen, wie die Abnahme der enzymatischen Aktivität belegt. Für die 6PGDH wurden im Vergleich zur G6PDH nur geringe Aktivitäten gefunden, die nach 10 Minuten Behandlung mit Thermolysin nicht mehr nachgewiesen werden konnten. Für die G6PDH konnte auch nach 45 Minuten noch enzymatische Aktivität bestimmt werden. Diese entsprach jedoch nur noch 8% der

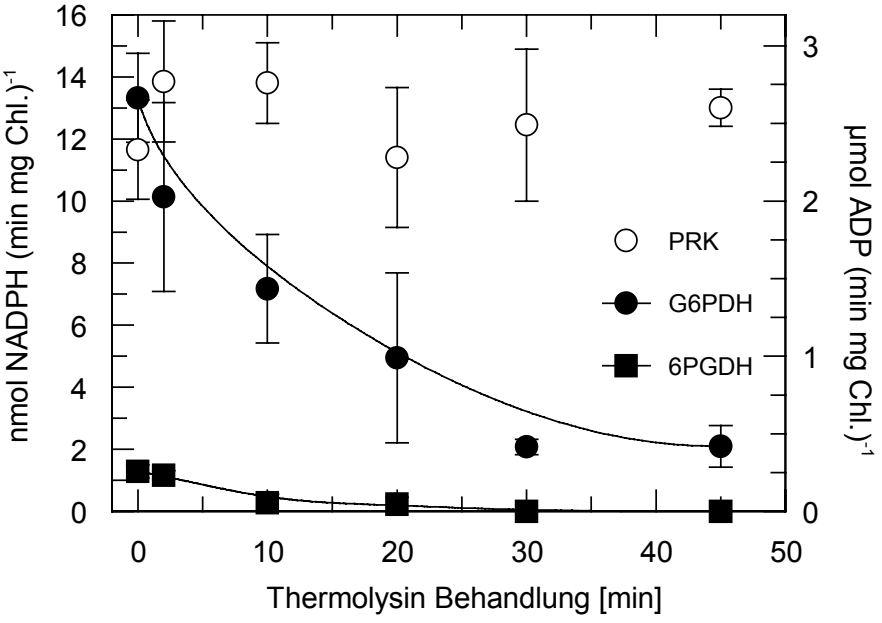


Abb. 3-23: Thermolysin-Behandlung von intakten Plastiden der Diatomee *C. granii* und der Effekt auf die Aktivitäten der Enzyme des oxidativen Pentosephosphat-Wegs (OPPW).
Die Chloroplasten wurden, wie im Text und unter 2.4.3 beschrieben, mit Thermolysin behandelt. Die Aktivitäten der Enzyme wurden durch die beschriebenen Tests (2.5.4) bestimmt. Jeder Datenpunkt entspricht dem Mittelwert aus zwei unabhängigen Messungen mit Standardabweichung. Wenn keine Fehler gezeigt sind, waren diese kleiner als das Symbol.

unbehandelten Probe. Nach 10 Minuten Inkubation konnte bereits nur noch 50% der anfänglichen Aktivität bestimmt werden. Dabei zeigte die Beobachtung der PRK-Aktivität, dass das Stroma über den gesamten Inkubationszeitraum durch die Plastidenmembranen vor der Protease geschützt bleibt. Im Rahmen der Fehler wurde keine Abnahme der spezifischen Aktivität der PRK beobachtet. In Kontrollexperimenten wurde zuvor bestätigt, dass die PRK, wenn sie der Protease direkt ausgesetzt wird, proteolytisch degradiert wird (Daten nicht gezeigt).

Die Abbildung 3-24 zeigt gleiche Untersuchungen für eine feste Inkubationszeit mit Thermolysin. Nach 30 Minuten Inkubation mit Thermolysin wird für die G6PDH von *C. granii* nur noch eine Restaktivität von 13% der unbehandelten Probe (spezifische Aktivität 13 mU/mg Protein) gefunden. Für die 6PGDH wurden nur noch 10% Restaktivität nach Thermolysin-Behandlung nachgewiesen, wobei die maximale Aktivität (1,2 mU/mg Protein) sehr viel niedriger war. Die Aktivität der PRK zeigt auch hier, dass die Protease nicht die Proteine des Stromas angreifen konnte. Tatsächlich wird die spezifische Aktivität der PRK durch die Protease-Behandlung erhöht anstatt erniedrigt. Die Erhöhung ist wahrscheinlich auf eine partielle Schädigung der Membranen zurückzuführen, die bei der folgenden Präparation der stromalen Fraktion zu einer besseren Ausbeute in der osmotische Lyse der intakten Plastiden führt.

Die Behandlung von intakten Spinat-Plastiden mit Thermolysin zeigt hingegen weder für die PRK, als Referenz für stromale Lokalisation, noch für die beiden Dehydrogenasen des OPPW

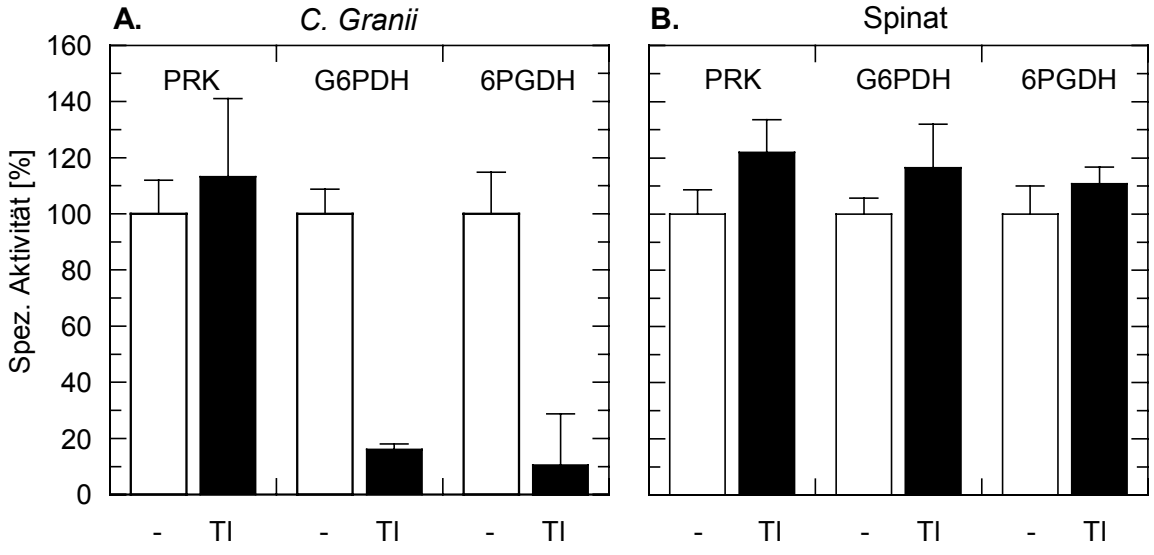


Abb. 3-24: Messung der enzymatischen Aktivität der G6PDH, 6PGDH und PRK nach Thermolysin-Behandlung der Chloroplasten von *C. granii* und Spinat.

Die Bedingungen entsprachen den unter Abb. 3-23 beschriebenen, mit der Ausnahme, dass die Thermolysin-Behandlung nur für 30 Minuten durchgeführt wurde. Gleiches gilt für die Messungen an Spinat-Plastiden. Angegeben ist für jedes Enzym % der spezifischen Aktivität nach Thermolysin-Behandlung (Tl, schwarze Balken), bezogen auf den stromalen Extrakt unbehandelter Plastiden (-, weiße Balken). Die dargestellten Daten entsprechen dem Mittelwert ± Standardabweichung. Diese wurden für. *C. granii* (**A)** aus mindestens 5 Messungen in drei unabhängigen Experimenten ermittelt sowie für Spinat (**B)** aus 3 Messungen in einem Experiment.

eine Verringerung der enzymatischen Aktivität. Vielmehr ist ein leichter Anstieg der Aktivität nach Protease-Behandlung zu beobachten, wie er auch für die PRK von *C. granii* beobachtet wurde. Wie oben bereits diskutiert, ist dies wahrscheinlich auf eine partielle Schädigung der Plastiden-Membran und die dadurch verbesserte Ausbeute in der osmotischen Lyse der Plastiden zurückzuführen. Diese Daten bestätigen die intraplastidäre Lokalisation der Enzyme des OPPW in den Spinat-Chloroplasten, wie sie bereits in mehreren Untersuchungen beschrieben wurde (Schnarrenberger *et al.*, 1973 und 1995; Stitt und Rees, 1980; Wendt *et al.*, 1999).

Die Daten geben im Zusammenhang einen klaren Hinweis darauf, dass in den Plastiden der Diatomeen wahrscheinlich keine der Dehydrogenasen des OPPW vorhanden ist und damit also auch während der Dunkelphase kein oxidativer Pentosephosphat-Weg in den Plastiden abläuft.

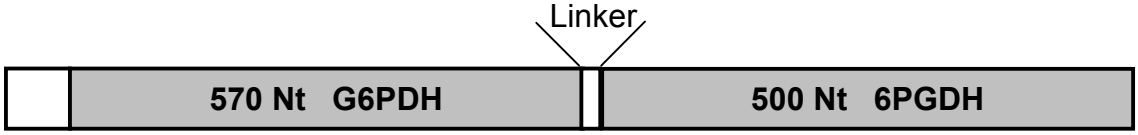
3.8 Untersuchung auf Isoformen der Glukose-6-phosphat-Dehydrogenase in Kieselalgen

Die Untersuchung von Enzymen des OPPW ergab eindeutige Hinweise für das Fehlen dieses Stoffwechselwegs in den Plastiden der Kieselalgen. Zur Überprüfung dieser Daten wurde auf molekularer Ebene nach G6PDH-Genen gesucht, um im weiteren deren Lokalisation zu untersuchen. Für höhere Pflanzen sind die beiden Isoformen der G6PDH, die plastidäre und die cytoplasmatische, aus verschiedenen Organismen bekannt (Nowitzky *et al.*, 1998; Wendt *et al.*, 1999 und 2000). Ausgehend von diesen Sequenz-Informationen wurde eine cDNA-Datenbank der Kieselalge *P. tricornutum* nach G6PDH-Genen durchsucht. Es wurde nur eine Sequenz mit einer großen Ähnlichkeit zu den G6PDH´s höherer Pflanzen gefunden. Die vollständige Sequenzierung des cDNA-Fragments [2,4 kB (Schroers, 2000)] zeigte, dass der 5´-Bereich der G6PDH-Sequenz fehlte. Um die Nukleotid-Sequenz dieses Bereichs zu erhalten, wurde eine Phagen-Bank der genomische DNA von *P. tricornutum* (Bhaja und Grossman, 1991) gesichtet. Die Sichtung erfolgte mit einer 240 Nukleotide langen Sonde des 5´-Bereichs der bekannten G6PDH-Sequenz. Mehrere positive Phagen-Klone (mit jeweils ca. 10 kB genomischer DNA-Sequenz) wurden isoliert. Ein 3 kB Subklon einer Phagen-Sequenz enthielt die genomische Sequenz des 5´-Bereichs des gesuchten G6PDH-Gens. Die Kombination der Sequenz-Informationen aus cDNA und genomischer DNA ergibt eine vorläufige Gen-Sequenz von 3713 Nukleotiden. Die cDNA- und genomische DNA-Sequenz überlappen über einen Bereich von ca. 1900 Nukleotiden. Durch den Vergleich der beiden Sequenz-Informationen wurden 3 Intron-Sequenzen identifiziert [75, 83 und 83 Nukleotide lang (siehe Anhang Abb. A-3B)]. Die cDNA besitzt einen 51 Nt langen untranslatierten 3´-Bereich mit einer 19 Nt langen PolyA$^+$-Sequenz.

Im 5´-Bereich konnten keine eukaryotischen Promotorsequenzen identifiziert werden. Durch RACE-PCR konnte gezeigt werden, dass das Transkript wahrscheinlich an Position 45 beginnt (persönliche Mitteilung O. Kilian). Daraus leitet sich ein Translations-Start an Position 241 des Gens ab. Die gesamte Sequenz kodiert für einen durchgängigen Leserahmen von 1039 Aminosäuren (Anhang, Abb. A3-B).

Der Leserahmen ist mit 1039 Aminosäuren für eine G6PDH, die in der Regel eine Größe von 520 bis 600 AS hat, sehr groß. Ein Vergleich der vom Leserahmen abgeleiteten Aminosäure-Sequenz zeigt innerhalb der ersten 570 N-terminalen Aminosäuren eine große Ähnlichkeit zu anderen pflanzlichen G6PDH´s (siehe Anhang, Abb. A3-C). Die darauf folgenden 500 Aminosäuren des C-terminalen Bereichs zeigen eine große Ähnlichkeit zu den 6PGDH´s anderer pflanzlicher Organismen. Der gesamte Leserahmen scheint also für zwei Enzyme des OPPW zu kodieren, die G6PDH und die 6PGDH, die nur durch einen kurzen Sequenzbereich von 25 AS voneinander getrennt sind (Linker).

Der Vergleich des G6PDH-Sequenzbereichs mit plastidären Isoformen höherer Pflanzen, die untereinander eine Identität von 72% haben, zeigt eine Sequenz-Identität von 38% (Abb. 3-25). Die Identität gegenüber cytosolischen Isoformen, die untereinander eine Identität von 85% zeigen, ist mit 41% nur unwesentlich höher. Diese Informationen geben keinen Hinweis auf eine mögliche zelluläre Lokalisation des Enzyms. Auch die Analyse der N-terminalen Sequenz ergibt keinen Hinweise für eine Präsequenz, die eine Signalfunktion für den subzellulären Proteintransport besitzt.



G6PDH	Plastide	Cytosol	Diatom
Plastide	72% (81%)	41% (79%)	38% (57%)
Cytosol		85% (92%)	41% (59%)

6PGDH	Plastide	Cytosol	Cytosol Phaeophy.	Diatom
Plastide	82% (88%)	70% (84%)	52% (65%)	51% (67%)
Cytosol		84% (93%)	56% (68%)	52% (67%)
Cytosol Phaeophy.			/	54% (67%)

Abb. 3-25: Schematische Darstellung der G6PDH/6PGDH-Sequenz von *P. tricornutum* und ihre Ähnlichkeit zu den Enzymen anderer pflanzlichen Organismen.

Details der Sequenz sind im Text angegeben und die Nukleotid- sowie die daraus abgeleitet Aminosäure-Sequenz befinden sich im Anhang Abbildung A3-B. Die für beide Enzyme angegebenen Sequenz-Identitäten und Ähnlichkeiten (in Klammern) wurden aus dem im Anhang gezeigten Sequenz-Vergleich (Abb. A3-C) berechnet. Angegeben sind jeweils die Mittelwerte für die Isoformen aus den Plastiden und dem Cytosol höherer Pflanzen. Die 6PGDH wurde auch noch mit der cytosolische Isoform einer Phaeophyceae (Cytosol Phaeophy.) verglichen.

Die plastidäre G6PDH höherer Pflanzen ist Thiol-moduliert. Die Untersuchung der Cysteine der G6PDH-Sequenz von *P. tricornutum* (siehe Anhang Abb. 3A-C) zeigt, dass nur eins der an der Regulation beteiligten Cysteine vorhanden ist; die anderen beiden vorhandenen Cysteine haben eine Position in der Sequenz, die vollkommen verschieden ist von der höherer Pflanzen. Ausgehend von diesen Daten ist das Enzym wahrscheinlich nicht Thiol-moduliert.

Vergleicht man den C-terminalen Sequenzbereich, der für die 6PGDH kodiert, so findet man eine gleiche Identität der Diatomeen-Sequenz zu den cytoplasmatischen Isoformen (52%) höherer Pflanzen wie zu den plastidären Isoformen (51%). Der Vergleich mit der cytosolischen 6PGDH der Phaeophyceae *Laminaria digita* zeigt eine ähnliche Identität (54%) der beiden Enzyme (Abb. 3-25; Cytosol Phaeophy.).

4 Diskussion

Die Fluktuation der Lichtintensität und anderer externer Faktoren, wie z.B. Verfügbarkeit von CO_2 und Stickstoff, sowie die Versorgung des Zellmetabolismus ergeben eine Vielzahl verschiedener Anforderungen an die Regulation des Calvin-Zyklus, um eine effiziente Photosynthese zu gewährleisten. Wegen ihrer Bedeutung für die Regulation des Calvin-Zyklus ist die Thiol-Modulation plastidärer Enzyme durch das Fd/Trx-System ein sowohl biochemisch als auch molekulargenetisch gut untersuchtes System (zusammengefasst in Buchanan, 1984; Ruelland und Miginiac-Maslow, 1999).

Neben der FbPase, SbPase, PRK und GAPDH, den regulierten Enzymen des Calvin-Zyklus (Ziegler und Ziegler, 1965; Wolosiuk und Buchanan, 1978; Crawford *et al.*, 1989), werden in den Plastiden höherer Pflanzen auch die $NADP^+$-abhängige Malat-Dehydrogenase [MDH (Scheibe und Anderson, 1981)] und die F_0F_1 ATPase (Nalin und McCarty, 1984; Schwarz *et al.*, 1997) durch Thioredoxin reguliert.

Frühere Untersuchungen an *Odontella sinensis* zeigten, dass die plastidäre ATPase der Diatomeen nicht Thiol-moduliert ist (Pancic und Strotmann, 1993; Kroth, 2000) und dass es dort wahrscheinlich keine Thiol-modulierte MDH-Isoform gibt (Mertens, 1997). Diese Untersuchungen gaben Anlass zu der Vermutung, dass die Thiol-Modulation plastidärer Enzyme in Kieselalgen eine andere Bedeutung hat oder sogar fehlt, da bis jetzt auch noch keine Gene für plastidäre Thioredoxine in Diatomeen gefunden worden sind (Kroth, 2000).

Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit haben gezeigt, dass sich in Kieselalgen auch die Thiol-Modulation von Enzymen des Calvin-Zyklus von der höherer Pflanzen unterscheidet. Weitere Untersuchungen von Zuckerphosphat-Stoffwechselwegen in den Diatomeen-Plastiden führten zur Identifizierung weiterer Unterschiede im Vergleich mit den Plastiden höherer Pflanzen. Anhand dieser Unterschiede läßt sich nicht nur die veränderte Regulation des Calvin-Zyklus in Diatomeen konsistent erklären, sondern auch die postulierte Bedeutung der Thiol-Modulation dieser Enzyme für die Regulation der Photosynthese in höheren Pflanzen untermauern.

4.1 Die Regulation des Calvin-Zyklus-Enzyms Phosphoribulokinase

Die Phosphoribulokinase (PRK, EC 2.7.1.19) katalysiert den letzten Schritt in der Regenerierung des primären CO_2-Akzeptors Ribulose-1,5-bisphosphat. Das Substrat dieser Reaktion Ribulose-5-phosphat kann sowohl durch die Reaktionen des Calvin-Zyklus als auch durch die des oxidativen Pentosephosphat-Weg (OPPW) gebildet werden. Da die Phosphorylierung durch die PRK irreversibel ist, bedarf es einer effizienten Regulation um die Richtung des Ru5P-Umsatzes zu kontrollieren. In höheren Pflanzen geschieht dies durch die Thiol-Modulation des Fd/Trx-Systems (Wolosiuk und Buchanan, 1978; Omnaas *et al.*, 1985; Porter *et al.*, 1986).

4.1.1 Die strukturellen und katalytischen Eigenschaften der PRK von *O. sinensis* sind typisch für eine eukaryotische PRK

Die aus der Nukleotid-Sequenz der PRK von *O. sinensis* (diese Arbeit und Genbank Y08610) abgeleitete Aminosäure-Sequenz zeigt erwartungsgemäß eine große Ähnlichkeit des reifen Proteins zu dem der höheren Pflanzen, Grünalgen, Cyanobakterien und Rotalgen [60% bis 70% Ähnlichkeit; 56% bis 62% Identität (siehe Anhang Abb. A3-A)]. Dem gegenüber beträgt die Sequenz-Ähnlichkeit zu den bakteriellen Enzymen weniger als 30% [Sequenz-Identität <15% (siehe Anhang Abb. A3-A)]. Das eukaryotische Enzym wird auch als „Klasse I"-PRK bezeichnet und so von den prokaryotischen „Klasse II"-Enzymen unterschieden.

Die bakteriellen und eukaryotischen Enzyme unterscheiden sich sowohl in der Größe der Untereinheiten als auch in der Quartär-Struktur des nativen Enzyms. Die PRK der prokaryotischen „Klasse I"-Enzyme ist ein Oktamer aus gleichen Untereinheiten, die jeweils ein Molekulargewicht von ca. 32 kDa haben (Martin und Schnarrenberger, 1997; Harrison *et al.*, 1998). Dem gegenüber ist das eukaryotische Enzym ein Homodimer aus ca. 45 kDa großen Untereinheiten (Porter *et al.*, 1986; Brandes *et al.* 1996; Martin und Schnarrenberger, 1997). Die Untersuchung der apparenten Molekulargewichte der nativen Diatomeen-PRK sowie ihrer denaturierten Untereinheiten weist eindeutig auf eine eukaryotische Enzym-Struktur hin. Für die Enzyme von *O. sinensis*, *C. granii* und *P. tricornutum* wurde jeweils ein Molekulargewicht von 100 kDa für das native Enzym bestimmt (Abb. 3-20.2 C und D), das aus Untereinheiten von ca. 45 kDa besteht (Abb. 3-10), entsprechend einem Homodimer. In den Untersuchungen einer anderen heterokontophyten Alge, der Raphidophyceae *Heterosigma carterae*, wurde eine homotetramere PRK beschrieben, bestehend aus Untereinheiten von 53 kDa (Hariharan *et al.*,

1998). Diese Daten konnten durch die in Abbildung 3-20.1 B dargestellten Untersuchungen der PRK von *H. carterae* nicht bestätigt werden. Für das native Enzym wurde ein apparentes Molekulargewicht von ca. 100 kDa bestimmt, entsprechend einem Homodimer. Hariharan und Mitarbeiter (1998) bestimmten dem gegenüber ein Molekulargewicht von 214 kDa, ein von allen anderen Untersuchungen abweichendes hohes Molekulargewicht der nativen PRK. Diese Unterschiede könnten aus der Verwendung unterschiedlicher Chromatographiematerialien oder einer fehlerhaften Kalibrierung resultieren. Da bis heute keine weiteren Hinweise für eine eukaryotische PRK mit einer homotetrameren Enzymstruktur beschrieben wurden, ist in Übereinstimmung mit den in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen eine homodimere Enzymstruktur für diese PRK anzunehmen.

Die Untersuchung der katalytischen Eigenschaften der heterolog exprimierten und gereinigten PRK von *O. sinensis* (siehe 3.3.1) zeigte zudem, dass das Enzym aus Diatomeen auch die typischen kinetischen Eigenschaften eukaryotischer PRK´s besitzt. Für beide Substrate, Ru5P und ATP, wurden hyperbolische Kinetiken beobachtet (Daten nicht gezeigt), ähnlich denen der PRK´s höherer Pflanzen (Anderson, 1973; Gardemann *et al.*, 1983; Milanez *et al.*, 1991; Brandes *et al.*, 1996; Hariharan *et al.*, 1998). Dies unterscheidet die eukaryotischen PRK´s von den bakteriellen Enzymen, deren sigmoidale Kinetik auf einen positiv kooperativen Effekt der beiden Substrate hinweist (Abdelal und Schlegel, 1974). Weiterhin entsprechen auch die bestimmten K_m-Werte für beide Substrate [ATP K_m = 84 nM, Ru5P K_m = 118 nM (siehe Tab. 3-1)] den Werten, die für andere eukaryotische PRK´s beschrieben wurden (Anderson, 1973; Gardemann *et al.*, 1983; Geck und Hartman, 2000). In Übereinstimmung mit dem kompetitiv inhibierenden Effekt von Ru-1,5-bP auf die pflanzlichen PRK´s (Gardemann *et al.*, 1983) spricht auch die für höhere Ru5P-Konzentrationen beobachtete Produkt-Hemmung für die Ähnlichkeit der PRK aus *O. sinensis* mit anderen eukaryotischen Enzymen.

4.1.2 Die PRK von Diatomeen wird in der Plastide nicht durch Thiol-Modulation kontrolliert, ist jedoch potentiell über den Redox-Status regulierbar

Die Untersuchungen an Spinat (Abb. 3-3 A) sprechen in Übereinstimmung mit anderen Literaturdaten (Anderson, 1973; Gardemann *et al.*, 1983) dafür, dass die unterschiedlichen Aktivitäten der PRK in belichteten und unbelichteten Spinat-Plastiden immer auf einen veränderten Redox-Zustand der PRK zurückgeführt werden können.

Obwohl die Untersuchungen der PRK-Aktivitäten in Diatomeen-Plastiden Unterschiede zwischen belichteten und unbelichteten Zellen zeigten, konnten diese nicht auf einen

erniedrigten Reduktions-Grad der PRK zurückgeführt werden (Abb. 3-3 A). Dies kann entweder durch ein auch im Dunkeln vollständig reduziertes Enzym erklärt werden oder aber durch ein Enzym, dessen Aktivität nicht durch den Redox-Zustand beeinflussbar ist. Letztere Möglichkeit konnte für das Diatomeen-Enzym durch Oxidations- und Reduktions-Untersuchungen ausgeräumt werden, die zeigten, dass die PRK durch Oxidation inaktiviert werden kann (Abb. 3-3 B und 3-4 A). Die Reversibilität der oxidativen Inaktivierung, wie sie durch die Untersuchung in Abbildung 3-4 belegt wird, weist zudem auf einen spezifischen, regulatorischen Effekt der Oxidation/Reduktion des Enzyms hin.

Die PRK der Diatomeen scheint also potentiell über den Redox-Status des Enzyms regulierbar, obwohl das Enzym in der Plastide anscheinend nicht durch Oxidation inaktiviert wird. Die prinzipielle Möglichkeit zur Regulation durch den Redox-Status wurde zuvor bereits für die gereinigte PRK aus einer anderen heterokontophyten Alge, *Heterosigma carterae*, gezeigt (Hariharan *et al.*, 1998). In dieser Untersuchung wurde jedoch nicht überprüft, ob das Enzym in der Zelle reguliert wird.

Wie die PRK der Diatomeen über den Redox-Zustand reguliert wird und wieso das Enzym in der Zelle im Dunkeln nicht durch Oxidation inaktiviert wird, wurde im weiteren an der gereinigten PRK der Diatomee *O. sinensis* untersucht (siehe 4.1.4 und 4.1.5).

4.1.3 Die Expression der Diatomeen-PRK wird durch Licht reguliert

Neben der posttranslationalen Regulation plastidärer Enzyme durch das Fd/Trx-System besitzen Pflanzen weiterhin verschiedene Mechanismen, um die Genexpression in Abhängigkeit von Licht zu regulieren. So wurden verschiedene Photorezeptoren identifiziert, die die Expression von Genen kontrollieren (Mustilli und Bowler, 1997). Unabhängig von diesen kann die Photosynthese selbst auch die Expression von Genen regulieren. So ist wahrscheinlich der Redox-Zustand des Plastochinon-Pools an der Expressionskontrolle von kernkodierten Enzymen beteiligt (Karpinski *et al.*, 1997; Lemaire *et al.*, 1999). In mehreren Untersuchungen wurde gezeigt, dass auch die Transkript-Menge der PRK durch Licht beeinflusst wird (siehe zur Übersicht: Martin *et al.*, 2000). Eine neuere Untersuchung zeigt, dass in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* die Transkript-Mengen der PRK und der Enzyme des Fd/Trx-Systems durch Licht und den circadianen Rhythmus kontrolliert werden (Lemaire *et al.*, 1999).

Immunologische Quantifizierungen der PRK-Menge in der vorliegenden Arbeit zeigten, dass die Konzentration der PRK in den Plastiden der Kieselalgen nach Beginn der Belichtungsphase schnell ansteigt (Abb. 3-5). Dabei war die maximale PRK-Menge, die nach ungefähr 2,5 Stunden

erreicht wurde, etwa um den Faktor 3 höher als in Zellen, die für 10 Stunden nicht belichtet wurden (Abb. 3-5 B). Die Analyse der Transkript-Menge des PRK-Gens in Diatomeen durch semiquantitative RT-PCR ergab zudem Hinweise für eine Zunahme der PRK-Transkripte nach dem Beginn der Belichtung (Daten nicht gezeigt).

Die Expression der PRK ist also auch in den Kieselalgen durch Licht oder einen durch Licht gesteuerten Faktor reguliert, wobei diese Regulation wahrscheinlich auf Ebene der Transkription wirkt. Die aus dieser Regulation resultierenden Veränderungen der PRK-Menge können die Unterschiede der Enzymaktivitäten zwischen belichteten und unbelichteten Plastiden (siehe Abschnitt 4.1.2 und Abb. 3-3) erklären und damit bestätigen, dass diese Unterschiede nicht auf einen veränderten Redox-Status der PRK beruhen.

4.1.4 Die Redox-Regulation der PRK aus *O. sinensis* gleicht mechanistisch der PRK-Regulation in höheren Pflanzen

Der Vergleich der Aminosäure-Sequenz der PRK aus *O. sinensis* mit den Enzymen aus höheren Pflanzen zeigte, dass die Diatomeen-PRK ebenso wie die Enzyme höherer Pflanzen 4 Cysteine besitzt (Abb. 3-6 und Anhang Abb. A3-A). Die beiden N-terminalen Cysteine (Cys 19 und 63 in der Sequenz von *O. sinensis*) sind in allen eukaryotischen PRK´s konserviert. Es wurde gezeigt, dass diese Cysteine (Cys 16 und 55 in der Spinat-Sequenz) die Thiol-Modulation vermitteln (Krieger *et al.*, 1987; Porter *et al.*, 1988; Milanez *et al.*, 1991; Brandes *et al.*, 1996). Die oxidative Inaktivierung der Spinat-PRK resultiert dabei aus der Bildung einer intramolekularen Disulfid-Brücke zwischen diesen Cysteinen (Porter *et al.*, 1986 und 1988). Die beiden weiteren C-terminalen Cysteine (nach der Spinat-Sequenz die AS 244 und 250) haben keine Bedeutung für die Regulation eukaryotischer PRK´s (Milanez *et al.*, 1991; Brandes *et al.*, 1996a und b).

Die oben erläuterten Versuche (siehe 4.1.2) gaben nur einen Hinweis darauf, dass die PRK von *O. sinensis* über den Redox-Status des Enzyms reguliert werden kann. Genauere Untersuchungen der oxidativen Inaktivierung am gereinigten Enzym, wie sie in den Abbildungen 3-11 und 3-12 dargestellt sind, führten zu der Schlussfolgerung, dass diese aus der Bildung einer einzigen intramolekularen Disulfid-Brücke pro katalytischer Untereinheit resultiert. Diese Schlussfolgerung resultierte aus drei Beobachtungen. Erstens entspricht die Stöchiometrie der Inaktivierung mit DTNB einer Reaktion, die zur Bildung eines Disulfids führt, d.h. pro Mol DTNB werden 2 Mol TNB^{2-} freigesetzt (Abb. 3-11). Zweitens wird für die vollständige Inaktivierung eines Mols PRK-Untereinheiten 1 Mol DTNB verbraucht,

entsprechend einer Disulfid-Brücke pro Untereinheit (Abb. 3-11). Drittens zeigten die Untereinheiten des oxidierten Enzyms unter denaturierenden, eine Disulfid-Brücke nicht beeinflussenden Bedingungen das Molekulargewicht einer monomeren Untereinheit (Abb. 3-12). Dem entsprechend ist das Disulfid im oxidierten Enzym intramolekular. Das durch DTNB oxidierte Enzym konnte durch Reduktion mit DTT und auch mit reduziertem Trx (in Anwesenheit von DTT, um Trx in der reduzierten Form zu halten) wieder aktiviert werden (Abb. 3-4, Kapitel 3.3.4). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass DTNB, obwohl es kein physiologisches Oxidationsmittel ist, das gleiche Produkt liefert wie die Oxidation der PRK *in vivo*. Diese Beobachtungen stimmen mit den für die Spinat-PRK beschriebenen Ergebnissen überein (Porter *et al.*, 1986 und 1988), durch die erstmals die Thiol-Modulation der PRK auf die Bildung eines Disulfids zurückgeführt werden konnte.

Die genauere Untersuchung der Reaktivierung von oxidierter Diatomeen-PRK zeigte im Vergleich zum Spinat-Enzym jedoch wichtige Unterschiede. Die Inkubation mit den Trx-Isoformen m bzw. f aus Spinat zeigte keine eindeutige Aktivierung, während das bakterielle Trx aus *E. coli* zu einer klaren Aktivierung der PRK führte (Daten nicht gezeigt). Die Reaktivierung oxidierter Spinat-PRK erfolgte dagegen erwartungsgemäß sowohl durch Trx-m als auch Trx-f. Dabei führte Trx-m zu einer größeren Aktivierung als Trx-f (Daten nicht gezeigt). Es wurde früher davon ausgegangen, dass die PRK *in vivo* durch Trx-f aktiviert wird. Spätere Untersuchungen zeigten, dass Trx-m die PRK besser aktivieren kann als die Isoform f, wobei V_{max} der Aktivierung durch Trx-m um den Faktor 2 größer war als für Trx-f (Geck und Hartman, 2000).

Warum die beiden Thioredoxine von Spinat keinen großen Einfluss auf die Aktivierung der PRK von *O. sinensis* haben ist nicht offensichtlich. Möglicherweise könnten Unterschiede der Diatomeen-PRK im Interaktions-Bereich mit Trx dafür verantwortlich sein, dass heterologe Thioredoxine das Enzym nicht mehr aktivieren können. Bis jetzt wurden verschiedene Aminosäuren identifiziert, die für die Wechselwirkung der Thioredoxine mit den Zielenzymen wichtig sind (Hermoso *et al.*,1996 und 1999; Geck *et al.*, 1996; Wangensteen *et al.*, 2001), allerdings sind noch keine plastidären Thioredoxine aus Kieselalgen bekannt, die einen Vergleich erlauben würden.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde sowohl durch biochemische als auch molekulargenetische Ansätze versucht, ein Thioredoxin aus den Kieselalgen zu identifizieren (Daten nicht gezeigt). Es konnte ein cDNA-Fragment mit dem abgeleiteten Sequenzmotiv NCGPCR identifiziert werden, welches dem Motiv des aktiven Zentrums bekannter pflanzlicher Thioredoxine entspricht [$WCGPC^{K}/_{R}$ (Chivers *et al.*, 1996)]. Da der Rest der Sequenz jedoch nur

geringe Ähnlichkeit mit pflanzlichen Thioredoxinen hat, ist es fraglich, ob es sich tatsächlich um ein Thioredoxin handelt oder um eine noch nicht bekannte Thiol/Disulfid-Oxidoreduktase. Da die FbPasen und SbPasen der Diatomeen anscheinend Thiol-moduliert sind (siehe 4.4), ist jedoch davon auszugehen, dass es in den Plastiden der Algen Thioredoxine gibt. In den Rotalgen, aus deren Vorläufern die Plastiden der Diatomeen entstanden, findet man sogar noch ein Gen für eine Trx-Isoform (m-Typ) auf dem Plastiden-Genom.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit sprechen dafür, dass die PRK von *O. sinensis* ebenso wie die höherer Pflanzen durch den Redox-Status reguliert werden kann. Es konnte jedoch auch gezeigt werden, dass das Enzym in der Plastide immer in der reduzierten, aktiven Form vorliegt (siehe 4.1.2). Die Thiol-Modulation der PRK fehlt möglicherweise auch in der Rotalge *Galdieria sulphuraria* (persönliche Mitteilung Roland Krauss, Institut für Pflanzenphysiologie Universität Osnabrück). Für die Cyanobakterien *Synechocystis* PCC6803 und *Synechococcus* PCC7942 wurde das Fehlen der Thiol-Modulation der PRK bereits beschrieben (Tamoi *et al.*, 1998). Den PRK´s dieser Organismen ist im Vergleich zum Enzym höherer Pflanzen ein veränderter Abstand zwischen den regulatorischen Cysteinen gemeinsam. So findet man bei den Cyanobakterien eine Deletion von 22 Aminosäuren und bei der Rotalge *G. sulphuraria* eine Deletion von 12 Aminosäuren (Abb. 3-6). Das Enzym von *O. sinensis* besitzt dem gegenüber eine Insertion von 5 Aminosäuren zwischen den Cysteinen (Abb. 3-6). Diese Unterschiede haben möglicherweise einen Einfluss auf das Redox-Verhalten dieser Cysteine (Wadano *et al.*, 1995; Tamoi *et al.*, 1998), indem durch eine leicht veränderte Faltung des Proteins die Bildung eines Disulfids durch sterische Faktoren beeinflusst wird oder andere Aminosäuren im Bereich der Cysteine zu einer Veränderung der Mikro-Umgebung führen. Beide Möglichkeiten können das Redox-Potential der Cysteine beeinflussen (Chivers *et al.*, 1997a) und dadurch die regulatorischen Eigenschaften des Proteins verändern.

4.1.5 Ein verändertes Redox-Potential ist wahrscheinlich die Ursache für eine permanente Aktivierung der PRK aus *O. sinensis in vivo*

Die am besten untersuchten Dithiol/Disulfid Redox-Reaktionen sind die der Thiol/Disulfid-Oxidoreduktase-Familie. Diese Proteine, zu denen auch Thioredoxin gehört, besitzen alle ein aktives Zentrum mit dem Sequenzmotiv CysXaaXaaCys (CXXC). Abhängig von den Aminosäuren zwischen den Cysteinen kann das Motiv sehr reduzierend sein, wie in Thioredoxin (*E. coli* E°´ = -270 mV), relativ oxidierend, wie im DsbA-Protein (*E. coli*, E°´ = -90 mV) oder das Motiv hat ein Redox-Potential mittlerer Größe (E°´ = -180 mV), wie die Protein-Disulfid-

Isomerase der Ratte (Chivers *et al.*, 1997a). Weitere Untersuchungen zeigten, dass das Redox-Potential der Proteine durch gezielte Veränderungen der Aminosäuren zwischen den Cysteinen verändert werden kann (Grauschopf *et al.*, 1995; Chivers *et al.*, 1996; Mössner *et al.*, 1999). Dies zeigt klar, dass das Redox-Potential von Redox-aktiven Cysteinen durch die Protein-Umgebung beeinflusst wird. Anders als bei den Oxidoreduktasen, deren Cysteine in der Primär-Sequenz benachbart sind, kommen die regulatorischen Cysteine der PRK erst durch die dreidimensionale Faltung des Proteins in Nachbarschaft. Es ist daher nicht offensichtlich, welche Aminosäuren einen Einfluss haben können und ob eine veränderte Aminosäure-Sequenz einen Einfluss auf das Redox-Verhalten der Cysteine hat.

Um zu testen, ob die Unterschiede in der Aminosäure-Sequenz der PRK von *O. sinensis* zu einem veränderten Redox-Potential der Cysteine führen, wurde dieses durch die Methode der Redox-Gleichgewichts-Titration bestimmt (Hutchinson und Ort, 1995). Da für die Bestimmung vergleichbarer mittlerer Redox-Potentiale (E_m) einige experimentelle Voraussetzungen erfüllt sein müssen (für Details siehe 3.4.1.1 und 3.4.1.2), wurde das System zunächst an der PRK von Spinat etabliert, für die bereits die thermodynamischen Eigenschaften des Thiol/Disulfid-Austauschs beschrieben sind (Hirasawa *et al.*, 1998 und 1999).

Die Redox-Titration der Spinat-PRK unter den zuvor optimierten Bedingungen (siehe Abb. 3-13 und 3-15) und bei einem pH-Wert von 7.0 zeigte eine monophasische Abhängigkeit der Enzymaktivität vom E_h des Redox-Puffers (Abb. 3-16). Die Daten ließen sich am besten durch eine Nernst-Funktion für einen Zwei-Elektronentransfer beschreiben, wie es für die Reduktion einer Disulfidbrücke zu erwarten ist. Durch Anpassung der experimentellen Daten an die Nernst-Funktion wurde ein mittleres Redox-Potential (E_m) von –289 ± 4 mV für die regulatorischen Cysteine der Spinat-PRK bestimmt. Dieser Wert ist experimentell nicht von dem für die Spinat-PRK bereits beschriebenen E_m-Wert von –295 ± 10 mV zu unterscheiden (Hirasawa *et al.*, 1998 und 1999; persönliche Mitteilung Prof. Dr. D. Knaff, TexasTech Universität USA) und belegt, dass die Bedingungen der Redox-Titration für die Bestimmung aussagefähiger und vergleichbarer E_m-Werte geeignet sind.

Die Redox-Titration der PRK von *O. sinensis* zeigte im physiologischen pH-Bereich zwischen pH 7.0 und 8.0 eine biphasische Abhängigkeit der Enzymaktivität vom Redox-Potential (E_h) des Redox-Puffers (Abb. 3-18). Dies deutet auf zwei Dithiol/Disulfid-Paare mit verschiedenen E_m-Werten hin. Ein solches Verhalten wurde bisher nur für die FbPase von Erbse bei niedrigeren pH-Werten (< pH 7.0) beschrieben (Hirasawa *et al.*, 1999). Die Anpassung der experimentellen Daten an die Nernst-Funktion für einen Zwei-Komponenten Zwei-Elektronentransfer erlaubte die Bestimmung der E_m-Werte für beide Komponenten (Abb. 3-18

und 3-19). Die ermittelten E_m-Werte bei pH 7.0 unterschieden sich mit –327 mV (E_m1) und –257 mV (E_m2) eindeutig vom Wert für die Spinat-PRK (-289 mV).

Die genauere Betrachtung dieser E_m-Werte zeigte, dass die Komponente mit dem negativeren Potential (E_m1) bei allen pH-Werten annähernd das gleiche Potential besitzt wie DTTred [$E°'_{DTT}$ = -327 mV (Abb. 3-19)]. Das weist auf einen Konzentrations-Effekt von DTTred hin, d.h. die Aktivität des Enzyms ist abhängig von der DTTred-Konzentration und nicht vom E_h des Redox-Puffers. Dies wurde auf die Stabilisierung eines gemischten Dimers zwischen reduziertem DTT und dem oxidierten Enzym zurückgeführt (siehe 3.4.2.2). Ein solches Dimer kann im ungünstigen Fall bei der Redox-Titration auftreten (persönliche Mitteilung Prof. Dr. D. Knaff und A. Setterdahl, TexasTech Universität, USA) und das daraus resultierende Redox-Potential hätte, da es artifiziell ist, keine physiologische Bedeutung. Das Potential von E_m1 wäre auch nicht mit den anderen Beobachtungen vereinbar, die zeigten, dass die PRK in den Plastiden von Diatomeen immer voll reduziert vorliegt (siehe 4.1.2). Wie durch die Abbildung 4-1 gezeigt wird, wäre ein Disulfid mit dem Potential von E_m1 nur sehr schwer reduzierbar. Unter der Annahme, dass die plastidären Thioredoxine der Diatomeen ein ähnliches Redox-Potential wie

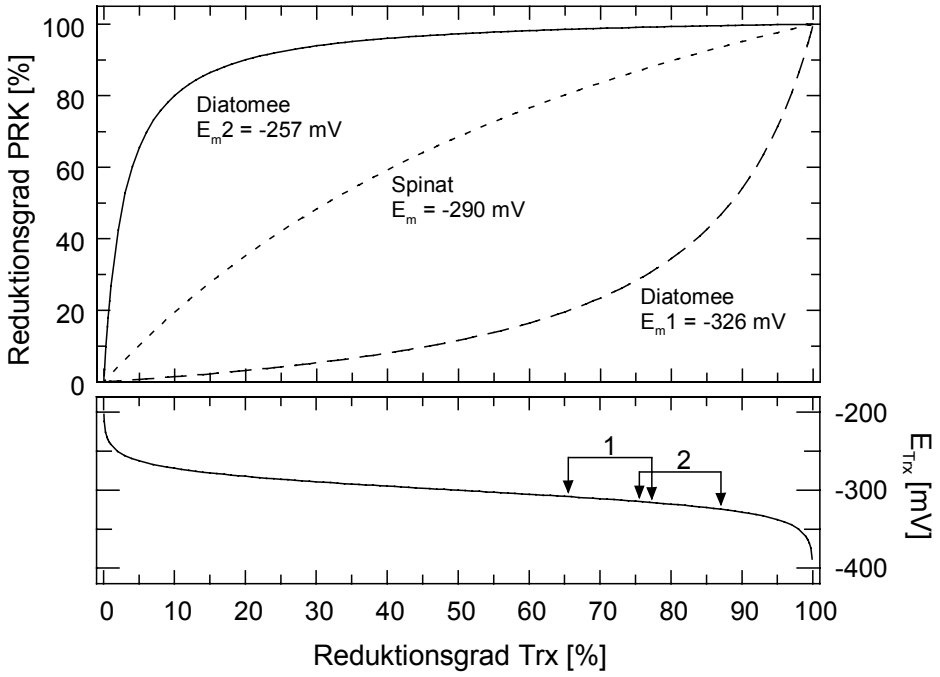


Abb. 4-1: Reduktions-Grad von Enzymen mit verschiedenen E_m-Werten unter physiologisch möglichen Redox-Bedingungen.

Die physiologisch möglichen Redox-Potentiale wurden auf Grundlage des bekannten mittleren Redox-Potentials von Trx-m [-300 mV (Hirasawa *et al.*, 1998 und 1999)] für alle Reduktionsgrade des Thioredoxins berechnet (unterer Teil der Graphik). Für jedes mögliche Redox-Potential des Trx-Systems wurde über die Nernst-Funktion der theoretische Reduktions-Grad der regulatorischen Cysteine des Enzyms bestimmt (oberer Teil der Graphik). Für diese Berechnung wurden die unter 3.4.1.3 (Abb. 3-17) für das Spinat-Enzym und unter 3.4.2.2 (Abb. 3-19) für die Diatomeen-PRK bestimmten mittleren Redox-Potentiale (E_m) zugrunde gelegt. Die im unteren Teil markierten Bereiche kennzeichnen die in belichteten Plastiden nachgewiesenen Reduktions-Grade von Trx-m (1. Scheibe, 1981; 2. Crawford *et al.*, 1989).

in Spinat besitzen [m-Typ = -300 mV und f-Typ = -290 mV (Hirasawa *et al.*, 1999; Knaff, 2000)], müssten ca. 90% bis 95% des Thioredoxins reduziert sein, um die Hälfte der Enzyme zu reduzieren (Abb. 4-1). Untersuchungen des Reduktions-Grades von Thioredoxin in belichteten Plastiden aus Spinat zeigen jedoch nur einen Anteil von 67% bis 87% reduziertem Trx-m [Abb. 4-1 (Scheibe, 1981; Crawford *et al.*, 1989)].

Das zweite mittlere Redox-Potential (E_m2) der Diatomeen-PRK ist mit –257 mV (bei pH 7.0) sehr viel positiver als das Redox-Potential der Spinat PRK [-295 mV (Hirasawa *et al.*, 1998 und 1999)]. Dieser Unterschied ist auch bei den pH-Werten 7.5 und 8.0 zu beobachten. Das Potential von E_m2 ist auch mit einer in den Plastiden immer vollständig reduzierten PRK vereinbar (siehe 4.1.1), da ein Disulfid mit einem solchen Potential leicht reduziert werden kann. Die Hälfte der Disulfide wäre bereits bei 3% reduziertem Trx-m reduziert (Abb. 4-1), wohingegen das Spinat Enzym diesen Reduktions-Grad erst bei 40% reduziertem Trx erreichen könnte. Ein Enzym, dessen regulatorische Cysteine ein so positives Redox-Potential haben, könnte somit auch in unbelichteten Plastiden immer komplett reduziert vorliegen. Selbst die PRK von Spinat mit dem negativeren Redox-Potential ist in unbelichteten Plastiden nicht vollständig oxidiert. Im Vergleich zu belichteten Plastiden findet man im Dunkeln noch 15% der maximalen enzymatische Aktivität (Gardemann *et al.*, 1983).

Damit ergibt sich für die Regulation der PRK von *O. sinensis* folgendes Bild: 1. Die PRK von *O. sinensis* ist potentiell durch die reversible Bildung eines Disulfids regulierbar, ebenso wie das Enzym der höheren Pflanzen (siehe 4.1.2 und 4.1.4). 2. Durch die veränderten Redox-Eigenschaften der regulatorischen Cysteine (siehe oben) liegt das Enzym unter physiologischen Bedingungen jedoch in belichteten wie in unbelichteten Zellen im reduzierten Zustand vor. 3. Das niedrige Redox-Potential resultiert wahrscheinlich aus einer veränderten Mikro-Umgebung der Cysteine oder sterischen Faktoren, die sich aus dem veränderten Abstand zwischen den Cysteinen ergeben. 4. Dem entsprechend hat die Thiol-Modulation der PRK keine Bedeutung für die Kontrolle des Calvin-Zyklus in den Plastiden der Diatomeen

4.2 In den Plastiden der Diatomeen lassen sich keine regulatorischen PRK:CP12:GAPDH-Komplexe nachweisen

Die Enzymaktivität der plastidären PRK und GAPDH kann durch regulatorische Enzym-komplexe in Abhängigkeit von Licht reguliert werden. Die Bildung des PRK:CP12:GAPDH-Komplexes wird durch das kleine, enzymatisch inaktive Protein CP12 vermittelt (Wedel *et al.*, 1997, Wedel und Soll, 1998). Diese regulatorischen Enzymkomplexe wurden bis jetzt in allen untersuchten pflanzlichen Organismen nachgewiesen (Wedel und Soll, 1998), unter anderem

auch in Cyanobakterien, deren PRK nicht durch Thiol-Modulation reguliert wird (Tamoi *et al.*, 1998). Der regulatorische Enzymkomplex stellt damit eine von der Thiol-Modulation unabhängige, alternative Form der lichtabhängigen Regulation dar und könnte die PRK der Diatomeen regulieren.

Die Untersuchung der Kieselalgen *C. granii*, *O. sinensis* (Abb. 3-20.2 C und D) und *P. tricornutum* (Daten nicht gezeigt) ergab keinen Hinweis auf einen PRK:CP12:GAPDH-Komplex. Die für die PRK und GAPDH bestimmten Molekulargewichte entsprechen einer homodimeren bzw. homotetrameren Enzymstruktur und sind mit 100 kDa, bzw. 135 kDa eindeutig kleiner als der Enzymkomplex. Die Untersuchung einer weiteren heterokontophyten Alge, der Raphidophyceae *H. carterae*, ergab auch für diese Algen keinen Hinweis auf regulatorischen PRK:CP12:GAPDH-Komplex (Abb. 3-20.1 B). Durch diese Untersuchungen ist nicht mit Sicherheit auszuschliessen, dass es Enzymkomplexe in den Algen gibt, da der Komplex während der Präparation und der Chromatographie dissoziieren könnte. Da jedoch in verschiedenen Pflanzen unter identischen Versuchsbedingungen die Enzymkomplexe nachgewiesen wurden (s.u. und persönliche Mitteilung PD Dr. N. Wedel) ist nicht anzunehmen, dass es in den hier gezeigten Untersuchungen zu einer Dissoziation der Komplexe kommt. Damit sind die hier untersuchten Algen aus der Klasse der Heterokontophyta die ersten Organismen, die den regulatorischen Enzymkomplex nicht besitzen.

Aus dieser Beobachtung ergab sich die Frage ob in den Rotalgen, aus deren Vorläufern die Plastiden der Heterokontophyta entstanden, eine Regulation durch Proteinkomplexe existiert. Die Untersuchung der Rotalge *Porphyridium purpureum* zeigte (Abb. 3-20.1 A), dass es in den Plastiden dieses Organismus einen Enzymkomplex gibt. Das gemeinsame Aktivitäts-Maximum für PRK und GAPDH bei einem hohen Molekulargewicht von 380 kDa weist auf einen Komplex von beiden Enzymen hin und der immunochemische Nachweis von CP12 in den Fraktionen bestätigt die Zusammensetzung des Komplexes aus PRK, GAPDH und CP12 (Abb. 3-20.1 A).

Es wurde bis jetzt davon ausgegangen, dass die durch CP12 vermittelte Regulation durch Enzymkomplexe in pflanzlichen Organismen konserviert ist. Diese Komplexe wurden sowohl in unbelichteten Plastiden höherer Pflanzen (Clasper *et al.*, 1991; Rault *et al.*, 1993; Wedel *et al.*, 1997) als auch in Grünalgen (Nicholson *et al.*, 1987; Lebreton *et al.*, 1997; Wedel und Soll, 1998) und Cyanoabkterien (Wedel und Soll, 1998) nachgewiesen. Da die regulatorischen Komplexe bereits in den Cyanobakterien gefunden wurden, für die das Fehlen der Thiol-Modulation von PRK beschrieben ist (Tamoi *et al.*, 1998), wird davon ausgegangen, dass diese Form der lichtabhängigen Regulation der Enzymaktivität ursprünglicher ist als die Thiol-Modulation (Wedel und Soll, 1998). Die Identifizierung von Sequenzen für chimäre Proteine, die

offensichtlich durch genetische Fusion von bereits existierenden Enzymen mit der CP12-Sequenz entstanden sind, weist weiterhin darauf hin, dass die Eigenschaften von CP12 bereits früh in der Evolution dafür genutzt wurde, um diese Enzyme über Proteinkomplexe zu regulieren (Wedel und Soll, 1998). Ein Beispiel für eine solche genetische Fusion ist die GapB-Untereinheit der GAPDH höherer Pflanzen. Die GapB-Untereinheit besitzt eine große Ähnlichkeit zur GapA-Untereinheit (Brinkmann *et al.*, 1989) und unterscheidet sich von dieser durch eine C-terminale Extension, die große Ähnlichkeit zur C-terminalen Sequenz von CP12 hat (Pohlmeyer *et al.*, 1996). Die GAPDH der höheren Pflanzen ist ein Heterotetramer aus A- und B-Untereinheiten (A_2B_2) und kann, im Gegensatz zu den homotetrameren GAPDH´s (A_4) von Cyanobakterien und Grünalgen, im Dunkeln zu einer hochmolekularen enzymatisch inaktiven hexadekameren Enzym-Form (A_8B_8) aggregieren, vermittelt durch die Extension der B-Untereinheit (Baalmann *et al.*, 1994, 1995 und 1996). Ebenso wie der PRK:CP12:GAPDH-Komplex kann diese Enzym-Form durch NADPH und 1,3-BPGA dissoziiert werden (Baalmann *et al.*, 1995 und 1996).

Die Existenz der PRK:CP12:GAPDH-Komplexe in Rotalgen unterstreicht deren Bedeutung für die Regulation der Photosynthese und bestätigt, dass diese Form der Regulation in photosynthetischen Organismen hoch konserviert ist. Dies weist auch darauf hin, dass der Verlust der CP12-vermittelten Regulation in den Plastiden der Heterokontophyta auf Ereignisse während der sekundären Endocytobiose beruhen könnte. Eine mögliche Erklärung ergibt sich aus der ungewöhnlichen plastidären GAPDH der Heterokontophyta. Alle Organismen, in denen die Aktivität der beiden Enzyme durch den Komplex reguliert werden kann, besitzen die für den Calvin-Zyklus typische $NADP^+$-abhängige GapA bzw. GapAB GAPDH cyanobakteriellen Ursprungs. In den Plastiden der Kieselalgen und anderer Heterokontophyta findet man jedoch das für Plastiden atypische Gap-CI-Enzym (Liaud *et al.*, 2000). Dieses Enzym konnte möglicherweise nicht mit CP12 aggregieren und führte zum Verlust der Kontrolle durch den PRK:CP12:GAPDH-Komplex.

Abweichend von den höheren Pflanzen und Grünalgen, in denen die PRK durch Thiol-Modulation und regulatorische Proteinkomplexe reguliert wird, kann die PRK der Diatomeen durch keinen der Regulationsmechanismen reguliert werden. Damit fehlt in den Diatomeen eine posttranslationale lichtabhängige Regulation der PRK.

4.3 Die GAPDH der Diatomeen ist wahrscheinlich nicht Thiol-moduliert

Die Untersuchung der reduktiven Aktivierung der GAPDH [EC 1.2.1.13 (Tab. 3-3)] zeigte, dass auch dieses Enzym der Diatomeen unter physiologischen Bedingungen wahrscheinlich

nicht Redox-reguliert ist. Die geringfügige Aktivierung des Enzyms durch Reduktion deutet unter den experimentellen Bedingungen (3 Stunden Chromatographie unter aeroben Bedingungen) eher auf einen unspezifischen Effekt hin als auf eine Thiol-Modulation der GAPDH. Das Fehlen der Thiol-Modulation wurde bereits für die GAPDH von Rotalgen beschrieben (Pacold *et al.*, 1995). Die GAPDH´s der Rotalgen (GapA) lassen sich jedoch mit denen der Diatomeen nicht direkt vergleichen, da, wie oben bereits beschrieben, in den Plastiden der Diatomeen ein anderer GAPDH-Typ (Gap-CI) gefunden wird (Liaud *et al*., 2000).

Welche Cysteine die Thiol-Modulation der GAPDH vermitteln ist noch nicht sicher. Ein Vergleich der cytosolischen und plastidären GAPDH´s von Heterokontophyten und Rhodophyten mit der Thiol-modulierten GapAB der höheren Pflanzen (Tab. 4-1) zeigt, dass die Positionen der Cysteine wenig konserviert sind. Mit Ausnahme des Cysteins 151 (Numerierung nach der Gap-CII-Sequenz von *O. sinensis*), das direkt an der Katalyse beteiligt ist (Fersht, 1985) und dem direkt benachbarten Cystein 155 findet man keine Cysteine, die in plastidären Enzymen konserviert sind und in cytoplasmatische Isoformen fehlen. Pacold und Mitarbeiter (1995) beschrieben auf Grundlage von Struktur-Modellierungen die Cysteine 20 und 290 als die regulatorischen. Experimentell wird dies gestützt durch die Untersuchung der GAPDH von zwei Rhodophyten, denen eins dieser Cysteine fehlt und deren Aktivität nicht durch den Redox-Status des Enzyms beeinflusst wird (Pacold *et al.*, 1995). Das Fehlen dieser beiden Cysteine ist somit wahrscheinlich die Ursache für die fehlende Thiol-Modulation der GAPDH in den Diatomeen.

	Position der Cysteine														
	20	27	31	94	148	151	155	244	260	279	286	**290**	295	302	310
Höhere Pfl. GapAB	X					X	X			X		X			
Rhodophyten GapA	X					X	X	X			X				
Heterokont.Gap-CI		X		X	X	X			X						
Heterokont. Gap-CII				X		X	X							X	
Rhodophyten GapC		X	X			X	X						X		X

Tab. 4-1: Vergleich der Cysteine-Positionen plastidärer und cytoplasmatischer GAPDH´s.
Die Positionen der Cysteine wurden nach dem Sequenz-Vergleich bestimmt. Die Nummerierung entspricht der cytosolischen GAPDH von *O. sinensis* (Gap-CII). Die durch Struktur-Modellierung identifizierten potentiell regulatorischen Cysteine sind hervorgehoben. **Plastidäre GAPDH´s:** Höhere Pfl. (höhere Pflanzen), GapAB; Rhodophyten, GapA; Heterokont. (Heterokontophyten), Gap-CI. **Cytosolische GAPDH´s:** Rhodophyten, GapC Heterokont. (Heterokontophyten), Gap-CII. Die verwendeten Sequenzen sind im Anhang angegeben.

4.4 Die Regulation der Calvin-Zyklus-Enzyme Fruktose-1,6-bisphosphatase und Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase

Die Beobachtung, dass PRK und GAPDH in Diatomeen nicht durch die regulatorischen Komplexe und die Thiol-Modulation reguliert werden, stellt die bereits am Anfang dieser Arbeit stehende Frage, ob die lichtabhängige Regulation von plastidären Enzymen in Kieselalgen eine Bedeutung hat, noch zwingender. Daher wurden die Fruktose-1,6-bisphosphatase (EC 3.1.3.11, FbPase) und die Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (EC 3.1.3.37, SbPase), die anderen Thiol-modulierten Enzyme des Calvin-Zyklus, auf ihre Regulation untersucht. Da diese Enzyme irreversible Reaktionen katalysieren, deren Produkte bzw. Substrate wichtige Metabolite für andere Stoffwechselwege sind, wird davon ausgegangen, dass sie, ebenso wie die PRK, eine besondere Bedeutung für die Kontrolle des Calvin-Zyklus besitzen (Woodrow und Berry, 1988; Geiger und Servaites, 1994).

Die Aktivierung der plastidären FbPase von *C. granii* (Abschnitt 3.6), für die im unbehandelten stromalen Extrakt keine Aktivität nachgewiesen wurde (Tab. 3-4), zeigte *in vitro* eine komplexe Kinetik. Wurde die Aktivierung in einem kontinuierlichen Messsystem (hierbei wird die Katalyse parallel zur Aktivierung gemessen) untersucht, so nahm die Enzymaktivität in Gegenwart von DTT nach einer „Lag“-Phase mit steigender Messdauer kontinuierlich zu (Daten nicht gezeigt). Die Aktivierung der FbPase höherer Pflanzen zeigt im kontinuierlichen Messsystem das gleiche Verhalten (Schürmann und Wolosiuk, 1978). Diese Beobachtung wird auf zwei Enzymformen - in diesem Fall reduziertes und oxidiertes Enzym - mit verschiedenen kinetischen Eigenschaften zurückgeführt, die, im Vergleich zur Katalyse selbst, nur langsam ineinander umgewandelt werden. Ein solches Verhalten wird als Enzym-Hysterese bezeichnet (Frieden, 1970).

Die Aktivierungskinetik (Abb. 3-21) der plastidären FbPase von *C. granii* zeigte, dass das Enzym durch DTT nur langsam aktiviert wird. Erst die Gegenwart von FbP, im Komplex mit Ca^{2+}, führte zu einer signifikanten Aktivierung durch DTT. Dieser synergistische Effekt des Substrats auf die reduktive Aktivierung wurde ebenfalls für die FbPase von Spinat beschrieben (Hertig und Wolosiuk, 1983; Chardot und Meunier, 1991). Der Effekt von Mg^{2+}:FbP [unter physiologischen Bedingungen ist der Komplex mit Mg^{2+}-Ionen das eigentliche Substrat (Gardemann *et al.*, 1986)] wird auf konformelle Veränderungen des Enzyms zurückgeführt (Ballicora und Wolosiuk, 1994). Diese Veränderungen demaskieren eine Sulfhydryl-Gruppe pro katalytischer Untereinheit und verändern den pI des Enzyms (Chardot *et al.*, 1991). Dies führt wahrscheinlich auch zu einer Veränderung der physikochemische Eigenschaften der Mikro-Umgebung der regulatorischen Cysteine, was einen Einfluss auf das Redox-Potential haben kann

(Chivers *et al.*, 1997). Faske und Mitarbeiter (Faske *et al.*, 1995) zeigten, dass das Redox-Potential der regulatorischen Cysteine der plastidären FbPase von Spinat durch Ca^{2+}:FbP zu positiveren Werten verschoben wird, wodurch eine reduktive Aktivierung erleichtert wird.

Der Einfluss von Mg^{2+}:FbP auf das Redox-Potential scheint eine Voraussetzung für die Aktivierung der plastidären FbPase durch Trx zu sein. In der Abwesenheit von Mg^{2+}:FbP hatte Trx-f aus Spinat keinen Einfluss auf die Aktivierung der FbPase von *C. granii* (siehe Erläuterungen zu Abb. 3-21). Erst in der Gegenwart von Mg^{2+}:FbP konnte reduziertes Trx-f die FbPase aktivieren (Abb. 3-21). Für die höheren Pflanzen kann diese Beobachtung durch die Redox-Potentiale der Enzyme erklärt werden. Das Redox-Potential der Spinat-FbPase ist in Abwesenheit von Mg^{2+}:FbP mit -330 mV (Hirasawa *et al.*, 1999) sehr viel reduzierender als das von Trx-f aus Spinat [-290 mV (Hirasawa *et al.*, 1999)]. Unter diesen Bedingungen würden Elektronen von der FbPase zu Trx fließen. Erst die strukturellen Veränderungen von Mg^{2+}:FbP und die daraus resultierende Erhöhung des Redox-Potentials ermöglichen die reduktive Aktivierung der FbPase durch Trx-f (Faske *et al.*, 1995). Diese Modulation der Trx-Aktivierung durch Substrate erlaubt eine „feedforward"-Kontrolle einiger Redox-regulierter Enzyme (plastidäre FbPase, SbPase und plastidäre $NADP^+$-abhängige Malat-Dehydrogenase) und damit eine zusätzliche Anpassung an Veränderungen des Metabolismus (Scheibe, 1991; Faske *et al.*, 1995; Stitt 1996).

Die Untersuchung der SbPase von *C. granii* zeigte, dass das Enzym im unbehandelten stromalen Extrakt nur geringe enzymatische Aktivität hat (Tab. 3-4). Die um den Faktor 10 höhere Aktivität nach Behandlung mit dem Thiol-Reduktionsmittel DTT (Tab. 3-4) ist ein Hinweis für eine Regulation der SbPase über den Redox-Zustand. Die reduktive Aktivierung der SbPase von *C. granii* in Gegenwart des Substrates Mg^{2+}:SbP zeigte im kontinuierlichen Messsystem das bereits für die FbPase beschriebene hysteretische Verhalten (Daten nicht gezeigt). Dies weist auf zwei Enzym-Formen mit verschiedenen kinetischen Eigenschaften hin, die durch Reduktion bzw. Oxidation und den synergistischen Effekt des Substrates ineinander überführt werden können, analog zur FbPase von *C. granii*. Die vergleichbare Regulation der SbPase und FbPase ist durch mehrere Untersuchungen auch für die Enzyme höherer Pflanzen belegt (Woodrow und Walker, 1980 und 1982; Woodrow *et al.*, 1984; Cadet und Meunier, 1988b). Obwohl beide Enzyme der höheren Pflanzen nur sehr wenig Ähnlichkeit besitzen (Cadet und Meunier, 1988a) und die regulatorischen Cysteine an verschiedenen Positionen liegen (Jaquot *et al.* 1995 und 1997b) gibt es Hinweise für einen gemeinsamen strukturellen Effekt der Thiol-Modulation (Dunford *et al.* 1998b). Da die regulatorischen und die katalytischen Domänen voneinander getrennt sind, wird die Modulation der enzymatischen Aktivität durch eine

„intersite transmission“ konformeller Veränderungen erklärt – also einem allosterischen Effekt der Oxidation/Reduktion. Tatsächlich führt der regulatorische Thiol/Disulfid-Austausch zu auffälligen konformellen Veränderungen der FbPase, wie Beobachtungen der intrinsischen Fluoreszenz zeigen (Pradel *et al.*, 1981; Stein *et al.*, 1989). Diese konformellen Veränderungen sollen zudem Ähnlichkeit mit dem allosterischen Effekt von AMP auf die cytosolische FbPase von Säugern haben (Dunford *et al.* 1998b).

Alle für die plastidäre FbPase der Diatomeen untersuchten Einflüsse auf die Aktivierung des Enzyms zeigen qualitativ das gleiche Bild wie für das Enzym der höheren Pflanzen und lassen den Schluß zu, dass die FbPase in Diatomeen durch das Fd/Trx-System und die metabolische Kontrolle reguliert wird. Auch die Daten für die SbPase geben Hinweise für eine vergleichbare Regulation des Enzyms, analog zum Enzym der höheren Pflanzen.

Diese Untersuchungen zeigen, dass in den Plastiden der Diatomeen eine lichtabhängige Kontrolle der Enzymaktivität durch das Fd/Trx-System möglich ist und damit die fehlende Regulation von PRK und GAPDH nicht auf einem generellen Verlust der Thiol-Modulation des Fd/Trx-Systems in Diatomeen beruht.

4.5 In den Plastiden der Diatomeen gibt es wahrscheinlich keinen oxidativen Pentosephosphat-Weg (OPPW)

In den Chloroplasten höherer Pflanzen gibt es neben dem Calvin-Zyklus auch den oxidativen Pentosephosphat-Weg [OPPW (Stitt und Rees, 1980; Schnarrenberger *et al.*, 1973 und 1995)]. Die plastidäre Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) die den ersten geschwindigkeits-bestimmenden Schritt des oxidativen Teils der Reaktions-Sequenz katalysiert, wird im Licht durch die Thiol-Modulation des Fd/Trx-Systems inaktiviert (Scheibe und Anderson, 1981; Buchanan, 1991; Wenderoth *et al.*, 1997; Wendt *et al.*, 1999 und 2000).

Eine Untersuchung der mit gereinigten Plastiden von Diatomeen assoziierten G6PDH-Aktivität zeigte, dass diese Aktivität nicht sensitiv gegenüber Reduktion ist (Abb. 3-22). Die Regulierbarkeit der plastidären G6PDH ist jedoch eine charakteristische und essentielle Eigenschaft, die erst die Gegenwart von oxidativen (OPPW) und reduktiven (Calvin-Zyklus) Pentosephosphat-Zyklen in einem Kompartiment ermöglicht. Das Fehlen dieser Regulation würde einen gleichzeitigen Ablauf beider Zuckerphosphat-Stoffwechselwege ermöglichen, was zu einem verschwenderischen, unnützen Reaktions-Zyklus (*engl.* futile cycle) führen würde (Buchanan, 1991; Wolosiuk *et al.*, 1993). Daher ist es eher unwahrscheinlich, dass eine nicht regulierbare G6PDH in Chloroplasten vorkommt.

Durch Protease-Experimente konnte gezeigt werden, dass die gemessene G6PDH-Aktivität eine Kontamination mit einer nicht plastidären Isoform ist. Im Gegensatz zu den Befunden an höheren Pflanzen (Abb. 3-24 B) konnte in der vorliegenden Arbeit weder eine plastidäre G6PDH-Aktivität noch eine plastidäre Aktivität der 6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase (6PGDH), der zweiten Dehydrogenase des OPPW, in Diatomeen nachgewiesen werden (Abb. 3-23 und 3-24 A). Damit konnten die durchgeführten Untersuchungen die bereits beschriebene stromale Lokalisation des OPPW in den Plastiden der höheren Pflanzen bestätigen (Schnarrenberger *et al.*, 1973 und 1995) und gaben einen klaren Hinweis darauf, dass in den Plastiden der Diatomeen die oxidativen Reaktionen des OPPW nicht ablaufen.

Eine rationale Erklärung für das Fehlen des OPPW im Stroma der Diatomeen-Plastiden liefert die Lokalisation der Speicherstoffe. Anders als in höheren Pflanzen, wo der Stärkeabbau in den Plastiden die Kohlenstoffgerüste für den OPPW liefert, gibt es in den Plastiden der Diatomeen keine assimilatorische Stärke. Die wichtigste Speicherform photosynthetischer Assimilations-Produkte der Diatomeen, das β-1,3-Glukan Chrysolaminarin, liegt außerhalb der Plastiden in gesonderten Vakuolen vor (van den Hoek, 1993). Die Abbauprodukte von Chrysolaminarin müssten daher in die Plastiden reimportiert werden, um einem plastidären OPPW als Substrat zu dienen.

Der plastidäre OPPW ist in Pflanzen eng mit der Fettsäure-Biosynthese, dem Shikimat-Weg und der Nitrat-Reduktion, verbunden (Jensen 1985; Farr *et al.*, 1994; Huppe *et al.*, 1994; Debnam und Emes, 1999). So stellt der OPPW sowohl Reduktions-Äquivalente (NADPH) wie auch intermediäre Zuckerphosphate (z.B. Erythrose-4-Phosphat, E4P) für Biosynthesen bereit. Aus dem Fehlen des OPPW in den Plastiden der Diatomeen ergibt sich daher die Frage, woher in dessen Abwesenheit NADPH und die Intermediate bereit gestellt werden.

In der Abwesenheit des plastidären OPPW könnte der plastidäre Bedarf an Reduktionsäquivalenten und Zuckerphosphaten durch den Import aus dem Cytosol gedeckt werden. Für die Plastiden höherer Pflanzen sind eine Vielzahl von Zuckerphosphat-Translokatoren der Plastiden-Envelopmembran bekannt (Flügge, 2000). So können unter anderem Pentosephosphate diese Membran passieren (Bassham *et al.*, 1967). Eine extraplastidäre Quelle für Pentosephosphate ist möglicherweise der cytosolische OPPW. Es gibt Hinweise, dass im Cytosol von Spinat nur die Enzyme für den oxidativen Zweig des OPPW vorhanden sind (Schnarrenberger *et al.*, 1995) und dass somit die Oxidation von G6P zu NADPH und Ru-5-P führt, welches in die Plastide importiert werden kann. Für diese Reaktions-Sequenz wird auch eine Bedeutung während der Belichtung diskutiert. Da aus dem Calvin-Zyklus keine großen Mengen der Intermediate wie E4P abgezogen werden können, ohne den

Zuckerphosphat-Pool „auszubeuten“ und dadurch die CO_2-Assimilation zu erniedrigen (Geiger und Servaites, 1994b), wäre der Import von Ru5P aus dem oxidativen Zweig des cytosolischen OPPW eine geeignete anaplerotische Reaktions-Sequenz für den Calvin-Zyklus während der Belichtung (Schnarrenberger *et al.*, 1995). Für die Plastiden der Diatomeen ist allerdings noch nicht geklärt, ob es einen Pentosephosphat-Translokator gibt. Bis jetzt wurden ein Triosephosphat/Phosphat- ein Adenylat- und ein Dicarboxylat-Translokator in den Envelopmembranen der Diatomeen beschrieben (Wittpoth, 1996; Mertens, 1997). Es ist auch noch nicht geklärt, wie die Oxidation von G6P im Cytosol der Diatomeen abläuft. Die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Daten sprechen dafür, dass es außerhalb des Chloroplasten sowohl die G6PDH als auch die 6PGDH des oxidativen Teils des OPPW gibt. Ob im Cytosol der Diatomeen auch die weiteren Enzyme des OPPW vorliegen oder wie im Spinat fehlen, ist nicht geklärt. Der Import von Reduktionsäquivalenten in die Plastide der Diatomeen könnte über die beschriebenen Shuttle-Systeme erfolgen. So ist die plastidäre Malat-Dehydrogenase (MDH) in den Diatomeen wahrscheinlich nicht Thiol-moduliert (Mertens, 1997) und kann daher auch im Dunkeln den Austausch von Reduktionsäquivalenten vermitteln.

4.6 Untersuchung von G6PDH-Isoformen in Diatomeen

Um das Fehlen einer plastidären G6PDH auf molekularer Ebene zu überprüfen, wurde in einer cDNA-Bank der Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* nach G6PDH-Isoformen gesucht. Es wurde ein cDNA-Fragment identifiziert, das für einen Teilbereich der G6PDH kodiert. Die vollständige Sequenzierung dieser cDNA zeigte, dass der Leserahmen einen Teil des Gens der G6PDH sowie das Gen für die 6PGDH enthält (Schroers, 2000). Die beiden Proteine sind dabei durch eine kurze Peptidsequenz („Linker“) miteinander verbunden. Das im Rahmen der vorliegenden Arbeit identifizierte genomische DNA-Fragment vervollständigt die Sequenzinformation des cDNA-Fragments und führt zusammen mit Untersuchungen durch RACE-PCR (persönliche Mitteilung Oliver Kilian, Universität Konstanz) zur Identifizierung des Translationsstarts für das G6PDH/6PGDH-Gen.

Die Untersuchung der genomischen Sequenz bestätigte, dass zwischen den beiden Genen kein Translations-Stop-Signal für den kodierenden Bereich der G6PDH existiert. Dies weist darauf hin, dass das Produkt dieses Gens tatsächlich ein Fusionsprotein aus den beiden Dehydrogenasen des OPPW sein könnte, die über einen „Linker“ miteinander verbunden sind.

Für Diatomeen konnte vor kurzem ein Fusionsprotein nachgewiesen werden, in dem die GAPDH und die Triosephosphat-Isomerase (TPI) über eine kurze „Linker“-Sequenz miteinander

verbunden sind (Liaud *et al.*, 2000). Dieses Protein wird durch das N-terminal vor der GAPDH gelegene Adressierungs-Signal in die Mitochondrien transportiert. Obwohl das Fusionsprotein zum Teil in den Mitochondrien gespalten wird, liegt ein großer Teil als Fusionsprotein vor und ist enzymatisch aktiv (Liaud *et al.*, 2000). Ansonsten ist nur noch eine weitere translationelle Fusion aus dem Eubakterium *Thermatoga neapolitana* bekannt, bestehend aus PGK und TPI (Yu und Noll, 1995; Beaucamp *et al.*, 1997).

Im N-terminalen Bereich des G6PDH/6PGDH-Gens aus *P. tricornutum* konnten durch Vergleich mit cytosolischen G6PDH-Isoformen keine Adressierungs-Sequenzen identifiziert werden, die auf einen subzelluläre Transport des Fusionsproteins hinweisen. Dies deutet darauf hin, dass das Fusionsprotein im Cytosol von *P. tricornutum* lokalisiert ist. Um die subzelluläre Lokalisation des potentiellen G6PDG/6PGDH-Proteins zu überprüfen, wurden die Sequenzen mit den Proteinen verschiedener Taxa und aus verschiedenen Kompartimenten verglichen. Die phylogenetische Analyse in Abbildung 4-2 A zeigt eine klare Trennung der plastidären und cytoplastmatische Isoformen der Pflanzen und die G6PDH aus *P. tricornutum* zeigt eine Gruppierung mit den cytosolischen Isoformen. Innerhalb des cytosolischen Astes zeigt die G6PDH aus Diatomeen eine frühe Trennung von den Enzymen der höheren Pflanzen in Übereinstimmung mit der Abstammung der Diatomeen von den Rotalgen. Der Stammbaum der 6PGDH´s erlaubt dagegen keine Aussage über die Lokalisation des Enzyms. Die 6PGDH des Fusionsproteins zeigt zwar eine eindeutige Gruppierung mit den pflanzlichen Genen, der Ast mit den heterokontophyten Algen zweigt jedoch früh ab, noch bevor die cytosolischen und plastidären Isoformen der höheren Pflanzen aus einer Genduplikation hervorgehen (Krepinsky *et al.*, 2001). Da die beiden Enzyme wahrscheinlich Teil eines Fusionsproteins sind, kann jedoch davon ausgegangen werden, dass auch die 6PGDH im gleichen Kompartiment vorliegt

Der Vergleich der „Linker"-Sequenz des G6PDH/6PGDH-Proteins aus *P. tricornutum* mit der „Linker"-Sequenz von bekannten Fusionsproteinen ergab keine weiteren Informationen, da weder auf Sequenz- noch Struktur-Ebene eine charakteristische Eigenschaft identifiziert werden konnte (Daten nicht gezeigt).

Die Tatsache, dass bislang keine weiteren Gene für G6PDH-Isoformen in Diatomeen gefunden werden konnten, unterstützt den Befund, dass der OPPW in den Plastiden der Diatomeen fehlt.

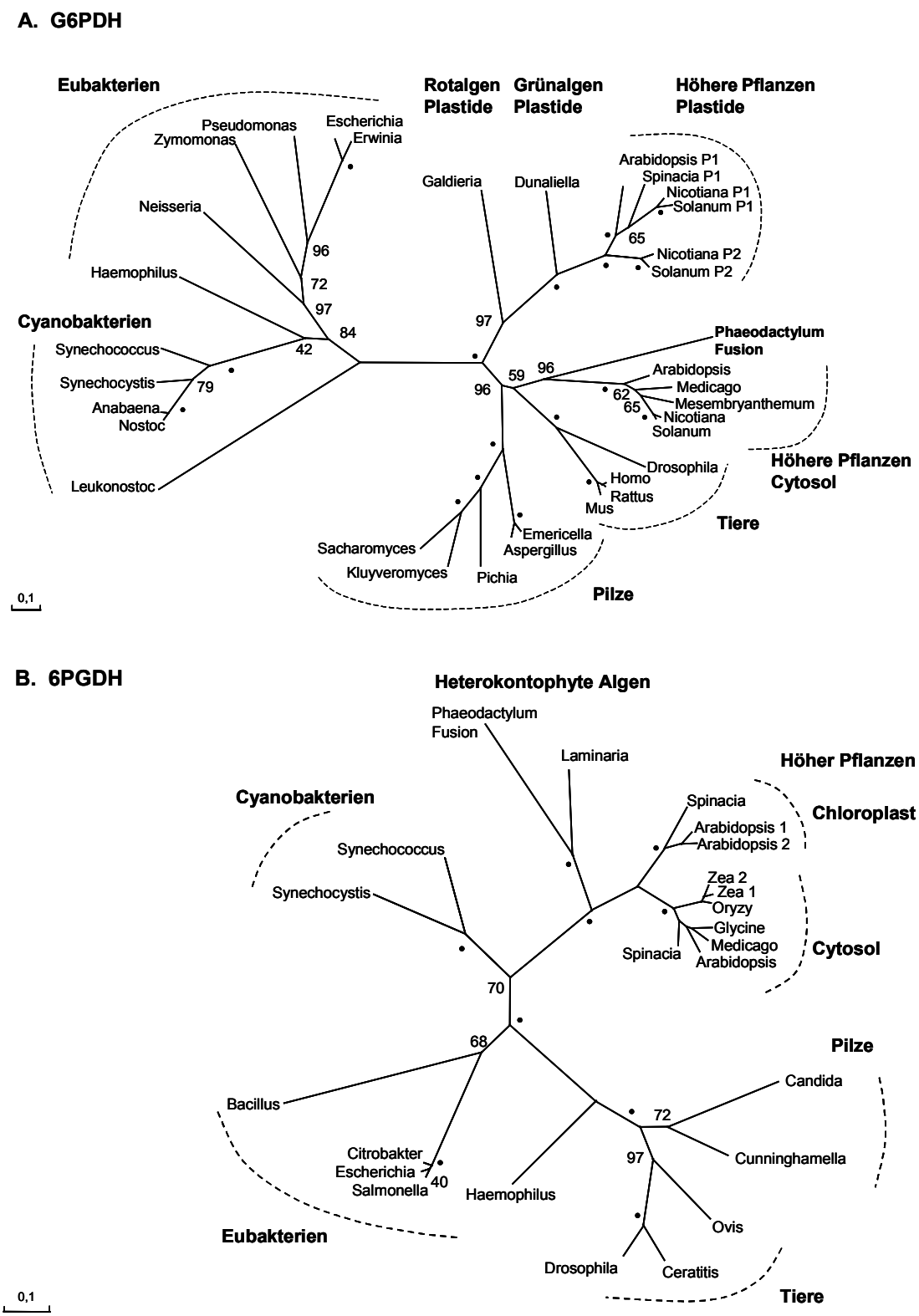


Abb. 4-2: Einordnung der G6PDH- und 6PGDH-Sequenzen des Fusionsproteins von *P. tricornutum* in die Phylogenie dieser Enzyme

Die Stammbäume wurden mit der „maximum likelihood"-Methode basierend auf Sequenzvergleichen von 515 (G6PDH) bzw. 467 (6PGDH) Positionen berechnet. Die Taxonomie und die subzelluläre Lokalisation ist angegeben. Die Zahlen geben die Häufigkeit der Verzweigung in 1000 Replikas an, die mit der gleichen Methode erzeugt wurden. Punkte entsprechen einer Häufigkeit >97%. Die Größen-Skala zeigt 0,1 Austausch pro Aminosäure-Position. **A.** Phylogenie der G6PDH-Sequenzen aus einem Sequenz-Vergleich von 35 Sequenzen. **B.** Phylogenie der 6PGDH-Sequenzen aus einem Sequenz-Vergleich von 24 Sequenzen. Die Erscheinungsnummern der verwendeten Sequenzen in den *EMBL* oder *Swiss-Prot* Datenbanken sind im Anhang angegeben.

4.7 Schlussfolgerung

Durch die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zur lichtabhängigen Thiol-Modulation des Calvin-Zyklus in Diatomeen konnten zwei wichtige Unterschiede im Vergleich zu den höheren Pflanzen festgestellt werden. Erstens werden wahrscheinlich weder die PRK (siehe 4.1.2 und 4.1.5) noch die GAPDH (4.3) der Diatomeen durch die lichtabhängige Regulation des Fd/Trx-Systems kontrolliert. Die Aktivität dieser Enzyme kann anders als in den höheren Pflanzen auch nicht durch den regulatorischen PRK:CP12:GAPDH-Komplex in Abhängigkeit von Licht reguliert werden (siehe 4.2). Somit fehlt eine lichtabhängige Regulation dieser Enzyme in den Plastiden, obwohl Enzyme in Diatomeen generell durch die Thiol-Modulation des Fd/Trx-Systems reguliert werden können, wie die Untersuchungen der FbPase und SbPase zeigten (siehe 4.4). Zweitens konnte kein Hinweis für die Existenz einer plastidären G6PDH oder 6PGDH gefunden werden (siehe 4.5). Dies deutet darauf hin, dass in den Plastiden der Diatomeen die oxidativen Reaktionen des oxidativen Pentosephosphat-Wegs (OPPW) nicht ablaufen, es also keinen plastidären OPPW gibt.

Die Koinzidenz einer fehlenden lichtabhängigen Regulation von PRK und GAPDH und eines fehlenden OPPW in den Plastiden der Diatomeen legt die Schlussfolgerung nahe, dass PRK und GAPDH nur in der Gegenwart des OPPW reguliert werden müssen. Da das Produkt des oxidativen Zweigs des OPPW, Ru5P, durch die irreversible Reaktion der PRK umgesetzt wird, ist offensichtlich, dass die Kontrolle der PRK entscheidend dafür ist, ob Ru5P in den Calvin-Zyklus eintritt oder weiter durch die Reaktionen des OPPW umgesetzt werden kann. Gleiches gilt für die Kontrolle der GAPDH, die im OPPW gebildetes GAP umsetzen könnte. Auf dieser Schlussfolgerung aufbauend wurde ein Modell für die Bedeutung der PRK- und GAPDH-Regulation entwickelt, das alle Befunde und Schlussfolgerungen konsistent erklären kann.

Unter normalen Bedingungen, ausreichende Versorgung mit CO_2, Stickstoff und Licht, laufen in den Plastiden höherer Pflanzen die Reaktionen des Calvin-Zyklus ab und der OPPW ist durch die Kontrolle der G6PDH inhibiert, um nutzlose Reaktionszyklen zu verhindern (Buchanan, 1980 und 1991).

Es ist jedoch auch bekannt, dass der plastidäre OPPW auch während der Belichtung ablaufen kann. Wenn große Mengen Reduktionsäquivalente in der Plastide benötigt werden, z.B. während der Nitrat-Assimilation, kann die G6PDH durch Oxidation aktiviert werden (Farr *et al.*, 1994; Huppe *et al.*, 1994). Glukose-6-Phosphat, aus dem Abbau von Stärke, wird für die Produktion von NADPH verwendet, um den Anforderungen des veränderten Metabolismus nachzukommen. Gleichzeitig kommt es zu einer partiellen Inhibierung der PRK (Farr *et al.*, 1994; Huppe *et al.*, 1994) und wahrscheinlich auch der GAPDH. Die oxidative Aktivierung der G6PDH bzw.

Inaktivierung von PRK und GAPDH resultiert aus dem erhöhten NADPH-Verbrauch, der dazu führt, dass weniger Elektronen von Ferredoxin auf Thioredoxin übertragen werden (Huppe *et al.*, 1994). Die Veränderungen der Enzymaktivitäten führen zu einer Abnahme der CO_2-Assimilation (auf 40%), diese kommt jedoch nicht vollständig zum Erliegen (Huppe *et al.*, 1994), so dass unter diesen Bedingungen der oxidative und reduktive Pentosephosphat-Zyklus offensichtlich gleichzeitig ablaufen.

Unter diesen Bedingungen ist eine Kontrolle der PRK-Aktivität eine wichtige Voraussetzung, da ansonsten das durch den OPPW gebildete Ru5P über die irreversible Kinase-Reaktion in den reduktiven Zweig des Calvin-Zyklus eintritt, wodurch das gebildete NADPH wieder verbraucht würde (Abb. 4-3 B). Dies wäre ein verschwenderischer Reaktions-Zyklus [*engl.* futile cycle (Buchanan, 1980)]. Auch die Umsetzung von GAP durch die GAPDH würde die Funktion des OPPW beeinträchtigen. Die Regulation von PRK und GAPDH ist also von essentieller Bedeutung für die Funktion des OPPW während der Belichtung.

Die Kontrolle der PRK-Aktivität durch das Fd/Trx-System könnte die Flüsse der Zuckerphosphate in der Art kontrollieren, dass nur die Menge Ru5P durch die PRK in den Calvin-Zyklus eingeschleust wird, die auch aus den reduktiven Reaktionen stammt (in Abb. 4-3 B sind die relativen Mengen der Zuckerphosphate durch verschieden dicke Pfeile dargestellt). Dies würde dazu führen, dass Ru5P, welches aus dem OPPW stammt, weiter durch die Reaktionen des OPPW umgesetzt werden kann. Diese dynamische Kontrolle von Zuckerphosphat-Flüssen würde den gleichzeitigen Ablauf der zwei entgegenläufigen Reaktions-Zyklen in einem Kompartiment ermöglichen.

Obwohl in unbelichteten Plastiden Ru5P nicht in den reduktiven Zweig des Calvin-Zyklus eintreten kann, da die Rubisco nicht aktiviert ist, könnte eine nicht regulierte PRK im Dunkeln große Mengen Ru5P zu Ru1,5-bP umsetzen, welches in großen Mengen durch die inaktive decarbamylierte Rubisco gebunden werden kann (Portis, 1992). Dadurch würde Ru5P dem OPPW entzogen, wodurch der oxidative Abbau von Zuckerphosphaten, ebenso wie durch die Umsetzung von GAP durch eine nicht regulierte GAPDH, im Dunkeln beeinträchtigt würde.

Welche Bedeutung die PRK- und GAPDH-Regulation in Abwesenheit des oxidativen Pentosephosphat-Wegs für die Regulation des Calvin-Zyklus haben könnte, ist nicht klar. Untersuchungen an Antisense-Pflanzen unter Bedingungen die zu einer Inhibierung des OPPW führen, konnten keine großen Effekte erniedrigter Enzymmengen von PRK und GAPDH auf die CO_2-Assimilation zeigen (Price *et al.*, 1995; Habash *et al.*, 1996; Banks *et al.*, 1999). Es ist daher sinnvoll anzunehmen, dass unter diesen Bedingungen die Dissoziation der Enzymkomplexe und die Aktivierung der Enzyme durch Trx die Zelle einfach nur mit aktivierter PRK und GAPDH

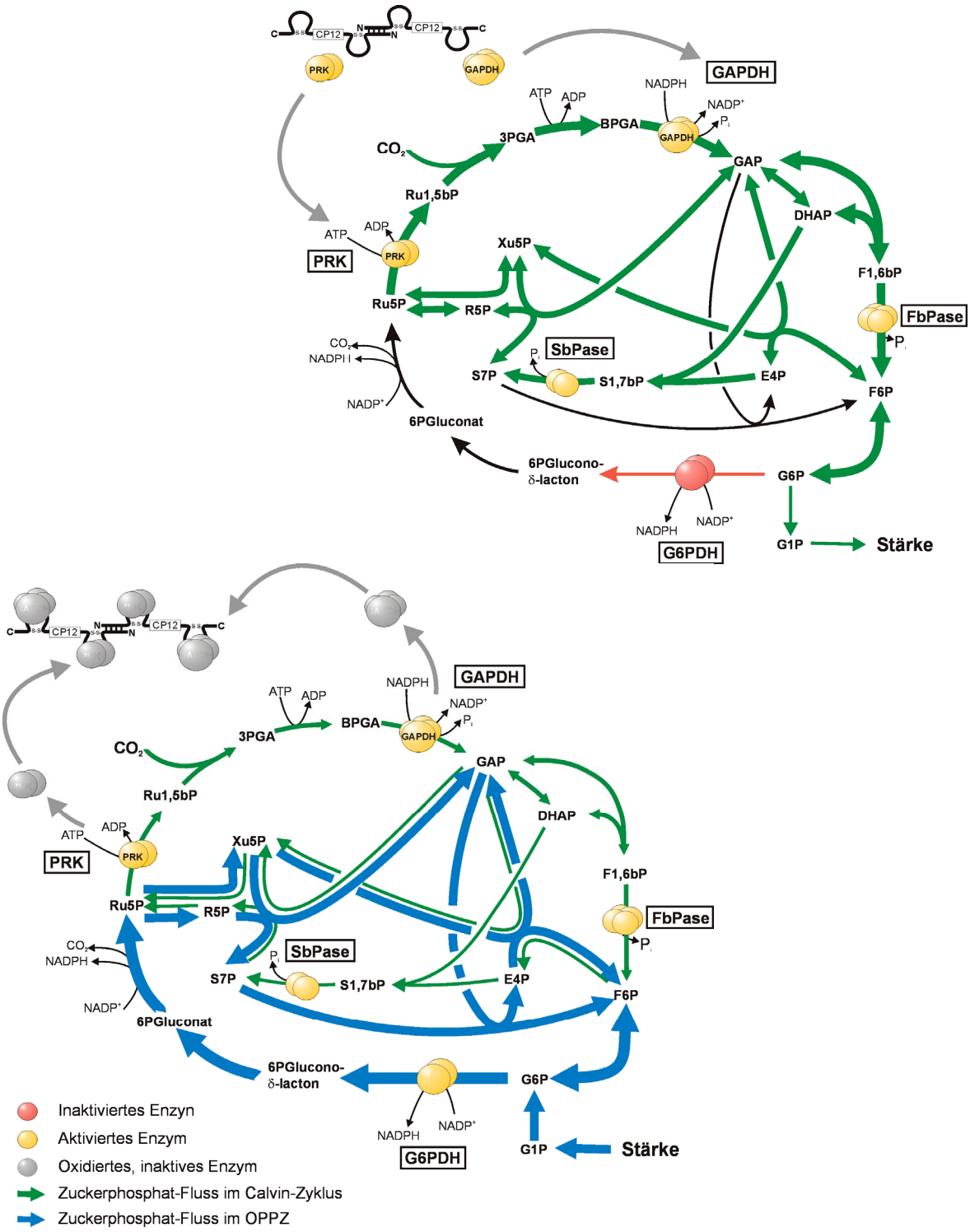


Abb. 4-3: Bedeutung der Regulation von PRK und GAPDH für die Kontrolle der Zuckerphosphat-Flüsse in der Plastide.

Dargestellt sind die Zuckerphosphat-Flüsse in der Plastide im Calvin-Zyklus und im oxidativen Pentosephosphat-Weg (OPPW) und die Kontrolle der Enzyme **A** während der Belichtung und **B** während der Belichtung unter Bedingungen, die zu einer Aktivierung des OPPW führen. Die Farbkodierung ist in der Tabelle wiedergegeben. Für Details siehe Text.

versorgt, deren Enzymaktivität dann durch die metabolische Kontrolle moduliert wird [siehe Abb. 4-3 A (Gardemann, *et al.*, 1983; Scheibe, 1990)].

Die in diesem Modell dargestellte Bedeutung der PRK- und GAPDH-Regulation impliziert, dass die Thiol-Modulation von PRK und GAPDH und die Kontrolle durch regulatorische Proteinkomplexe in Abwesenheit eines plastidären OPPW nicht zwingend notwendig ist und kann so die fehlende Regulation dieser Enzyme in den Plastiden der Diatomeen, die wahrscheinlich keinen OPPW haben, erklären.

Es ist nicht offensichtlich, ob die Veränderungen der Kompartimentierung des OPPW und die veränderte Regulation des Calvin-Zyklus eine vorteilhafte Entwicklung für die Algen sind oder nur der beste Weg, um mit dem Zustand, wie er sich wahrscheinlich während der sekundären Endocytobiose eingestellt hat, umzugehen.

Der Transfer von Genen aus dem Genom des Endosymbionten in den Kern der Wirtszelle und der Verlust des Gens auf dem Genom der designierten Plastide scheint ein generelles Phänomen während der Umwandlung eines Endosymbionten in ein Zellorganell zu sein (Allen und Raven, 1996; Martin und Herrmann, 1998; Martin *et al.*, 1998; Henze und Martin, 2001). Dabei erfordert der erfolgreiche Transfer eines Gens für ein plastidäres Protein in den Kern des Wirts die Etablierung neuer genetischer Elemente (Martin und Herrmann, 1998): 1. Etablierung eukaryotischer Expressionselemente. 2. Erwerbung einer geeigneten Adressierungs-Sequenz für den Import des Genprodukts in die Organelle. Wird während des Gentransfers kein Adressierungs-Signal etabliert, so kann das Genprodukt nicht in das Organell importiert werden. Ein Beispiel dafür ist die cytosolische Phosphoglycerat-Kinase der höheren Pflanzen, die ein cyanobakterielles Enzym ist (Martin und Schnarrenberger, 1997).

Man kann sich vorstellen, dass es während der komplexen Abläufe der Endocytobiosen, die auch zu einer Reorganisation der subzellulären Verteilung von Stoffwechselwegen führten, als Beispiel sei die Existenz von glykolytischen Enzymen in den Mitochondrien der Diatomeen genannt (Liaud *et al.*, 2000), auch zum Verlust eines Stoffwechselwegs in einem Kompartiment gekommen sein könnte. Das Fehlen des OPPW in den Diatomeen-Plastiden könnte dann eine Regulation der PRK überflüssig gemacht haben und so zum Verlust der regulatorischen Eigenschaft des Enzyms geführt bzw. die Entwicklung dieser Regulation verhindert haben. Alternativ könnte die Etablierung nicht regulierbarer plastidärer Isoformen der PRK und GAPDH eine Auslagerung des OPPW aus der Plastide erfordert haben. Dafür spricht, dass man, anders als in höheren Pflanzen und auch Rotalgen, aus deren Vorläufern die Diatomeen-Plastiden entstanden, eine ungewöhnliche GAPDH-Form in den Plastiden der Diatomeen findet [Gap-CI (Liaud *et al.*, 2000)], die, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt, wahrscheinlich nicht Thiol-moduliert wird.

Auf Grund der zur Verfügung stehenden Daten bleibt es unklar, wie sich die veränderte Regulation und Kompartimentierung des plastidären Kohlenhydrat-Stoffwechsels in Diatomeen entwickelt hat. Offensichtlich ist jedoch der enge Zusammenhang zwischen PRK- und GAPDH-Regulation und der Existenz eines plastidären OPPW und damit die Bedeutung der lichtabhängigen Regulation dieser Enzyme für die Kontrolle des plastidären Kohlenhydrat-Metabolismus.

5 Zusammenfassung

Der reduktive Pentosephosphat-Zyklus (Calvin-Zyklus) der Grünalgen und höherer Pflanzen wird vor allem über vier Schlüsselenzyme reguliert: Phosphoribulokinase (PRK), Fruktose-1,6-bisphosphatase (FbPase), Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SbPase) und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH). Die lichtabhängige Modulation der Enzymaktivitäten erfolgt dabei über die reversible Oxidation/Reduktion von intramolekularen Cysteinen durch das Ferredoxin/Thioredoxin-System (Thiol-Modulation). Die Enzyme PRK und GAPDH werden zusätzlich durch die Bildung von Proteinkomplexen reguliert.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Untersuchung der Regulation des Calvin-Zyklus in den Plastiden von Kieselalgen (Diatomeen), die trotz ihrer großen Bedeutung für die globale CO_2-Fixierung bzw. O_2-Produktion bislang noch schlecht charakterisiert sind.

Die Ergebnisse zeigen, dass die PRK in den Plastiden der Diatomeen ständig in der reduzierten, aktiven Form vorliegt, obwohl das Enzym die für die Regulation benötigten Cysteine besitzt und potentiell über den Redox-Zustand der Cysteine reguliert werden kann. Die reversible oxidative Inaktivierung des Enzyms resultiert ebenso wie in höheren Pflanzen aus der Bildung eines intramolekularen Disulfids. Durch die Bestimmung der mittleren Redox-Potentiale konnte die *in vivo* fehlende Thiol-Modulation der PRK auf ein verändertes Redox-Potential der regulatorischen Cysteine zurückgeführt werden. Für die Diatomeen-PRK wurde ein mit −257 mV sehr viel positiveres Redox-Potential als bei dem entsprechenden Enzym aus Spinat-Plastiden (-289 mV) bestimmt, welches dazu führt, dass die PRK unter den in der Plastide möglichen Redox-Bedingungen wahrscheinlich permanent reduziert und damit aktiviert vorliegt.

Ebenso konnte gezeigt werden, dass auch die plastidäre GAPDH der Diatomeen wahrscheinlich nicht über den Redox-Zustand reguliert wird.

Die Untersuchungen zur Existenz möglicher regulatorischer PRK:CP12:GAPDH-Komplexe zeigen, dass diese Komplexe in den Plastiden von heterokonten Algen vermutlich nicht vorkommen. So wurde weder für Diatomeen noch für eine Raphidophyceae ein Hinweis auf PRK:CP12:GAPDH-Komplexe gefunden, während diese Komplexe in den Plastiden der Rotalgen, die als Vorläufer der Diatomeen gelten, eindeutig nachgewiesen werden konnten.

Als einzige Calvin-Zyklus-Enzyme werden vermutlich die FbPase und die SbPase der Diatomeen über Thioredoxin reguliert. Dabei haben die Substrate einen positiven Effekt auf die reduktive Aktivierung durch Thioredoxin. Diese Resultate deuten darauf hin, dass die FbPase und die SbPase der Diatomeen wie die entsprechenden Enzyme der höheren Pflanzen durch die Thiol-Modulation und den synergistischen Effekt des Substrates reguliert werden.

Die Untersuchung der Enzyme des oxidativen Pentosephosphat-Wegs (OPPW) zeigt, dass es in Diatomeen-Plastiden keine Glucose-6-phosphat-Dehydrogenase (G6PDH) und keine 6-Phosphogluconat-Dehydrogenase (6-PGDH) gibt und somit der gesamte oxidative Zweig des OPPW in diesen Plastiden fehlt, wodurch sich die fehlende Thiol-Modulation der PRK und GAPDH in Diatomeen erklären lässt.

Auf Grund der erhaltenen Daten wurde ein Modell zur Bedeutung der Regulation von PRK und GAPDH für die Abläufe der Kohlenhydrat-Synthese in den Plastiden höherer Pflanzen aufgestellt. Es zeigt, dass die Regulation von PRK und GAPDH in Anwesenheit eines OPPW die Zuckerphosphat-Flüsse zwischen anabolen und katabolen Reaktionen kontrolliert. In den Diatomeen-Plastiden scheint diese Regulation durch die Abwesenheit des OPPW nicht mehr notwendig zu sein. Unklar ist, ob der Verlust des OPPW in Diatomeen-Plastiden für die modifizierte Regulation der Calvin-Zyklus-Enzyme verantwortlich ist, oder ob ein Verlust der regulatorischen Eigenschaften der PRK eine Auslagerung des OPPW aus den Plastiden der Diatomeen erforderte.

6 Literatur

Abdelal, A.T.H. und Schlegel, H.G. (1974). Purification and regulatory properties of phosphoribulokinase from *Hydrogenomonas eutropha*. *Biochem. J.*, **139**: 481-489

Ahmed, K.A., Schaffer, S.W. und Wetlaufer, D.B. (1975). Nonenzymatic reactivation of reduced bovine pancreatic ribonuclease by air oxidation and by glutathione oxidoreduction buffer. *J. Biol. Chem.*, **250**: 8477-8482

Allen, J.F. und Raven, J.A. (1996). Free-radical-induced mutation vs. redox regulation: Costs and benefits of genes in organelles. *J. Mol. Biol.*, **42**: 482-492

Anderson, L.E. (1973). Regulation of pea leaf ribulose-5-phosphate kinase activity. *Biochim. Biophys. Acta.*, **321**: 484-488

Avilan, L., Gontero, B., Lebreton, S. und Ricard, J. (1997a). Memory and imprinting effects in multienzyme complexes I. Isolation, dissociation and reassociation of a phosphoribulokinase glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complex from *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Eur. J. Biochem.*, 246: 78-84

Avilan, L., Gontero, B., Lebreton, S. und Ricard, J. (1997b). Information transfer in multienzyme complexes 2. The role of Arg64 of *Chlamydomonas reinhardtii* phosphoribulokinase in the information transfer between glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and phosphoribulokinase. *Eur. J. Biochem.*, **250**: 296-302

Baalmann, E., Backhausen, J.E., Kitzmann, C. und Scheibe, R. (1994). Regulation of NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity in spinach chloroplasts. *Bot. Acta*, **107**: 313-320

Baalmann, E., Backhausen, J.E., Rak, C., Vetter, S. und Scheibe, R. (1995). Reductive modification and nonreductive activation of purified spinach chloroplast NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **324**: 201-208

Baalmann, E., Scheibe, R., Cerff, R. und Martin, W. (1996). Functional studies of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase subunits A and B expressed in *Escherichia coli*: formation of highly active A_4 and B_4 homotetramers and evidence that aggregation of the B_4 complex is mediated by the B subunit carboxy terminus. *Plant Mol. Biol.*, **32**: 505-513

Ballicora, M.A. und Wolosiuk, R.A. (1994). Enhancement of the reductive activation of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase by modulators and protein perturbants. *Eur. J. Biochem.*, **222**: 467-474

Banks, F.M., Driscoll, S.P., Parry, M.A.J., Lawlor, D.W., Knight, J.S., Gray, J.C. und Paul, M.J. (1999). Decrease in phosphoribulokinase activity by antisense RNA in transgenic tobacco. Relationship between photosynthesis, growth and allocation at different nitrogen levels. *Plant Physiol.*, **119**: 1125-1136

Bartlett, S.G., Grossman, A.R., und Chua, N.H. (1982). *In vitro* synthesis and uptake of cytoplasmatically-synthesized chloroplast proteins. In: Methods in chloroplast molecular biology, Elsevier Amsterdam: 1081-1086

Bassham, J.A., Benson, A.A., Kay, L.D., Harris, A.Z., Wilson, A.T. and Calvin, M. (1954). The path of carbon in photosynthesis. XXI: The cyclic regeneration of carbon dioxide acceptor. *J. Am. Chem. Soc.*, **76**: 1760-1770

Bassham, J.A., Kirk, M. und Jensen, R.G. (1967). Photosynthesis by isolated chloroplasts. I. Diffusion of labeled photosynthetic intermediates between isolated chloroplasts and suspending medium. *Biochem. Biophys. Acta*, **153**: 1-5

Beaucamp, N., Schurig, H. und Jaenicke, R. (1997). The PGK-TIM fusion protein from *Thermotoga maritima* and its constituent parts are intrinsically stable and fold independently. *Biol. Chem.*, **378**: 679-685

Beidler, J.L., Hillard, P.R. und Rill, R.L. (1982). Ultrasensitive staining of nucleic acids with silver. *Anal. Biochem.*, **126**: 347-380

Bhaya, D. und Grossman, A. (1991). Targeting proteins to diatom plastids involves transport through an endoplasmic reticulum. *Mol. Gen. Genet.*, **229**: 400-404

Brandes, H.K., Hartmann, F.C., Lu, T.-S.S. und Larimer, F.W. (1996a). Efficient expression of the gene for spinach phosphoribulokinase in *Pichia pastoris* and utilization of the recombinant enzyme to explore the role of regulatory cysteinyl residues by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, **271**.6490-6496

Brandes, H.K., Larimer, F.W. und Hartmann, F.C. (1996b). The molecular pathway for the regulation of phosphoribulokinase by thioredoxin f. *J. Biol. Chem.*, **271**: 3333-3335

Brandes, H.K., Larimer, F.W., Geck, M.K., Stringer, C.D., Schürmann, P. und Hartman, F.C. (1993). Direct identification of the primary nucleophile of thioredoxin f. *J. Biol. Chem.*, **268**: 18411-18414

Brandes, H.K., Stringer, C.D. und Hartmann, F.C. (1992). Conformational flexibility of the regulatory site of phosphoribulokinase as demonstrated with bifunctional reagents. *Biochemistry*, **31**: 12833-12838

Brinkmann, H., Cerff, R., Salomon, M. und Soll, J. (1989). Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding the cytosolic precursors of subunits GapA and GapB of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from pea and spinach. *Plant Mol. Biol.*, **13**: 81-94

Buchanan, B.B. (1980). Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **31**: 341 – 374

Buchanan, B.B. (1984). The ferredoxin/thioredoxin system: A key element in the regulatory function of light in photosynthesis. *Bioscience*, **34**: 378 – 383

Buchanan, B.B. (1991). Regulation of CO_2 assimilation in oxygenic photosynthesis: The ferredoxin/thioredoxin system. *Arch. Biochem. Biophys.*, **288**: 1-9.

Buchanan, B.B. und Wolosiuk, R.A. (1976). Photosynthetic regulatory protein found in animal and bacterial cells. *Nature*, **264**: 669-670

Buchanan, B.B., Schürmann, P. und Kalberer, P.P. (1971). Ferredoxin-activated fructose diphosphatase of spinach chloroplasts. Resolution of the system, properties of the alkaline fructose diphosphatase component and physiological significance of the ferredoxin-linked activation. *J. Biol. Chem.*, **246**: 5952 – 5959

Buchanan, B.B., Wolosiuk, R.A. und Schürmann, P. (1979). Thioredoxin and enzyme regulation. *Trends Biochem. Sci.*, **4**: 93-96

Burnette, W.N. (1981). „Western-Blotting“: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gels to unmodified nitro-cellulose and radiographic detection with antibody and radio-labelled protein A. *Anal. Biochem.*, **112**: 196-203

Cadet, F. und Meunier, J.-C. (1988a). Spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast sedoheptulose-1,7-bisphosphatase activation and deactivation, and immunological relationship to fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochem. J.*, **253**: 243-248

Cadet, F. und Meunier, J.-C. (1988b). pH and kinetic studies of chloroplast sedoheptulose-1,7-bisphosphatase from spinach (*Spinacia oleracea*). *Biochem. J.*, **253**: 249-254

Calvin, M. (1956). The photosynthetic carbon cycle. *J. Chem. Soc.*, **1956**: 1895-1915

Capitani, G., Markovic-Housley, Z., DelVal, G., Morris, M., Jansonius, J.N. und Schürmann, P. (2000). Crystal structure of two functionally different thioredoxins in spinach chloroplasts. *J. Mol. Biol.*, **302**: 135-154

Cardot, T. und Meunier, J.C. (1991). Properties of oxidized and reduced spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase activated by various agents. *Biochem. J.*, **278**: 787-791

Cavalier-Smith, T. (2000). Membrane heredity and early chloroplast evolution. *TIPS*, **5**: 174-182.

Cerff, R. (1978). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Sinapis alba*: Steady state kinetics. *Phytochem.*, **17**: 2061-2067

Cerff, R. und Chambers, S. (1979). Subunit structure of higher plant glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **254**:6094-6098

Chardot, T., Quieiroz, C., Claret, C. und Meunier, J.C. (1991) Non reductive activation of chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase: evidence for structural modification of the enzyme. *Biochimie*, **73**: 1205-1209

Chiadmi, M., Navaza, A., Miginiac-Maslow, M. Jacqout, J.-P. und Cherfils, J. (1999). Redox signalling in the chloroplast: structure of oxidized pea fructose-1,6-bisphosphate phosphatase. *EMBO J.*, **18**: 6809-6815

Chivers, P.T, Laboissière, M.C.A. und Raines, R.T. (1996). The CXXC motif: imperatives for the formation of native disulfide bonds in the cell. *EMBO J.*, **15**: 2659-2667

Chivers, P.T, Prehoda, K.E., Volkman, B.F., Kim, B.-M., Karkley, J.L. und Raines, R.T. (1997b). Microscopic pK_avalues of *Escherichia coli* thioredoxin. *Biochemistry*, **36**: 14985-14991

Chivers, P.T., Prehoda, K.E. und Raines, R,T. (1997a). The CXXC motif: A rheostat in the active site. *Biochemistry*, **36**: 4061-4066

Chow, L.-P., Iwadate, H., Yano, K., Kamo, M., Tsugita, A., Gardet-Salvi, L., Stritt-Etter, A.-L., und Schürmann, P. (1995). Amino acid sequence of spinach ferredeoxin:thioredoxin reductase catalytic subunit and identification of thiol groups constituting a redox-active disulfide and a [4Fe-4S] cluster. *Eur. J. Biochem.*, **231**: 149-156

Clancey, C.J. und Gilbert, H.F. (2000). Thiol/Disulfide exchange in the thioredoxin-catalyzed reductive activation of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.*, **262**: 13545-13549

Clasper, S., Easterby, J.S. und Powls, R. (1991). Properties of two high-molecular mass forms of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from spinach leaf, one of which also possesses latent phosphoribulokinase activity. *Eur. J. Biochem.*, **202**: 1239-1246

Cline, K., Werner-Washburne, M., Lubben, T.H. und Keegstra, K. (1984). Thermolysin is a suitable protease for probing the surface of intact pea chloroplasts. *Plant Physiol.*, **75**: 667-675

Cooper, T.G. (1980). Biochemische Arbeitsmethoden. Verlag de Gruyter, Berlin-New York

Copeland, L. und Turner, J.F. (1987). The regulation of glycolysis and the pentose-phosphate pathway. In: *The Biochemistry of plants*, Vol 11 (Stumpf, P.K. und Conn, E.E., eds.). New York Academic Press: 107-125

Crawford, N.A., Droux, M., Kosover, N.S. und Buchanan, B.B. (1989). Evidence for function of the ferredoxin/thioredoxin system in the reductive activation of target enzymes of isolated intact chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.*, **271**: 223-239

Crawford, N.A., Yee, B.C. Hutcheson, S.W., Wolosiuk, R.A. und Buchanan, B.B. (1986). Enzyme regulation in C_4 photosynthesis: Purification, properties and activities of thioredoxins from C_4 and C_3 plants. *Arch. Biochem. Biophys.*, **244**: 1-15

De La Torre, A., Lara, C. Wolosiuk, R.A. und Buchanan, B.B. (1979). Ferredoxin-thioredoxin reductase: A chromophore-free protein of chloroplasts. *FEBS Lett.*, **107**:141-145

Debnam, P.M. und Emes, M.J. (1999). Subcellular distribution of enzymes of the oxidative pentose phosphate pathway in root and leaf tissues. *J. Exp. Botany*, **50**: 1653-1661

Delwiche, C.F. (1999). Tracing the thread of plastid diversity through the tapestry of life. *Am. Nat.*, **154**: 164-177

Delwiche, C.F. und Palmer J.D. (1997). The origin of plastids and their spread via secondary endosymbiosis. *Plant Syst. Evol.*, **11**: 53-86

Douglas, S.E. (1998). Plastid evolution: origins, diversity, trends. *Curr Op. Genet. Dev.*, **8**: 655-661

Douglas, S.E., Murphy, C.A., Spencer, D.F. und Gray, M.W. (1991). Cryptomonad algae are evolutionary chimaeras of two phylogenetically distinct unicellular eukaryotes. Nature, **350**: 148-151.

Droux, M., Jacqout, J.-P., Miginiac-Maslow, M., Gadal, P., Huet, J.C., Crawford, N.A., Yee, B.C. und Buchanan, B.B. (1987a). Ferredoxin-thioredoxin reductase, an iron sulfur enzyme linking light to enzyme regulation in oxygenic photosynthesis: purification and properties of the enzyme from C_3, C_4 and cyanobacterial species. *Arch. Biochem. Biophys.*, **252**: 426-439

Droux, M., Miginiac-Maslow, M., Jacqout, J.-P., Gadal, P., Crawford, N.. Akosower, N.S. und Buchanan, B.B. (1987b). Ferredoxin-thioredoxin reductase: A catalytically active dithiol group links photoreduced ferredoxin to thioredoxin functional in photosynthetic enzyme regulation. *Arch. Biochem. Biophys.*, **256**: 372-380

Dunford, R.P., Catley, M.A., Raines, C.A., Lloyd, L.C. und Deyer, T.A. (1998a). Expression of wheat sedoheptulose-1,7-bisphosphatase in *E. coli* and affinity purification of functional protein. *Protein expression and purification*, **14**:139-145

Dunford, R.P., Durrant, M.C., Catley, M.A. und Deyer, T.A. (1998b). Location of the redox-active cysteines in chloroplast sedoheptulose-1,7-bisphosphatase indicates that its allosteric regulation is similar but not identical to that of fructose-1,6-bisphosphatase. *Photosyn. Res.*, **58**: 221-230

Dwek, R.A., Edge, C.J., Harvey, D.J. und Wormald, M.R. (1993). Analysis of glycoprotein-associated oligosaccharides. *Annu. Rev. Biochem.*, **62**: 65-100

Faloona, F. und Mullis, K.B. (1987). Specific synthesis of DNA *in vitro* via polymerase chain reaction. *Methods Enzymol.*, **155**: 335-350

Farr, T.J., Huppe, H.C. und Turpin, D.H. (1994). Coordination of chloroplastic metabolism in N-limited Chlamydomonas reinhardtii by redox-modulation. I. The activation of phosphoribulokinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase is relative to the photosynthetic supply of electrons. *Plant Physiol.*, **105**: 1037-1042

Faske, M., Holtgrefe, S., Ocheretina, O., Meister, M., Backhausen, J.E. und Scheibe, R. (1995). Redox equilibria between the regulatory thiols of light/dark-modulated chloroplast enzymes and dithiothreitol: fine-tuning by metabolites. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1247**: 135-142

Fasman, G.D. (1979). Handbook of biochemistry and molecular biology. 3rd Ed., Vol. I, CRC Press, Cleveland Ohio.

Fersht, A. (1985). *Enzyme Structure and mechanism*, 2nd Ed. Freeman, New York: 400-404

Fliege, R., Flügge, U.I., Werdan, K. und Heldt, H.W. (1978). Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate and triosephosphates across the inner membrane of the envelope in spinach chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.*, **502**: 232-247.

Flügge, U.-I. (2000). Metabolite transport across the chloroplast envelope of C_3-plants. In: Photosynthesis: Physiology and metabolism, Kluwer Academic Press, New York

Flügge, U.I. und Heldt, H.W. (1991). Metabolite translocators of the chloroplast envelope. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **42**: 129-144

Frieden, C. (1970). Kinetic aspects of metabolic processes. The hysteretic enzyme concept. *J. Biol. Chem.*, **254**: 5788-5799

Gardemann, A., Schimkat, A. und Heldt, H.W. (1986). Control of CO_2 fixation. Regulation of stromal fructose-1,6-bisphosphatase in spinach by pH and Mg^{2+} concentration. *Planta*, **168**: 536-545

Gardemann, A., Stitt, M. und Heldt, H.W. (1983). Control of CO_2 fixation – regulation of spinach ribulose-5-phosphate kinase by stromal metabolite levels. *Biochim. Biophys. Acta.*, **722**: 51-60

Geck, M.K. und Hartmann, F.C. (2000). Kinetic and mutational analysis of the regulation of phosphoribulokinase by thioredoxins. *J. Biol. Chem.*, **275**: 18034-18039

Geck, M.K., Larimer, F.W. und Hartman, F.C. (1996). Identification of residues of spinach thioredoxin f that influence interactions with target enzymes. *J. Biol. Chem.*, **271**: 24736-24740.

Geiger, D.R. und Servaites, J.C. (1994a). Dynamics of self-regulation of photosynthetic carbon metabolism. *Plant Physiol. Biochem.*, **32**: 173-183

Geiger, D.R. und Servaites, J.C. (1994b). Diurnal regulation of photosynthetic carbon metabolism in C_3 plants. *Plant Mol. Biol.*, **45**: 234-256

Ghiron, C.A., Eftink, M.R., Porter, M.A. und Hartmann, F.C. (1988). Fluorescence studies of phosphoribulokinase, a light-regulated chloroplast enzyme**.** *Arch. Biochem. Biophys.*, **260**: 267-272

Gibbs, S.P. (1981). The chloroplast endoplasmatic reticulum: structure, function and evolutionary significance. *Int. Rev. Cytol.*, **72**: 49-99

Giddings, T.H.jr., Wasmann, C. und Staehelin, L.A. (1983). Structure of the thylakoids and envelope membranes of cyanelles of *Cyanophora paradoxa*. *Plant Physiol.*, **71**: 409-419

Gontero, B., Cárdenas, M.L. und Ricard, J.A (1988). functional five-enzyme complex of chloroplasts involved in the calvin-cycle. *Eur. J. Biochem.*, **173**: 437-443

Grauschopf, U., Winther, J.R., Korber, P., Zander, T., Dallinger, P. und Bardwell, J.C.A. (1995). Why is DsbA such an oxidizing disulfide catalyst? *Cell*, **83**: 947-955

Habash, D.Z., Parry, M.A.J., Parmar, S., Paul, M.J., Driscoll, S., Knight, JJ., Gray, J.C. und Lawlor, D.W. (1996). The regulation of component processes of photosynthesis in transgenic tobacco with decreased phosphoribulokinase activity. *Photosynt. Res.*, **49**: 159-167

Hariharan, P., Johnson, P.J. und Cattolico, R.A. (1998). Purification and characterisation of phosphoribulokinase from the marine chromophytic alga *Heterosigma carterae*. *Plant Physiol.*, **117**: 321-329

Harris, G.C. und Königer, M. (1997). The 'high' concentrations of enzymes within the chloroplast. *Photosyn. Res*., **54**: 5-23

Harrison, D.H.T., Runquist, J.A., Holub, A. und Miziorko, H.M. (1998). The crystal structure of phosphoribulokinase from *Rhodobacter sphaeroides* reveals a fold similar to that of adenylate kinase. *Biochemistry*, **37**: 5074-5085

Hartman H., Syvanen, M. und Buchanan, B.B. (1990). Contrasting evolutionary histories of chloroplast thioredoxins f and m. *Mol. Biol. Evol.*, **7**: 247-254

Hashimoto, H. (1997). Electron-opaque annular structure girdling the constricting isthmus of deviding chloroplast of *Hetersigma akashiwo* (Raphidophyceae, Chromophyta). *Protoplasma*, **197**: 210-216

Heber, U. und Santarius, K.A. (1970). Direct and indirect transfer of ATP and ADP across the chloroplast envelope. *Z. Naturforsch.*, **25**: 139-168

Heldt, H.W. und Flügge, U.I. (1992). Metabolite transport in plant cells. In: Tobin, A.K. (ed.), Plant organells – Compartmentation of metabolism in photosynthetic cells. Cambridge University Press, Cambridge

Heldt, H.W. und Sauer, F. (1971). The inner membrane of the chloroplast envelope as the site of specific metabolite transport. *Biochim. Biophys. Acta.*, **234**: 83-91

Henze, K. und Martin, W. (2001). How do mitochondrial genes get into the nucleus? *TRENDS in Genetics*, **17**: 383-387

Hermoso, R., Castillo, M., Chueca, A., Lazaro, J.J., Sahrawy, M., und Gorge, J.L. (1996). Binding site on pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase involved in the interaction with thioredoxin. *Plant Mol. Biol.*, **30**: 455-465

Hermoso, R., Lazaro, J.J., Chueca, A., Sahrawy, M. unGorge, L.J. (1999). Purification and binding features of a pea fructose-1,6-bisphosphatase domain involved in the interaction with thioredoxin f. *Physiologia Plantarum*, **105**: 756-762

Hertig, C.M. und Wolosiuk, R.A. (1983). Studies on the hysteretic properties of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *J. Biol. Chem.*, **258**: 984-989

Heukeshoven, J. und Dernick, R. (1986). Färbemethoden für Elektrophorese-Gele. Information Fa. Pharmacia: SD RE-066

Hirasawa, .M., Schürmann, P. Jacquot, J.-P., Manieri, W., Jacquot, P., Keryer, E., Hartman, F.C. und Knaff, D.B. (1999). Oxidation-reduction properties of chloroplast thioredoxins, ferredoxin:thioredoxin reductase, and thioredoxin f-regulated enzymes. *Biochemistry*, **38**:5200-5205

Hirasawa, M., Brandes, H.K., Hartman, F.C. und Knaff, D.B. (1998). Oxidation-reduction properties of the regulatory site of spinach phosphoribulokinase. *Arch Biochem. Biophys.*, **350**: 127-131

Huppe, H.C., Farr, T.J. und Turpin, D.H. (1994). Coordination of chloroplastic metabolism in N-limited Chlamydomonas reinhardtii by redox-modulation. II. Redox modulation activates the oxidative pentose phosphate pathway during photosynthetic nitrate assimilation. *Plant Physiol.*, **105**: 1043-1048

Hutchison, R.S. und Ort, D.R. (1995). Measurement of equilibrium midpoint potentials of thiol/disulfide regulatory groups in thioredoxin activated chloroplast enzymes. *Meth. Enzymol.*, **252**: 220-228

Iyer, K.S. und Klee, W.A. (1973). Direct spectrophotometric measurement of the rate of reduction of disulfide bonds. The reactivity of the disulfide bonds of bovine lactalbumin. *J. Biol. Chem.,* **248:** 707-710

Jacqout, J.P., Lopez-Jaramillo, J., Chueca, A., Cherfils, J., Lemaire, S., Chedozeau, B., Miginiac-Maslow, M., Decettignies, P., Wolosiuk, R.A. und Lopez-Gorgé, J. (1995). High-level expression of recombinant pea chloroplast-1,6-bisphosphatase and mutagenesis of its regulatory site. *Eur. J. Biochem.*, **229**: 675-681

Jacquot, J.-P., Lanvelin, J.-M. und Meyer, Y. (1997a). Thioredoxins: structure and function in plant cells. *New. Phytol.*, **136**: 543–570

Jacqout, J.P., Lopez-Jaramillo, J., Miginiac-Maslow, M., Lemaire, S., Cherfils, J., Chueca, A., und Lopez-Gorgé, J. (1997b). Cysteine-153 is required for redox regulation of pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *FEBS Lett.*, **401**: 143-147

Jeffrey, S.W. und Humphrey, G.F. (1975). New spectrophotometric equations for determining chlorophylls a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanz.*, **167**: 191-204

Jensen, R.A. (1985). The shikimate/arogenate pathway: Link between carbohydrate metabolism and secondary metabolism. *Physiol. Plant*, **66**: 164-168

Joelson, T., Sjöberg, B.-M. und Eklund, H. (1990). Modifications of the active center of T4 thioredoxin by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, **265**: 3183-3188

Kamo, M., Tsugita, A., Wiessner, C., Wedel, N., Bartling, D., Herrmann, R.G., Aguilar, F., Gardet-Salvi, L. und Schürmann, P. (1989). Primary structure of spinach chloroplast thioredoxin f: Protein sequencing and analysis of complete cDNA clones for spinach chloroplast thioredoxin f. *Eur. J. Biochem.*, **182**: 315-322

Karpinski, S., Escobar, C., Karpinska, B., Creissen, G. und Mullineaux, P.M. (1997). Photosynthetic electron transport regulates the expression of cytosolic ascorbate peroxidase genes in *Arabidopsis* during excess light stress. *Plant Cell*, **9**: 627-640

Katti, S.K., LeMaster, M.D. und Eklund, H. (1990). Crystal structure of thioredoxin from *Escherichia coli* at 1.68 Å resolution. *J. Mol. Biol.*, **212**: 167-184

Khyse-Anderson, N.I. (1984). Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for a rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Biochem. Biophys. Meth.*, **10**: 203-209

Knaff, D.B. (2000). Oxidation-reduction properties of thioredoxins and thioredoxin-regulated enzymes. *Physiologia plantarum*, **110**: 309-313

Kombrink, E. und Wöber, G. (1982). Chloroplast phosphofructokinase in the green alga *Dunaliella marina*: Partial purification and kinetic and regulatory properties. *Arch. Biochem. Biophys.*, **213**: 602-619.

Krepinsky, K., Plaumann, M., Martin, W. und Schnarrenberger, C. (2001). Purification and cloning of chloroplast 6-phosphogluconate dehydrogenase from spinach. Cyanobacterial genes for chloroplast and cytosolic isoenzymes encoded in eukaryotic chromosomes. *Eur. J. Biochem.*, **268**: 2678-2686.

Krieger, T.J. und Mizirko, H.M. (1987). Spinach leaf ribulose-5-phosphate kinase: Examination of sulfhydryls by chemical modification and spin-labeling. *Arch. Biochem. Biophys*., **256**: 362-371

Krieger, T.J., Mende-Mueller, L. und Mizirko, H.M. (1987). Phosphoribulokinase: Isolation and sequence determination of the cysteine-containing active-site peptide modified by 5´-*p*-fluorosulfonylbenzoyladenosine. *Biochim. Biophys. Acta.*, **915**: 112-119

Kröger, N. und Sumper, M. (1998). Diatom cell wall proteins and the cell biology of biomineralization. *Protist*, **149**: 213-219

Kröger, N., Deutzmann, R. und Sumper, M. (1999). Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science*, **286**: 1129-1132

Kroth, P.G. (1993). Lokalisation und Struktur der Gene der plastidären ATPase in der Kieselalge Odontella sinensis. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Kroth, P.G. (2000). Sekundäre Endocytobiosen und ihre Bedeutung für Struktur und Funktion der Plastiden. Habilitationsschrift, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**: 680-685.

Lang, M. (2000). Untersuchung zum Transport kernkodierter Plastiden-Proteine in Kieselalgen. Dissertation Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Laurent, T.C., Moore, E.C. und Reichard, P. (1964). Enzymatic synthesis of desoxyribonucleotides. IV: Isolation and characterization of thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.*, **239**: 3436-3444

Lazaro, J.J., Sutton, C.W., Nicholson, S. und Powels, R. (1986). Characterisation of two forms of phosphoribulokinase isolated from the green alga, *Scenedesmus obliquus*. *Eur. J. Biochem.*, **156**: 423-429

Lebreton, S., Gontero, B., Avilan, L., und Ricard, J. (1997a). Memory and imprinting effects in multienzyme complexes II. Kinetics of the bienzyme complex from *Chlamydomonas reinhardtii* and hysteretic activation of chloroplast oxidized phosphoribulokinase. *Eur. J. Biochem.*, **246**: 85-91

Lebreton, S., Gontero, B., Avilan, L., und Ricard, J. (1997b). Information transfer in multienzyme complexes 1. Thermodynamics of conformational constraints and memory effects in the bienzyme glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase-phosphoribulokinase complex of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast. *Eur. J. Biochem.*, **250**: 286-295

Lees, W.J. und Whitesides, G.M. (1993). Equilibrium constants for thiol-disulfide interchange reactions: a coherent, corrected set. *J. Org. Chem.*, **58**: 642-647

Lemaire, S.D., Stein, M., Issakidis-Bourguet, E., Keryer, E., Benoit, V., Pineau, B., Gérard-Hirne, C., Miginiac-Maslow, M. und Jacquot, J.-J. (1999). The complex regulation of ferredoxin/thioredoxin-related genes by light and the circadian clock. *Planta*, **209**: 221-229

Lemieux, C., Otis, C. und Turmel, M. (2000). Ancestral chloroplast genome in *Mesostigma viride* reveals an early branch of green plant evolution. *Nature*, **403**: 649-652

Li, A.D., Stevens, F.J., Huppe, H.C., Kersanach, R. und Anderson, L.E. (1997). *Chlamydomonas reinhardtii* NADP-linked glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase contains the cysteine residues identified as potentially domain-locking in the higher plant enzyme and is light activated. *Photosynthesis Res.*, **51**: 167-177

Li, D., Stevens, F.J., Schiffer, M. und Anderson,L.E. (1994). Mechanism of light modulation: Identification of potential redox-sensitive cysteines distal to the catalytic site in light-activated chloroplast enzymes. *Biophys. J.*, **67**: 29-35

Liaud, M.-F., Lichtle, C., Apt, K., Martin, W. und Cerff, R. (2000). Compartment-specific isoforms of TPI and GAPDH are imported into diatom mitochondria as a fusion protein: evidence in favor of a mitochondrial origin of eukaryotic glycolytic pathway. *Mol. Biol. Evol.*, **17**:213-223

Löffelhardt, W. und Bohnert, J.J. (1994). In: The molecular biology of cyanobacteria. Bryant, D.A. ed., Kluwer Academic Press, Dordrecht: 29-66

Lundström, J. und Holmgren, A. (1993). Determination of the reduction-oxidation potential of the thioredoxin-like domains of protein disulfide-isomerase from the equilibrium with glutathione and thioredoxin. *Biochemistry*, **32**: 6649-6655.

Magnussen, C. und Gibbs, S.P. (1980). Behavior of chloroplast ER during chloroplast division in *Olisthodiscus luteus* (Chrysophyceae). *J. Phycol.*, **16**: 303-305

Maier, U.G. (1992). The four genomes of the alga *Pyrenomonas salina* (Cryptophyta). *BioSystems*, **28**: 69-73

Martin, W. und Herrmann, R.G. (1998). Gene transfer to the nucleus: How much, what happens, and why? *Plant Physiol.*, **118**: 9-17

Martin, W. und Schnarrenberger, C. (1997). The evolution of the Calvin cycle from prokaryotic to eukaryotic chromosomes: a case study of functional redundancy in ancient pathways through endosymbiosis. *Current Genetics*, **32**: 1-18

Martin, W., Mustafa, A.Z., Henze, K. und Schnarrenberger, C. (1996). Higher-plant chloroplastic and cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase isoenzymes: origins via duplication rather than prokaryote-eukaryote divergence. *Plant Mol. Biol.*, **32**: 485-491

Martin, W., Scheibe, R. und Schnarrenberger, C. (2000). The calvin cycle and its regulation. In: *Photosynthesis: Physiology and metabolism*, Kluwer Academic Press, NY

Martin, W., Stoebe, B., Goremykin, V., Hapsmann, S., Hasegawa, M. und Kowallik, K.V. (1998). Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature*, **393**:162-165

Mayer, C. und Schmid, A.-M. (1995). Morphology, cell-cycle, and growth-rates of *Odontella regia*. *Diatom Res.*, **10**: 299-320.

McFadden, G.I., Igloi, G.L. und Maier, U.G. (1994). The smallest known eukaryotic genomes encode a protein gene: towards an understanding of nucleomorph functions. *Mol. Gen. Genet.*, **243**: 600-604

Mereschkovsky, C. (1905). Über die Natur und den Ursprung der Chromatophoren im Planzenreiche. *Biol. Centr.*, **25**: 593-604 und 689-691

Mertens, R. (1997). Biochemische Untersuchungen an isolierten Chloroplasten aus Diatomeen. Staatsexamensarbeit an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Milanez, S., Mural, R.J. und Hartmann F.C. (1991). Roles of cysteinyl residues of phosphoribulokinase as examined by site-directed mutagenesis. *J. Biol. Chem.*, **266**: 10694-10699

Mills, W.R. und Joy, K.W. (1980). A rapid method for isolation of purified active chloroplasts used to study the intracellular distribution of amino acids in pea leaves. *Planta*, **148**: 75-83

Moore, E.C., Reichard, P. und Thelander, L. (1964). Enzymatic synthesis of desoxyribonucleotides. V: Purification and properties of thioredoxin reductase from *Escherichia coli* B. *J. Biol. Chem.*, **239**: 3445-3452

Mora-Garcia, S., Rodrriguez-Suárez, R. und Wolosiuk, R.A. (1998). Role of electrostatic interactions on the affinity of thioredoxin for target enzymes – recognition of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase by mutant *Escherichia coli* thioredoxins. *J. Biol. Chem.*, **273**: 16273-16280

Mössner, E., Huber-Wunderlich, M., Rietsch, A., Beckwith, J., Glockshuber, R. und Aslund, F. (1999). Importance of redox potential for the *in vivo* function of the cytoplasmic disulfide reductant thioredoxin from *Escherichia coli*. J. Biol. Chem., **274**: 25254-25259

Müller, B., Ziegler,.I und Ziegler, H. (1969). Lichtinduzierte reversible Aktivitätssteigerung der Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase in Chloroplasten. *Eur. J. Biochem.*, **9**: 101-106

Muller, E.G.D. und Buchanan, B.B. (1989). Thioredoxin is essential for photosynthetic growth. *J. Biol. Chem.*, **264**: 4008-4014.

Mustilli, A.C. und Bowler, C. (1997). Tuning in to the signals controlling photoregulated gene expression in plants. *EMBO J.*, **16**: 5801-5806

Nalin, C.M. und McCarty, R.E. (1984). Role of the disulfide bond in the γ-subunit in activation of the ATPase of chloroplast coupling factor 1. *J. Biol. Chem.*, **259**: 7275-7280

Neuhaus, G., Bowler, C., Hiratsuka, K., Yamagata, H. und Chua, N.-H. (1997). Phytochrome-regulated repression of gene expression requires calcium and cGMP. *EMBO J.*, **16**: 2554-2564

Nicholson, S., Easterby, J.S. und Powls, R. (1987). Properties of a multimeric protein complex from chloroplasts possessing potential activities of NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and phosphoribulokinase. *Eur. J. Biochem.*, **162**: 423-431

Nishizawa, A.A. und Buchanan, B.B. (1981). Enzyme regulation in C_4 photosynthesis – purification and properties of thioredoxin-linked fructose bisphosphatase and sedoheptulose bisphosphatase from corn leaves. *J. Biol. Chem.*, **256**: 6119-6126.

Nowitzki, U., Flechner, A., Kellerman, J., Hasegawa, M., Schnarrenberger, C. und Martin, W. (1998). Eubacterial origin of nuclear genes for chloroplast and cytosolic glucose-6-phosphate isomerase from spinach: sampling eubacterial gene diversity in eukaryotic chromosomes through symbiosis. *Gene*, **214**: 205-213

O'Brien, M.J., Easterby, J.S. und Powels, R. (1977). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Scenedesmus obliquus*. Effects of dithiothreitol and nucleotide on coenzyme specificity. *Biochem. Biophys. Acta*., **481**: 349-358

Ocheretina, O., Haferkamp, I., Tellioglu, H. und Scheibe, R. (2001).. Light-modulated NADP-malate dehydrogenases from mossfern and green algae: insights into evolution of the enzyme's regulation. *Gene*, **258**: 147-155

Omnaas, J., Porter, M.A. und Hartman, F.C. (1985). Evidence for a reactive cysteine at the nucleotide binding site of spinach ribulose-5-phosphate kinase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **236**: 646-653

Pacold, M.E., Anderson, L.E., Li, D. und Stevens, F.J. (1995). Redox sensitivity and light modulation of enzyme activity in the rhodophytes *Gracilaria tikvahiae* and *Chondrus crispus*. *J. Phycol.*, **31**: 297-301

Pancic, P.G. und Strotmann, H. (1993). Structure of the nuclear encoded γ subunit of CF_0CF_1 of the diatom *Odontella sinensis* including its presequence. *FEBS Lett.*, **320**: 61-66

Pohlmeyer, K., Paap, B.K., Soll, J. und Wedel, N. (1996). CP12: a small nuclear-encoded chloroplast protein provides novel insights into higher-plant GAPDH evolution. *Plant Mol. Biol.*, **32**: 969-978

Porter, M.A. und Hartmann, F.C. (1988). Catalytic nonessentiality of an active-site cysteinyl residue of phosphoribulokinase. *J. Biol. Chem.*, **263**: 14846-14849

Porter, M.A. und Hartmann, F.C. (1990). Exploration of the function of a regulatory sulfhydryl of phosphoribulokinase from spinach. *Arch. Biochem. Biophys.*, **281**: 330-334

Porter, M.A., Milanez, S., Stringer, C.D. und Hartman, F.C. (1986). Purification and characterization of ribulose-5-phosphate kinase from spinach. *Arch. Biochem. Biophys.*, **245**: 14-23

Porter, M.A., Stringer, C.D. und Hartman, F.C. (1988). Characterisation of the regulatory thioredoxin site of phosphoribulokinase. *J. Biol. Chem.*, **263**: 123-129

Portis, A.R. (1992). Regulation of ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activity. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **43**: 415-437

Pradel, J., Soulie, J.-M., Buc, J., Meunier, J.-M. und Ricard, J. (1981). On the activation of fructose-1,6-bisphosphatase of spinach chloroplasts and the regulation of the Calvin cycle. *Eur J. Biochem.*, **113**: 507-511

Price, G.D., Evans, J.R., von Caemmerer, S., Yu, J.-W., und Badger, M.R. (1995). Specific reduction of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity by antisense RNA reduces CO_2 assimilation via a reduction in ribulose bisphosphate regeneration in transgenic tobacco plants. *Planta*, **195**: 369-378

Racker, E. (1957). The reductive pentose phosphate cycle. I. Phosphoribulokinase and ribulose diphosphate carboxylase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **69**: 300-310

Raines, C.A., Willigham, N.M., Potts, S. und Deyer, T.A. (1992). cDNA and gene sequences of wheat chloroplast sedoheptulose-1,7-bisphosphatase reveal homology with fructose-1,6-bisphosphatase. *Eur. J. Biochem.*, **205**:1053-1059

Rault, M., Giudiciorticoni, M.T., Gontero, B. und Ricard, J. (1993). Structural and functional properties of a multienzyme-complex from spinach chloroplasts. 1.Stoichiometry of the polypeptides-chains. *Eur. J. Biochem.*, **217**: 1065-1073

Reichard, P. (1968). The biosynthesis of deoxyribonucleotides. *Eur. J. Biochem.*, **3**: 259-266

Reinfelder, J.R., Kraepiel, A.M. und Morel, F.M.M. (2000). Unicellular C_4 photosynthesis in a marin diatom. *Nature*, **407**: 996-1000

Riddles, W.P., Blakeley, R.L. und Zerner, B. (1979). Ellman´s reagent: 5,5´-Dithiobis (2-nitobenzoic acid) – a reexamination. *Anal. Biochem.*, **94**: 75-81

Riebesell, U. (2000). Carbon fix for a diatom. *Nature*, **407**: 1000-1001

Robinson, S.P. und Wiskich, C. (1977). Pyrophosphate inhibition of carbon dioxide fixation in isolated pea chloroplasts by uptake in exchange for endogenous adenine nucleotides. *Plant Physiol.*, **59**: 422-427

Roessler, P.G. (1987). UDP-Glucose pyrophosphorylase activity in the diatom *Cyclotella cryptica*. Pathway of chrysolaminarin synthesis. *J. Phycol.*, **23**: 494-498

Rowland, P., Basak, A.K., Gover, S. Levy, H.R. und Adams, M.J. (1994). The three-dimensional structure of glucose 6-phosphate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* refined at 2.0 Å resolution. *Structure*, **2**: 1073-1087.

Ruelland, E. und Miginiac-Maslow, M. (1999). Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: activation or relief from inhibition? *Trends in plant science*, **4**: 136-141

Runquist, J.A., Harrison, D.H.T. und Mizirko, H.M. (1998a). Functional evaluation of invariant arginines situated in the mobile lid domain of phosphoribulokinase. *Biochemistry*, **37**: 1221-1226

Runquist, J.A., Harrison, D.H.T. und Mizirko, H.M. (1998b). Functional evaluation of invariant arginines in the mobile lid of phosphoribulokinase. *FASEB J.*, **12**: 280-286

Runquist, J.A., Harrison, D.H.T. und Mizirko, H.M. (1999). *Rhodobacter sphaeroides* phosphoribulokinase: Identification of lysine-165 as a catalytic residue and evaluation of the contribution of invariant basic amino acids to ribulose-5-phosphate binding. *Biochemistry*, **38**: 13999-14005

Sahrawy, M., Chueca, A., Hermoso, R., Lazaro, J.J. und Lopez-Gorge, J. (1997). Direct mutagenesis shows that the preceding region of the chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase regulatory sequence is the thioredoxin docking site. *J. Mol. Biol.*, **296**: 623-630

Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R,. Horn, G.T. Mullis, K.B. und Ehrlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**: 487-491

Sambrook, J., Fritsch, E.F.O und Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Sandbaken, M.G., Runquist, J.A., Barbieri, J.T. und Mizirko, H.M. (1992). Identification of the phosphoribulokinase sugar phosphate binding domain. *Biochemistry*, **31**: 3715-3719

Sanger, F. und Coulson, A.R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *J. Mol. Biol.*., **94**:441-448.

Scheibe, R. (1981). Thioredoxin in pea chloroplasts: Concentration and redox state under light and dark conditions. *FEBS Lett.*, **133**: 301-304

Scheibe, R. (1990). Light/dark modulation: Regulation of chloroplast metabolism in a new light. *Bot. Acta*, **103**: 327-334

Scheibe, R. (1991). Redox-Modulation of chloroplast enzymes. A common principle for individual control. *Plant Physiol.*, **96**: 1-3

Scheibe, R. und Anderson, L.E. (1981). Dark modulation of NADP-dependent malate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in the chloroplast. *Biochem. Biophys. Acta*, **636**: 58-64

Scheibe, R., Baalmann, E., Backhausen, J.E., Rak, C. und Vetter, S. (1996). C-terminal truncation of spinach NAD(P)-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase prevents inactivation and reaggregation. *Biochem. Biophys. Acta*, **296**: 228-234

Scheibe, R., Geissler, A. und Fickenscher, K. (1989). Chloroplast glucose-6-phosphate dehydrogenase: K_m shift upon light modulation and reduction. *Arch. Biochem. Biophys.*, **274**: 290-297

Schnarrenberger, C., Flechner, A. und Martin, W. (1995). Enzymatic evidence for a complete oxidative pentose phosphate pathway in chloroplasts and an incomplete pathway in the cytosol of spinach leaves. *Plant Physiol.*, **108**: 609-614

Schnarrenberger, C., Oeser, A. und Tolbert, N.E. (1973). Two isoenzymes each of glucose-6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase in spinach leaves. *Arch. Biochem. Biophys.*, **154**: 438-448

Schroers, Y. (2000). Untersuchung der plastidären Fructose-1,6-Bisphosphat Aldolase und der Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase aus Diatomeen: Staatsexamensarbeit Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf.

Schürmann, P. und Wolosiuk, R.A. (1978). Studies on the regulatory properties of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Biochim. Biophys. Acta.*, **522**: 130-138

Schürmann, P., Wolosiuk, R:A., Breazeale, V.D. und Buchanan, B.B. (1976). Two proteins function in the regulation of photosynthetic CO_2 assimilation in chloroplasts. *Nature*, **263**: 257 – 258

Schwarz, O., Schürmann, P. und Strotman, H. (1997). Kinetics and thioredoxin specificity of thiol modulation of the chloroplast H^+-ATPase. *J. Biol. Chem.*, **272**:16924-16927

Smetacek, V. (1999). Diatoms and the ocean carbon cycle. *Protist*, **150**: 25-32

Staples, C.R., Ameyibor, E., Fu, W., Gardet-Salvi, L., Stritt-Etter, A.-L., Schürmann, P. Knaff, D.B und Johnson, M.K. (1996). The function and properties of the iron-sulfur center in spinach ferredoxin:thioredoxin reductase: A new biological role for iron-sulfur cluster. *Biochemistry*, 35: 11425-11434

Staples, C.R., Gaymard, E., Stritt-Etter, A.-L., Telser, J., Hoffmann, B.M., Schürmann, P. Knaff, D.B. und Johnson, M.K. (1998). Role of the [Fe4S4] cluster in mediating disulfide reduction in spinach ferredoxin:thioredoxin reductase. *Biochemistry*, **37**: 4612-4620

Stein, M., Lazaro, J.J. und Wolosiuk, R.A. (1989). Concerted action of cosolvents, chaotropic anions and thioredoxin on chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase - reactivity to iodoacetamide. *Eur. J. Bioch.*, **185**: 425-431

Stitt, M. (1996). Metabolic regulation of photosynthesis. In: Photosynthesis and the Environment. Kluwer Academic Press, New York

Stitt, M. und Rees, T. (1980). Estimation of the activity of the oxidative pentose phosphate pathway in pea chloroplasts. *Phytochemistry*, **19**: 1583-1585

Studier, F.W., und Moffat, B.A. (1986). Use of bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J. Mol. Biol.*, **189**: 113-130

Stump, M.T., Matohashi, K. und Hisabori, T. (1999). Chloroplast thioredoxin mutants without active site cysteines can facilitate the reduction of the regulatory disulfide bridge on the gamma subunit of chloroplast ATP synthase. *Biochem. J.*, **341**: 157-163

Sültemeyer, D. (1998). Carbonic anhydrase in eukaryotic algae: Characterisation, regulation and possible function during photosynthesis. *Can. J. Bot.*, **76**: 962-972

Süss, K.-H., Arkona, C., Manteuffel, R. und Adler, K. (1993). Calvin cycle multienzyme complexes are bound to chloroplast thylakoid membranes of higher plants in situ. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**: 5518-5541

Tamoi, M., Murakami, A., Takeda, T. und Shigeoka, S. (1998). Lack of light/dark regulation of enzymes involved in the photosynthetic carbon reduction cycle of cyanobacteria *Synechococcus* PCC7942 and *Synechocystis* PCC 6803. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**: 374-376.

Teige, M. (1994). Charakterisierung von Calvinzyklus-Enzymen *in vitro* und *in vivo*. Dissertation Universität Hannover

Tréguer, P., Nelson, D.M., van Bennekom, A.J., de Master, D.J., Leynaert, A. und Quéguiner, B. (1995). The silica balance in the world ocean: A reestimate. *Science*, **268**: 375-379

Van den Hoek, C., Jahns, H.M. und Mann, D.G. (1993). In: Algen. Georg Thieme Verlag, New York: 102-125

Vårum, K.M. und Myklestad, S. (1984). Effects of light, salinity and nutrient limitation on the production of β-1,3-D-Glucan and Exo-D-Glucanase activity in *Skeletonema costatum* (Grev.) Cleve. *J. Exp. Marin Biol. Ecol.*, **83**: 13-25

Villeret, V., Huang, S., Zhang, Y., Xue, Y. und Lipscomb, W.M. (1995). Crystal structure of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase at 2,8 Å resolution. *Biochemistry*, **34**: 4299-4306

Vrieling, E.G., Gieskes, W.W.C. und Beelen, T.P.M. (1999). Silicon deposition in diatoms: Control by the pH inside the silicon deposition vesicle. *J. Phycol.*, **35**: 548-559

Wadano, A., Kamata, Y., Iwaki, T, Nishikawa, K und Hirahashi, T. (1995). Purification and characterisation of phosphoribulokinase from the cyanobacterium *Synechococcus* PCC7942. *Plant Cell Physiol.*, **36**: 1381-1385

Wangensteen, O.S., Chueca, A., Hirasawa, M., Sahrawy, M., Knaff, D.B. und Gorge, J.L. (2001). Binding features of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase - thioredoxin interaction. *Biochim. Biophys. Acta. - Prot. Struct. Mol. Enzymol.*, **1547**: 156-166

Wedel, N. und Soll, J. (1998). Evolutionary conserved light regulation of Calvin cycle activity by NADPH-mediated reversible phosphoribulokinase/CP12/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complex dissociation. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **95**: 9699-9704

Wedel, N., Clausmeyer, S., Herrmann, R.G., Gardet-Salvi, L. und Schürmann, P. (1992). Nucleotide sequence of a cDNA encoding the entire precurser polypeptide for thioredoxin m from spinach chloroplasts. *Plant Mol. Biol.*, **18**: 527-533

Wedel, N., Soll, J. und Paap, B.K. (1997). CP12 provides a new mode of light regulation of Calvin cycle activity in higher plants. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **94**: 10479-10484

Wenderoth, I., Scheibe, R. und von Schaewen, A. (1997). Identification of the cystein residues involved in redox modification of plant plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **272**: 26985-26990

Wendt, U.K., Hauschild, R., Lange, C., Pietersma, M., Wenderoth, I. und von Schaewen, A. (1999). Evidence for functional convergence of redox regulation in G6PDH isoforms of cyanobacteria and higher plants. *Plant Mol. Biol.*, **40**: 487-494

Wendt, U.K., Wenderoth, I., Tegeler, A. und von Schaewen, A. (2000). Molecular characterization of a novel glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Plant J.*, **23**: 723-733

Whatley, J.M., John, P. und Whatley, F.R. (1979). From extracellular to intracellular: The establishment of mitochondria and chloroplasts. *Proc. R. Soc. London*, **204**: 165-187

Whitesides, G.M., Lilburn, J.E. und Szajewski, R.P. (1977). Rates of thiol-disulfide interchange reactions between mono and dithiols and Ellman´s reagent. *J. Org. Chem.*, **42**: 332-338

Wittpoth, C. (1996). Isolierung und Charakterisierung von Plastiden aus Kieselalgen. Inaugural-Dissertation, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

Wittpoth, C., Kroth, P.G., Weyrauch, K., Kowallik, K.V. und Stromann, H. (1998). Functional characterization of isolated plastids from two marine diatoms. *Planta*, **206**: 79-85

Wolosiuk, R.A. und Buchanan, B.B (1976). Photosynthetic regulatory protein found in animal and bacterial cells. *Nature*, **264**: 669 –670

Wolosiuk, R.A und Buchanan, B.B. (1977). Thioredoxin and glutathion regulate photosynthesis in chloroplast. *Nature*, **266**: 565-567

Wolosiuk, R.A. und Buchanam, B.B (1978). Regulation of phosphoribulokinase by the ferredoxin/thioredoxin system. *Arch. Biochem. Biophys.*, **189**: 97-101

Wolosiuk, R.A., Ballicora, M.A. und Hagelin K. (1993). The reductive pentose phosphate cycle for photosynthetic CO_2 assimilation: enzyme modulation. *FASEB Journal*, **7**: 622-636

Wolosiuk, R.A., Crawford, N.A., Yee, B.C. und Buchanan, B.B. (1979). Isolation of three thioredoxins from spinach leaves. *J. Biol. Chem.*, **254**: 1627-1632

Wolosiuk, R.A., Perelmuter, M.E. und Chehebar, C. (1980). Enhancement of chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase activity by fructose-1,6-bisphosphate and dithiol-reduced thioredoxin. *FEBS Lett.*, **109**: 283-293

Woodrow, I.E. (1982). Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase from wheat chloroplasts. *Meth. Enzymol.*, **90**: 392-396

Woodrow, I.E. und Berry, J.A. (1988). Enzymic regulation of photosynthetic CO_2 fixation in C_3 plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, **39**: 533-594

Woodrow, I.E. und Walker, D.A. (1980). Light-mediated activation of stromal sedoheptulose bisphosphatase. *Biochem. J.*, **191**: 845-849

Woodrow, I.E. und Walker, D.A. (1982). Activation of wheat chloroplast sedoheptulose bisphosphatase: A continuous spectrophotometric assay. *Arch Biochem Biophys*, **216**: 416-422

Woodrow, I.E., Murphy, J.M. und Latzko, E. (1984). Regulation of sedoheptulose-1,7-bisphosphatase activity by pH and Mg^{2+} concentration. *J. Biol. Chem.*, **259**: 3791-3795

Yu, J.-S. und Noll, K.M. (1995). The thermophilic bacterium *Thermatoga neapolitana* posseses two isoenzymes of 3-phosphoglycerat kinase / triosephosphate isomerase fusion protein. *FEMS Microbiol. Lett*., **131**: 307-312

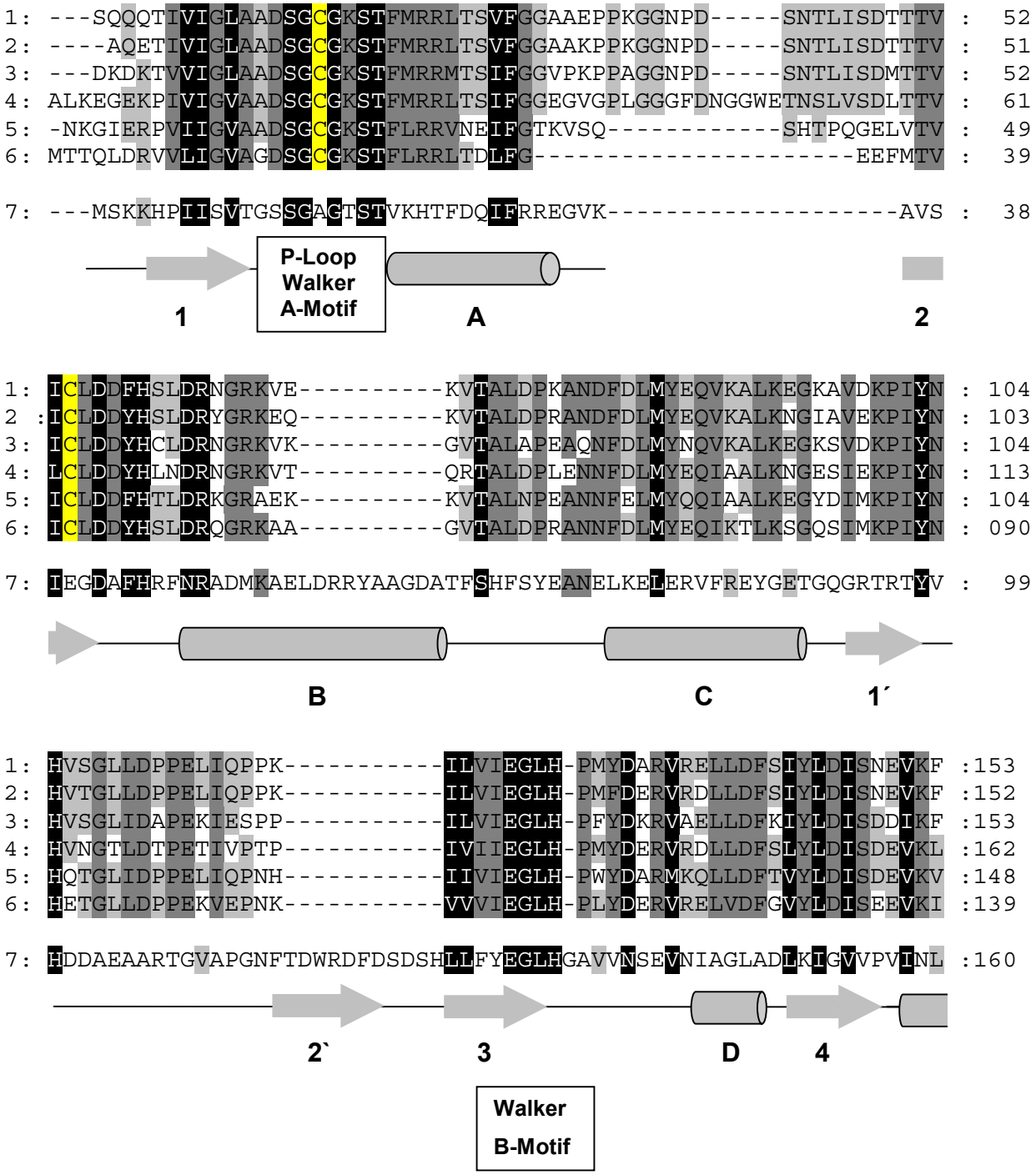
Ziegler, H. und Ziegler, I. (1965). The influence of light on the $NADP^{+}$-dependent glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase. *Planta*, **65**: 369-380

Zimmermann, G., Kelly, G.J. und Latzko, E. (1976). Efficient purification and molecular properties of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Eur. J. Biochem.*, **70**: 361-367

7 Anhang

7.1 Sequenzen und Sequenzvergleiche

Abb. A3-A: Vergleich der Aminosäure-Sequenz von eukaryotischen PRK´s und der PRK von *Rhodobakter sphaeroides*.
Der Sequenzvergleich zeigt die Sequenzen von 1. *Spinacia oleracea* (X07654); 2. *Arabidopsis thaliana* (X58149); 3. *Chlamydomonas reinhardtii* (M36123); 4. *Odontella sinensis* (Y08610); 5. *Galdieria sulphuraria* (persönliche Mitteilung Roland Krauß, Pflanzenphysiologie Osnabrück); 6. *Synechocystis* PCC6803 (M77134); 7. *Rhodobakter sphaeroides*. Aminosäuren sind entsprechend dem Grad der Konservierung verschieden unterlegt. Cysteine sind gelb unterlegt. Die Sekundärstruktur-Elemente der Kristall-Struktur von *R. sphaeroides* [PDB #1A7J (Harrison *et al.*, 1998)] sind unterhalb der Sequenz inklusive Bezeichnung dargestellt.



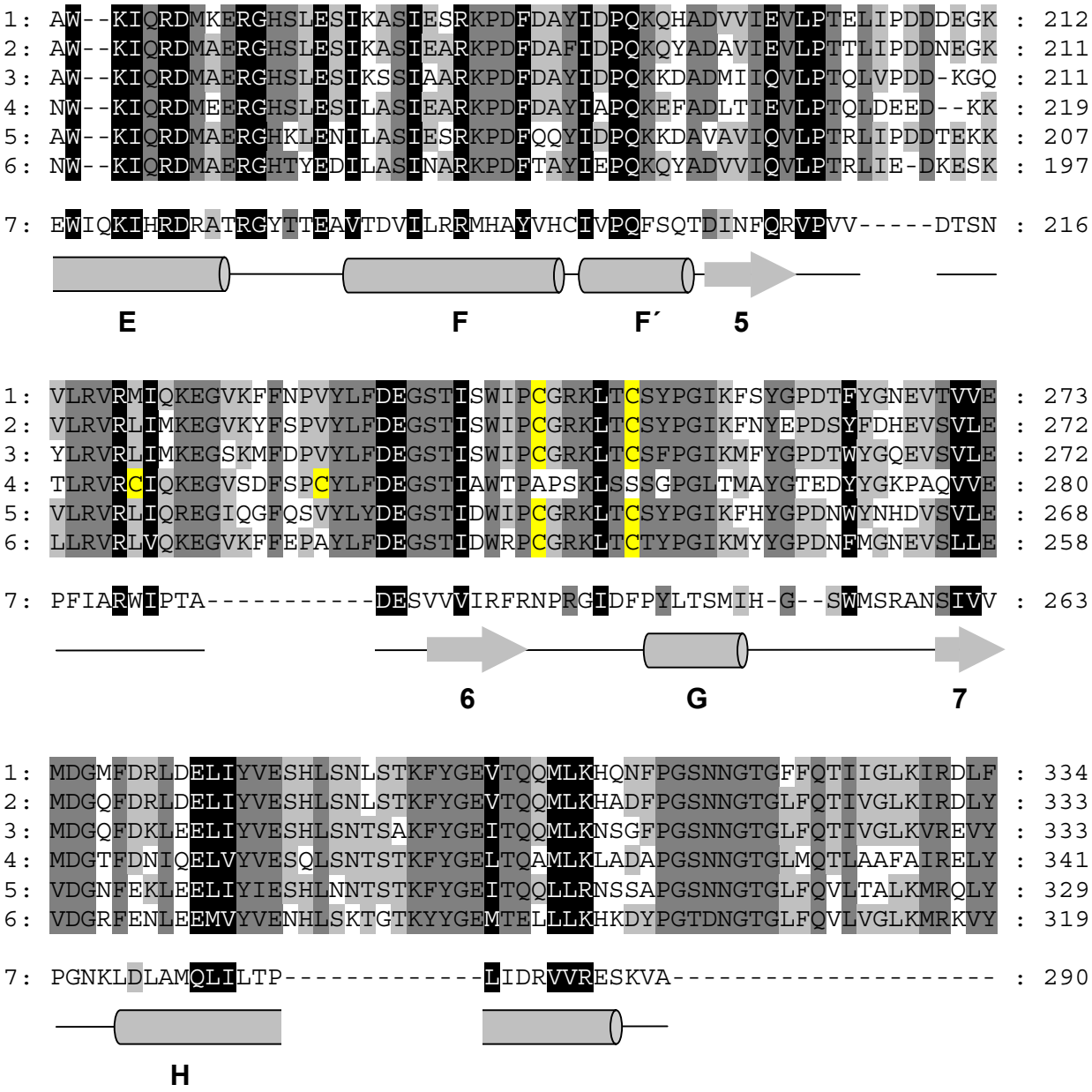

E
F
F´
5
6
G
7
H

Abb. A3-B: Nukleotid-Sequenzen des G6PDH/6PGDH-Fusions-Gens von *P. tricornutum*.
Die vorläufige Nukleotid-Sequenz des Gens für die G6PDH/6PGDH-Fusion wie sie sich aus der Kombination der cDNA- und genomischen DNA-Sequenz ergibt. Angegeben ist die Nukleotid-Sequenz mit Intron-Sequenzen. Die Sequenz die für den Leserahmen des Proteins kodiert ist grau hinterlegt und Intron-Bereiche sind ausgelassen und markiert. Die aus der Nukleotid-Sequenz abgeleitete Aminosäure-Sequenz ist im Leserahmen angegeben (die AS im Ein-Buchstaben-Kode ist jeweils unter dem mittleren Nukleotid des Kodons angegeben). Die 23 Aminosäuren die zwischen den beiden Dehydrogenasen liegen (Linker) sind dunkelgrau unterlegt.

```
.........10.........20.........30.........40.........50.........60.........70
GTCGACGCTTAAGAAAACCTCGTGTTCAGTGGTAAAGCAACCGAAATAGAATTTACGGGAGAAGTTCTCTC
    S  T  L  K  K  T  S  C  S  V  V  K  Q  P  K  *  N  L  R  E  K  F  S

.........80.........90.......100.......110.......120.......130.......140
CTTCCAAAGATTTCCAACCTAGCGGTATCTGACTGTGAGCTCGGACCTGCTAGCAGGAACAATAAACTCTT
P  S  K  D  F  Q  P  S  G  I  *  L  *  A  R  T  C  *  Q  E  Q  *  T  L

.......150.........160.......170.......180.......190.......200.......210
CTTATTTCTTCCCATCCAAATCGCAAGTCGTCGTTGGGTCTTTCACATAAGCGAATCTTTCAAGCCTCTTT
 L  I  S  S  H  P  N  R  K  S  S  L  G  L  S  H  K  R  I  F  Q  A  S  F

.......220.........230.......240.......250.......260.......270.......280
CCAGATCTCAAAGCAGACGAAGACAACAAGTATGACTACGTCAACCTTTCGCCGTCAGAGTGTCGTCGTTC
  Q  I  S  K  Q  T  K  T  T  S  M  T  T  S  T  F  R  R  Q  S  V  V  V

.......290.........300.......310.......320.......330.......340.......350
CCGTGGATACCATTGAAAATCAAGGAAATCCTGAAGTTATGGAGTGGCTCACCGTCTCCACCTTGAGTATA
P  V  D  T  I  E  N  Q  G  N  P  E  V  M  E  W  L  T  V  S  T  L  S  I

.......360.........370.......380.......390.......400.......410.......420
GTCGTCGTTGGTGCTTCCGGTGACTTGGCCAAGAAAAAAACCTTTCCAAGTTTGTTGAATCTGTATGATGA
 V  V  V  G  A  S  G  D  L  A  K  K  K  T  F  P  S  L  L  N  L  Y  D  D

.......430.........440.......450.......460.......470.......480.......490
CAATTTGTTGCCGAAGCACACCCGAATCTGGGGCTTTGCACGTTCAGACATGTCGGACGAAGAGTTGCGTG
  N  L  L  P  K  H  T  R  I  W  G  F  A  R  S  D  M  S  D  E  E  L  R

.......500.........510.......520.......530.......540.......550.......560
ATCGCTTGCGTCCTCATTTAACCGGGGATCATTCGAAAGAAGTCGTCGATCGCTTTTTAGCCCGGTGCGTC
D  R  L  R  P  H  L  T  G  D  H  S  K  E  V  V  D  R  F  L  A  R  C  V

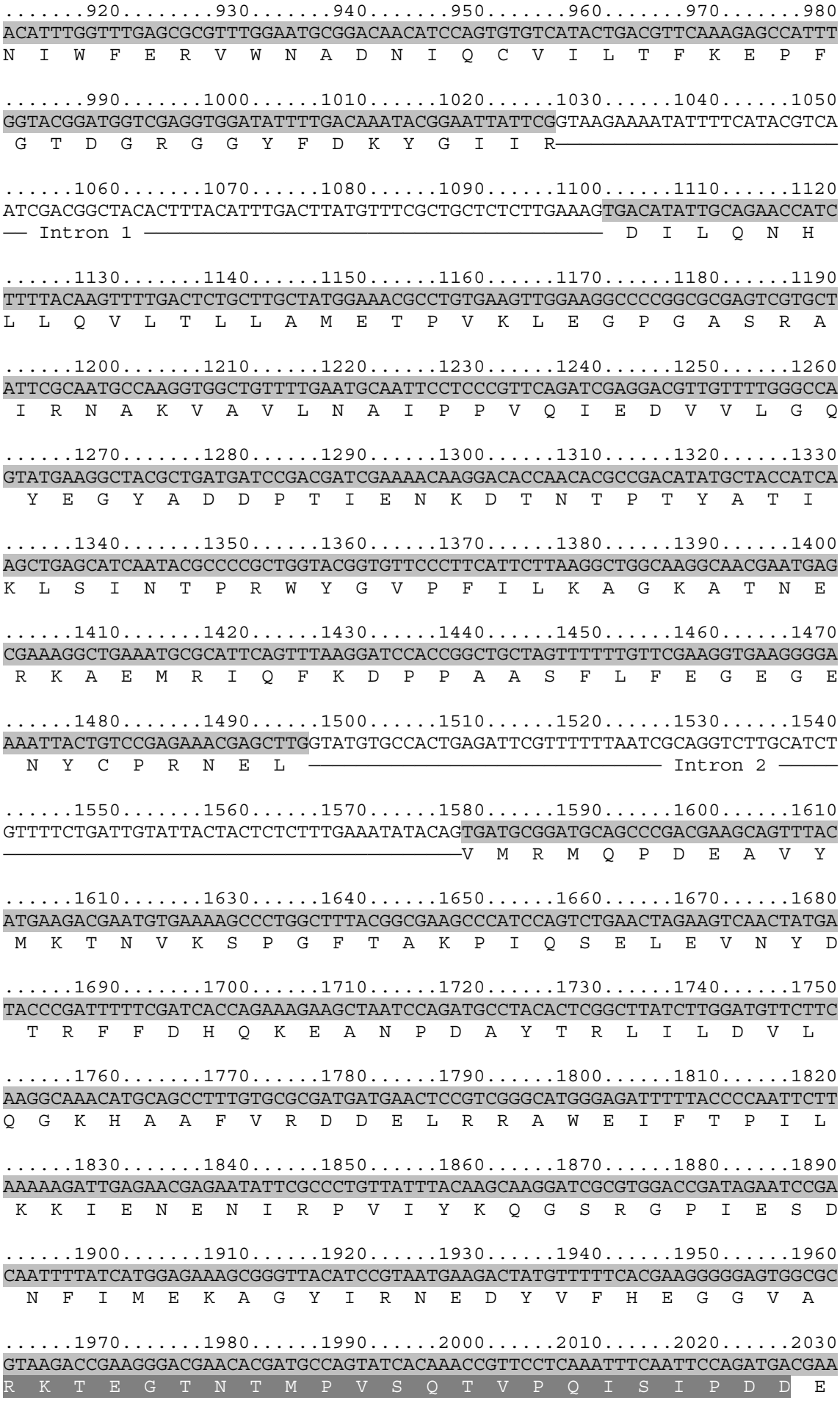
.......570.........580.......590.......600.......610.......620.......630
TACCGCAGTGGAACTTCCTACGGTGACCAAGATGCGTTCACTAAAATTAACCAAGATATGGAAGAGTACGA
 Y  R  S  G  T  S  Y  G  D  Q  D  A  F  T  K  I  N  Q  D  M  E  E  Y  E

.......640.........650.......660.......670.......680.......690.......700
ACGAGACCATCAAGATGTGAAGCACTACAATAGGCTGTTCTACTTTGCCATCCCTCCCAACGTTTTTGCGG
  R  D  H  Q  D  V  K  H  Y  N  R  L  F  Y  F  A  I  P  P  N  V  F  A

.......710.........720.......730.......740.......750.......760.......770
ATACTGCTCTAGCCATTAAAAAGACCTCTATGCAGGATGAAAGCAAGGGTTTCACCCGTTTGATTGTGGAG
D  T  A  L  A  I  K  K  T  S  M  Q  D  E  S  K  G  F  T  R  L  I  V  E

.......780.........790.......800.......810.......820.......830.......840
AAGCCCTTTGGTCGGGACTTAGAAAGCTTCGAAAAGCTGAACAAAACCTTGGCGGAGCATTTTTACGGAGG
 K  P  F  G  R  D  L  E  S  F  E  K  L  N  K  T  L  A  E  H  F  Y  G  G

.......850.........860.......870.......880.......890.......900.......910
ATCACATGTTTCGTATCGATCACTACCTTGGCAAGGAGATGGTGCAAAACTTGACCGTTTTACGTTTTCCA
  S  H  V  S  Y  R  S  L  P  W  Q  G  D  G  A  K  L  D  R  F  T  F  S
```


.....920.....930.....940.....950.....960.....970.....980
ACATTTGGTTTGAGCGCGTTTGGAATGCGGACAACATCCAGTGTGTCATACTGACGTTCAAAGAGCCATTT
N I W F E R V W N A D N I Q C V I L T F K E P F
.....990.....1000.....1010.....1020.....1030.....1040.....1050
GGTACGGATGGTCGAGGTGGATATTTTGACAAATACGGAATTATTCGGTAAGAAAATATTTTCATACGTCA
G T D G R G G Y F D K Y G I I R
.....1060.....1070.....1080.....1090.....1100.....1110.....1120
ATCGACGGCTACACTTTACATTTGACTTATGTTTCGCTGCTCTCTTGAAAGTGACATATTGCAGAACCATC
Intron 1 D I L Q N H
.....1130.....1140.....1150.....1160.....1170.....1180.....1190
TTTTACAAGTTTTGACTCTGCTTGCTATGGAAACGCCTGTGAAGTTGGAAGGCCCCGGCGCGAGTCGTGCT
L L Q V L T L L A M E T P V K L E G P G A S R A
.....1200.....1210.....1220.....1230.....1240.....1250.....1260
ATTCGCAATGCCAAGGTGGCTGTTTTGAATGCAATTCCTCCCGTTCAGATCGAGGACGTTGTTTTGGGCCA
I R N A K V A V L N A I P P V Q I E D V V L G Q
.....1270.....1280.....1290.....1300.....1310.....1320.....1330
GTATGAAGGCTACGCTGATGATCCGACGATCGAAAACAAGGACACCAACACGCCGACATATGCTACCATCA
Y E G Y A D D P T I E N K D T N T P T Y A T I
.....1340.....1350.....1360.....1370.....1380.....1390.....1400
AGCTGAGCATCAATACGCCCCGCTGGTACGGTGTTCCCTTCATTCTTAAGGCTGGCAAGGCAACGAATGAG
K L S I N T P R W Y G V P F I L K A G K A T N E
.....1410.....1420.....1430.....1440.....1450.....1460.....1470
CGAAAGGCTGAAATGCGCATTCAGTTTAAGGATCCACCGGCTGCTAGTTTTTTGTTCGAAGGTGAAGGGGA
R K A E M R I Q F K D P P A A S F L F E G E G E
.....1480.....1490.....1500.....1510.....1520.....1530.....1540
AAATTACTGTCCGAGAAACGAGCTTGGTATGTGCCACTGAGATTCGTTTTTTAATCGCAGGTCTTGCATCT
N Y C P R N E L Intron 2
.....1550.....1560.....1570.....1580.....1590.....1600.....1610
GTTTTCTGATTGTATTACTACTCTCTTTGAAATATACAGTGATGCGGATGCAGCCCGACGAAGCAGTTTAC
V M R M Q P D E A V Y
.....1610.....1630.....1640.....1650.....1660.....1670.....1680
ATGAAGACGAATGTGAAAAGCCCTGGCTTTACGGCGAAGCCCATCCAGTCTGAACTAGAAGTCAACTATGA
M K T N V K S P G F T A K P I Q S E L E V N Y D
.....1690.....1700.....1710.....1720.....1730.....1740.....1750
TACCCGATTTTTCGATCACCAGAAAGAAGCTAATCCAGATGCCTACACTCGGCTTATCTTGGATGTTCTTC
T R F F D H Q K E A N P D A Y T R L I L D V L
.....1760.....1770.....1780.....1790.....1800.....1810.....1820
AAGGCAAACATGCAGCCTTTGTGCGCGATGATGAACTCCGTCGGGCATGGGAGATTTTTACCCCAATTCTT
Q G K H A A F V R D D E L R R A W E I F T P I L
.....1830.....1840.....1850.....1860.....1870.....1880.....1890
AAAAAGATTGAGAACGAGAATATTCGCCCTGTTATTTACAAGCAAGGATCGCGTGGACCGATAGAATCCGA
K K I E N E N I R P V I Y K Q G S R G P I E S D
.....1900.....1910.....1920.....1930.....1940.....1950.....1960
CAATTTTATCATGGAGAAAGCGGGTTACATCCGTAATGAAGACTATGTTTTTCACGAAGGGGGAGTGGCGC
N F I M E K A G Y I R N E D Y V F H E G G V A
.....1970.....1980.....1990.....2000.....2010.....2020.....2030
GTAAGACCGAAGGGACGAACACGATGCCAGTATCACAAACCGTTCCTCAAATTTCAATTCCAGATGACGAA
R K T E G T N T M P V S Q T V P Q I S I P D D E

```
......2040.......2050......2060......2070......2080......2090......2100
CTTTGTGACATTGGAATCTTTGGTCAGTCTGTGATGGGAGCAAATCTTAGTCTTAATATCGCCGAGAGTGG
 L  C  D  I  G  I  F  G  Q  S  V  M  G  A  N  L  S  L  N  I  A  E  S  G

......2110.......2120......2130......2140......2150......2160......2170
ATTTCGTGTTGTTGTGGGCAATCGTACTCAGAAGAAGGTTGAGGCGACGGTACAGCGTGCCAAGGACGAAG
  F  R  V  V  V  G  N  R  T  Q  K  K  V  E  A  T  V  Q  R  A  K  D  E

......2180.......2190......2200......2210......2220......2230......2240
GAAACTTGCCGCTTGTTGGCTCCGATGGTCCTGAGCATTTTGTTTCGCAGTTAAAAAAGCCTCGCAAGGTC
G  N  L  P  L  V  G  S  D  G  P  E  H  F  V  S  Q  L  K  K  P  R  K  V

......2250.......2260......2270......2280......2290......2300......2310
ATCATCCTTGTACAAGCGGGAACGGCTGTCGATGATACAATATCGTCACTTGCAAAGTACTTGGAGCCTGG
 I  I  L  V  Q  A  G  T  A  V  D  D  T  I  S  S  L  A  K  Y  L  E  P  G

......2320.......2330......2340......2350......2360......2370......2380
AGACATCTTAATTGACGGAGGCAACGAGTGGTTCCCTAACAGTATTCGTCGTGGAGAGTTTCTGGAGCCGA
  D  I  L  I  D  G  G  N  E  W  F  P  N  S  I  R  R  G  E  F  L  E  P

......2390.......2400......2410......2420......2430......2440......2450
AGAACATCCATTTTCTCGGAATGGGCATTAGTGGAGGAGAAGAAGGAGCACGCAAAGGTCCATCTTTAATG
K  N  I  H  F  L  G  M  G  I  S  G  G  E  E  G  A  R  K  G  P  S  L  M

......2460.......2470......2480......2490......2500......2510......2520
CCGGGCGGACCGAAAGATGCGTACGATCTTGTCGAACCCATCTTGTCAAAATGCGCTGCTTATGTCGATGA
 P  G  G  P  K  D  A  Y  D  L  V  E  P  I  L  S  K  C  A  A  A  Y  V  D  E

......2530.......2540......2550......2560......2570......2580......2590
GGCCGGATCATGCGTTGGCTACGTAGGCCCAATTGGAGCAGTAAGTTGTTGGTGATATGCTTATTTATTGG
  A  G  S  C  V  G  Y  V  G  P  I  G  A ————————————————————————————

......2600.......2610......2620......2630......2640......2650......2660
CCAAGAAAGCCTTTCTCACAGTCAATGATTTCACACAACCACTTTTCTCTCAGGGGAACTACGTCAAGATG
—— Intron 3 ——————————————————————————————————— G  N  Y  V  K  M

......2670.......2680......2690......2700......2710......2720......2730
GTTCATAACGGCATTGAATACGGAGACATGCAATTAATCGCGGAAGTCTATGACACGATGAAAAGTACGCT
 V  H  N  G  I  E  Y  G  D  M  Q  L  I  A  E  V  Y  D  T  M  K  S  T  L

......2740.......2750......2760......2770......2780......2790......2800
GGGTATGTCCAATTTGGAAATAGCCGATGTCTTCGACGAATGGAATAAAAGTGAATTGGAATCTTATTTGA
  G  M  S  N  L  E  I  A  D  V  F  D  E  W  N  K  S  E  L  E  S  Y  L

......2810.......2820......2830......2840......2850......2860......2870
TCGAAATCACCGCCACGATTCTCCGCAAAAAGGATGATGAGACTGGTTGTGGGTACGTAATCGATTATATT
I  E  I  T  A  T  I  L  R  K  K  D  D  E  T  G  C  G  Y  V  I  D  Y  I

......2880.......2890......2900......2910......2920......2930......2940
TTGGACAAAACTGGCATGAAGGGCACTGGAAGGTGGACCATTCAGGAAGGAGCTGAAAGAGGTGTTGCAAT
 L  D  K  T  G  M  K  G  T  G  R  W  T  I  Q  E  G  A  E  R  G  V  A  I

......2950.......2960......2970......2980......2990......3000......3010
TTCTACTTTGGCTGCCGCTCTCGACGCTCGAATGCTGAGCGGATTGAAGGAGGAACGAGAAGTGGCGTCCA
  S  T  L  A  A  A  L  D  A  R  M  L  S  G  L  K  E  E  R  E  V  A  S

......3020.......3030......3040......3050......3060......3070......3080
AGGTACTTGATGAGCCATCAATGCAGAGTACAGATAAGACACAGGTAGTTGCGGATCTACGAGCAGCACTG
K  V  L  D  E  P  S  M  Q  S  T  D  K  T  Q  V  V  A  D  L  R  A  A  L

......3090.......3100......3110......3120......3130......3140......3150
TACGCGTCGAAAGTTTGTTCATACGCCCAAGGATTGAGTTTGATCAAAGCAGCTTCCGATGAGTATCAGTG
 Y  A  S  K  V  C  S  Y  A  Q  G  L  S  L  I  K  A  A  S  D  E  Y  Q  W
```

```
......3160.......3170......3180......3190......3200......3210......3220
GGACGTGGACCTTTCGGAATGTGCCCGCTTGTGGATGGGAGGATGCATCATTCGAGCAAAGTTGCTGGGGT
  D  V  D  L  S  E  C  A  R  L  W  M  G  G  C  I  I  R  A  K  L  L  G

......3230.......3240......3250......3260......3270......3280......3290
CAATTCGAGAAGCTTATTCGAAAAATTCCAATTTGTCGAATTTGCTTGTTGATGCCGGCTTCGCGTCGGCT
S  I  R  E  A  Y  S  K  N  S  N  L  S  N  L  L  V  D  A  G  F  A  S  A

......3300.......3310......3320......3330......3340......3350......3360
TTGAATGAGCGCTCAGTTGCCTGGAGAAGACTTATCGCTCTCTGTGTAACGAGCGGTGTCACGTGTTCGGC
 L  N  E  R  S  V  A  W  R  R  L  I  A  L  C  V  T  S  G  V  T  C  S  A

......3370.......3380......3390......3400......3410......3420......3430
TCTCTGCAATTCGTTAAGTTACTTTGATACGTACAGACGAGCTCGCCTCCCGGCCAACTTAACTCAGGCTC
  L  C  N  S  L  S  Y  F  D  T  Y  R  R  A  R  L  P  A  N  L  T  Q  A

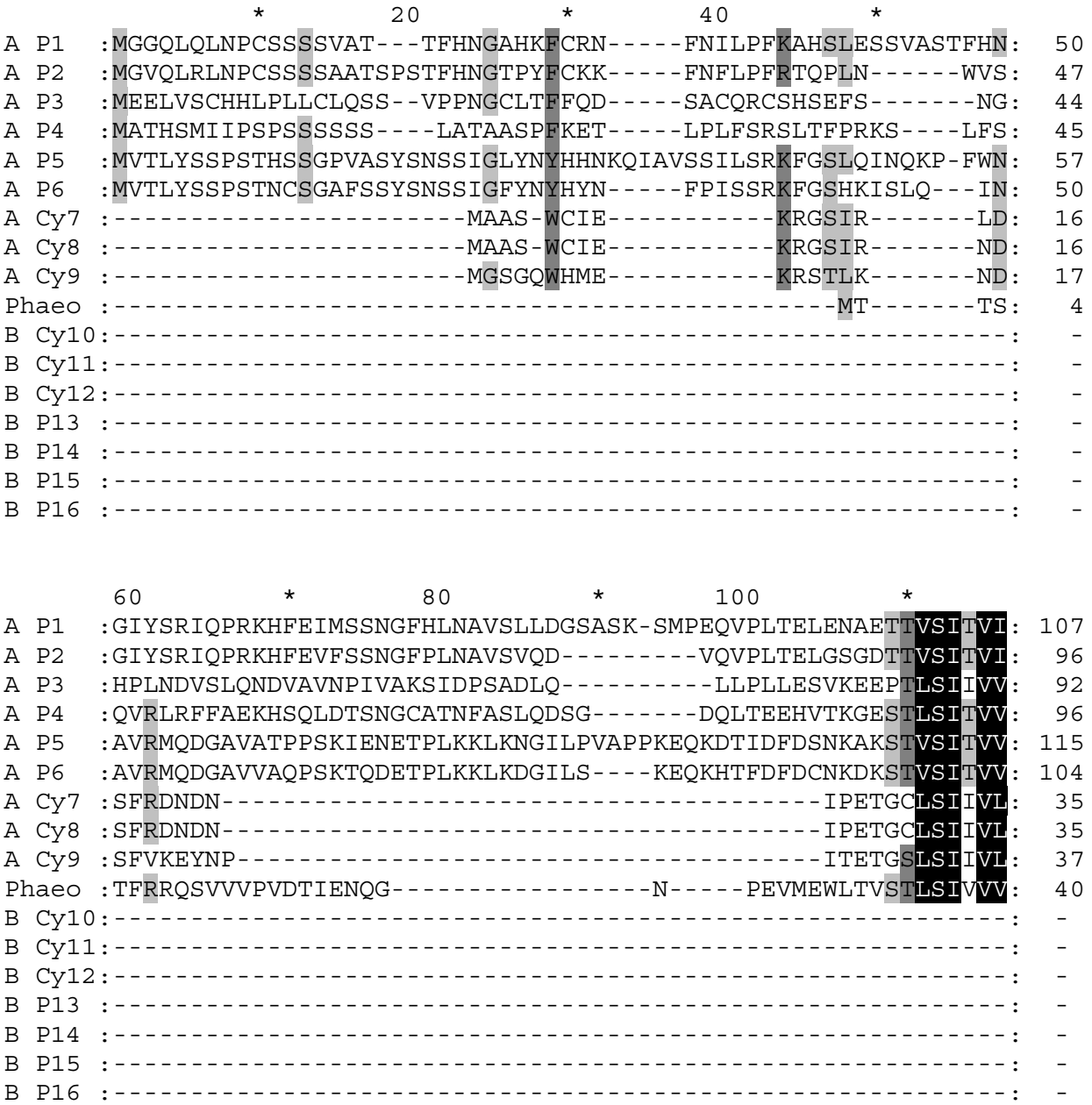
......3440.......3450......3460......3470......3480......3490......3500
AGCGGGATTTTTTCGGAGGGCACACACATGAGCGTACAGATAAAGATGGTCGTTTTCATACCGCGTGGACG
Q  R  D  F  F  G  G  H  T  H  E  R  T  D  K  D  G  R  F  H  T  A  W  T

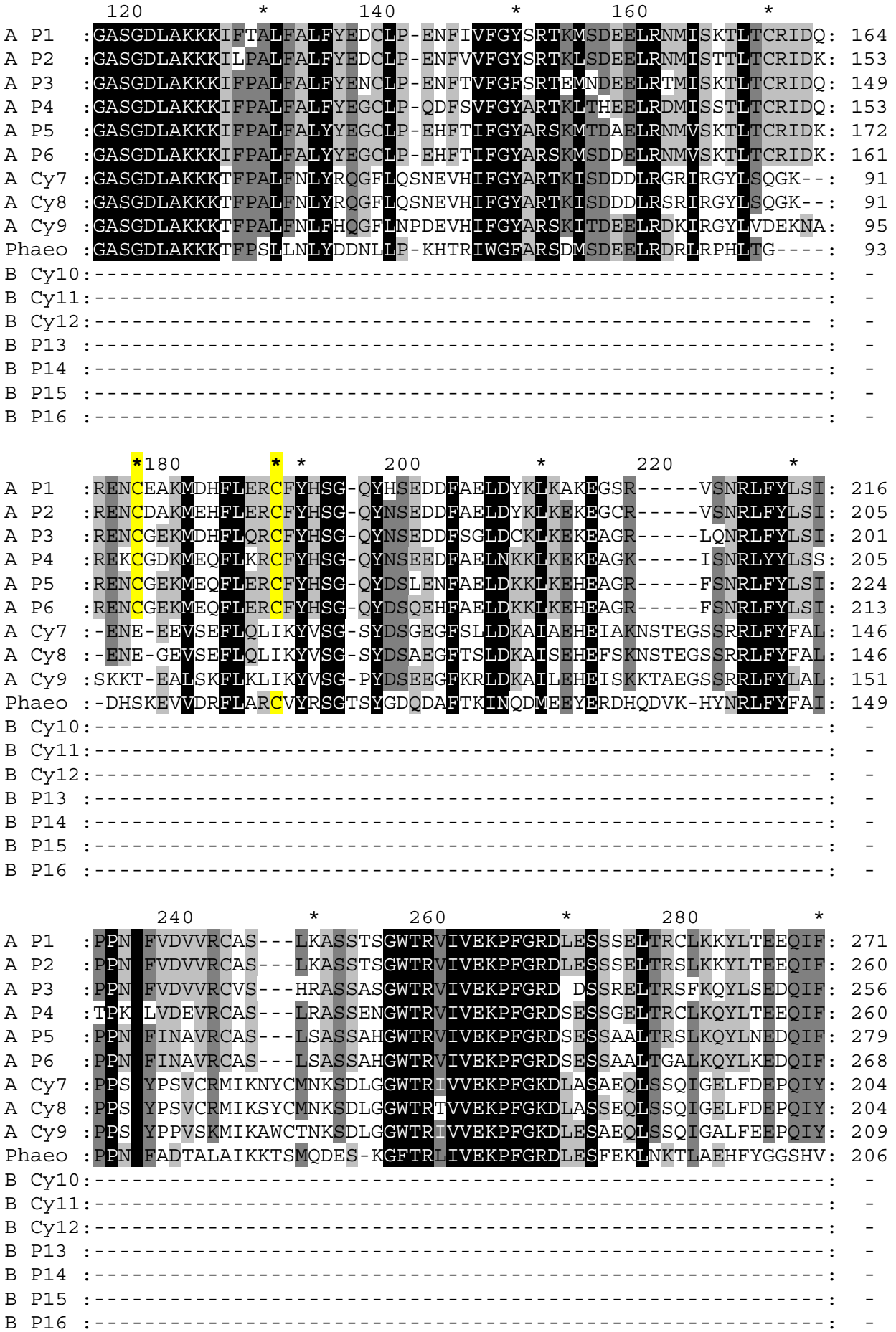
......3510.......3520......3530......3540......3550......3560......3570
GACGCTCACAAAGACATAGGCGATGCCAGTCAACGAACAAGCGGAGAAAATGTTCAAATTTAAATAATAGT
 D  A  H  K  D  I  G  D  A  S  Q  R  T  S  G  E  N  V  Q  I  *

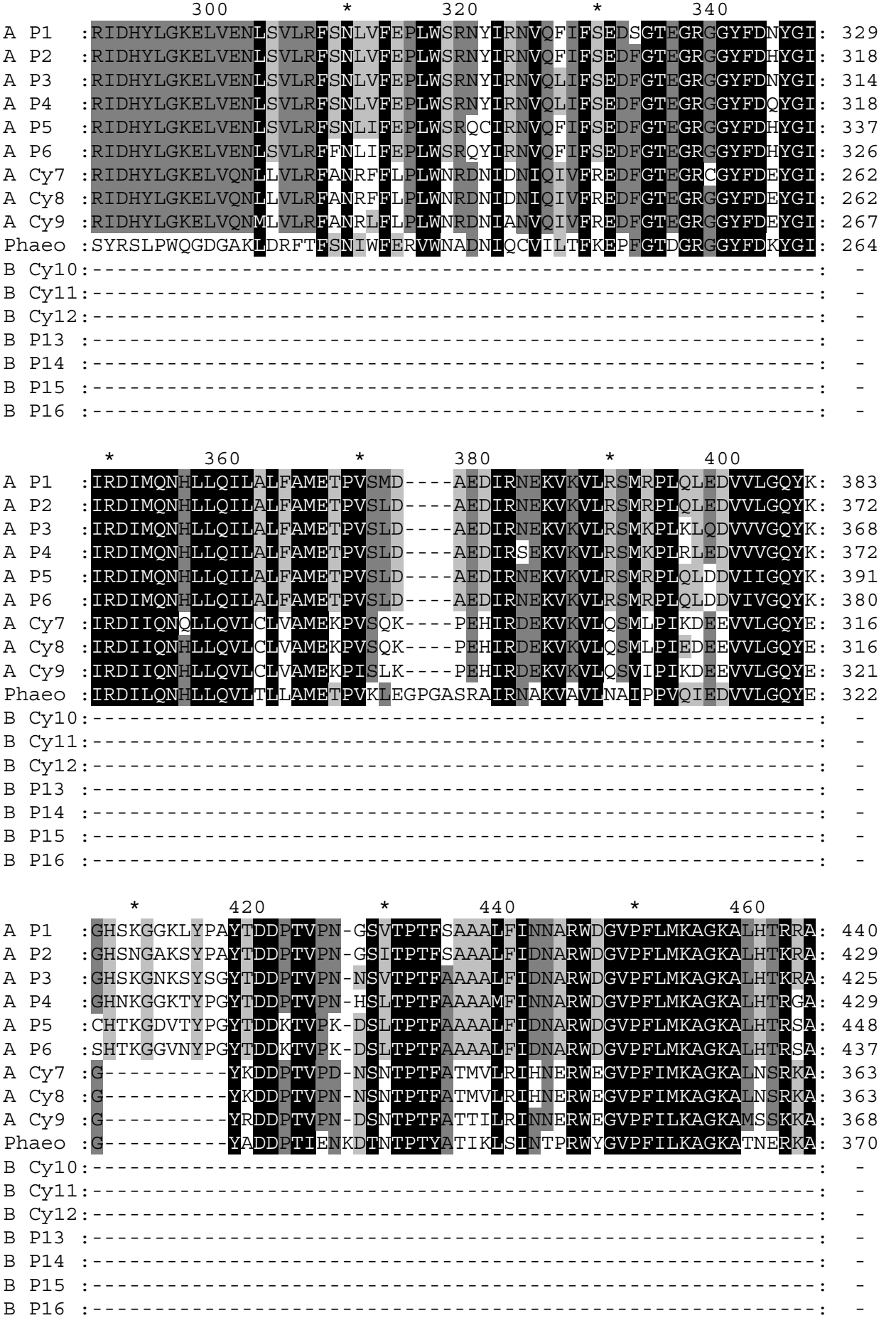
......3580.......3590......3600.........
ATAGTGAATCAAGATTTCGCCAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

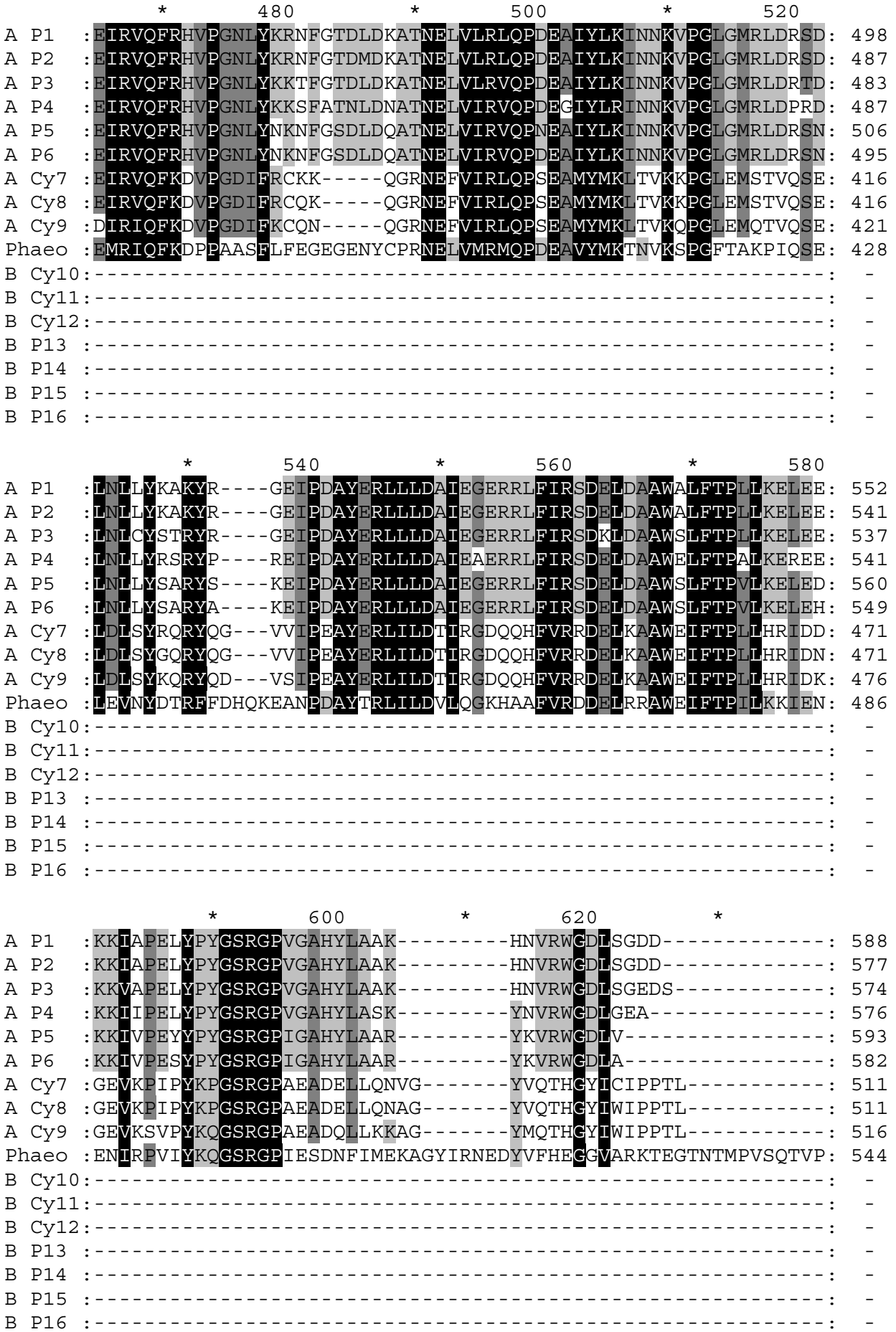
Abb. A3-C: Vergleich der Aminosäure-Sequenzen des G6PDH/6PGDH-Gens von *P. tricornutum* mit den Aminosäure-Sequenzen der G6PDH und der 6PGDH verschiedener Organismen.

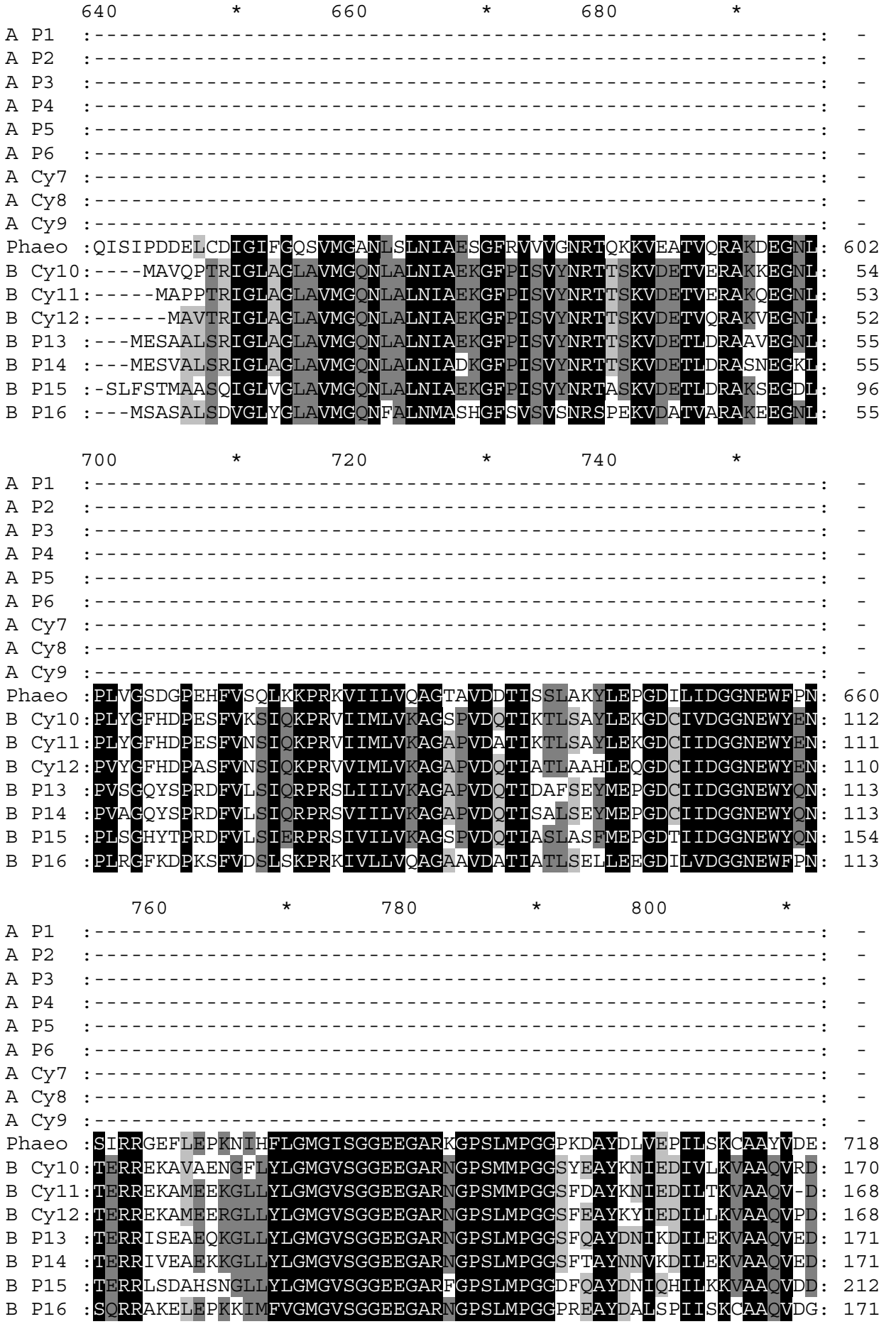
Die Teil-Bereiche des G6PDH/6PGDH-Gens wurden jeweils mit den G6PDH´s oder 6PGDH´s der angegebene Organismen verglichen. Konservierte Aminosäuren sind absteigend von schwarz nach hellgrau hervorgehoben entsprechend dem Grad der Konservierung in den verglichenen Sequenzen. Die Positionen der Cysteine in den G6PDH-Sequenzen sind gelb hinterlegt. Die an der Thiol-Modulation der Kartoffel-G6PDH beteiligten Cysteine sind durch einen gelb hinterlegten Stern markiert. Alle Sequenzen die ein vorangestelltes A haben sind G6PDH-Sequenzen, bzw. mit einem vorangestellten B 6PGDH-Sequenzen. Die Sequenzen A P1 bis P6 sowie B P13 bis P16 sind plastidäre Isoformen und die Sequenzen A Cy7 bis Cy9 sowie B Cy10 bis Cy12 sind cytosolische Isoformen. **A P1**, *Nicotiana tabacum* (Isoform P1, AJ001772); **A P2**, *Solanum tuberosum* (Isoform P1, X83923); **A P3**, *Spinacia oleracea* (O24357); **A P4**, Arabidopsis thaliana (AJ001359); **A P5**, *Nicotiana tabacum* (Isoform P2, X99405); **A P6**, *Solanum tuberosum* (Isoform P2, AJ010712); **A Cy7**, *Nicotiana tabacum* (AJ001770); **A Cy8**; *Solanum tuberosum* (P37830); **A Cy9**, *Arabidopsis thaliana* (AJ010970); **B Cy10**; Arabidopsis thaliana (AC068900); **B Cy11**, *Spinacia oleracea* (AF307144); **B Cy12** *Oryza sativa* (AP001552); **B P13**, *Arabidopsis thaliana* (AC007764); **B P14**, *Arabidopsis thaliana* (AB005233); **B P15**, *Spinacia oleracea* (AF295670); **B P16**, *Laminaria digita* (AJ130772).

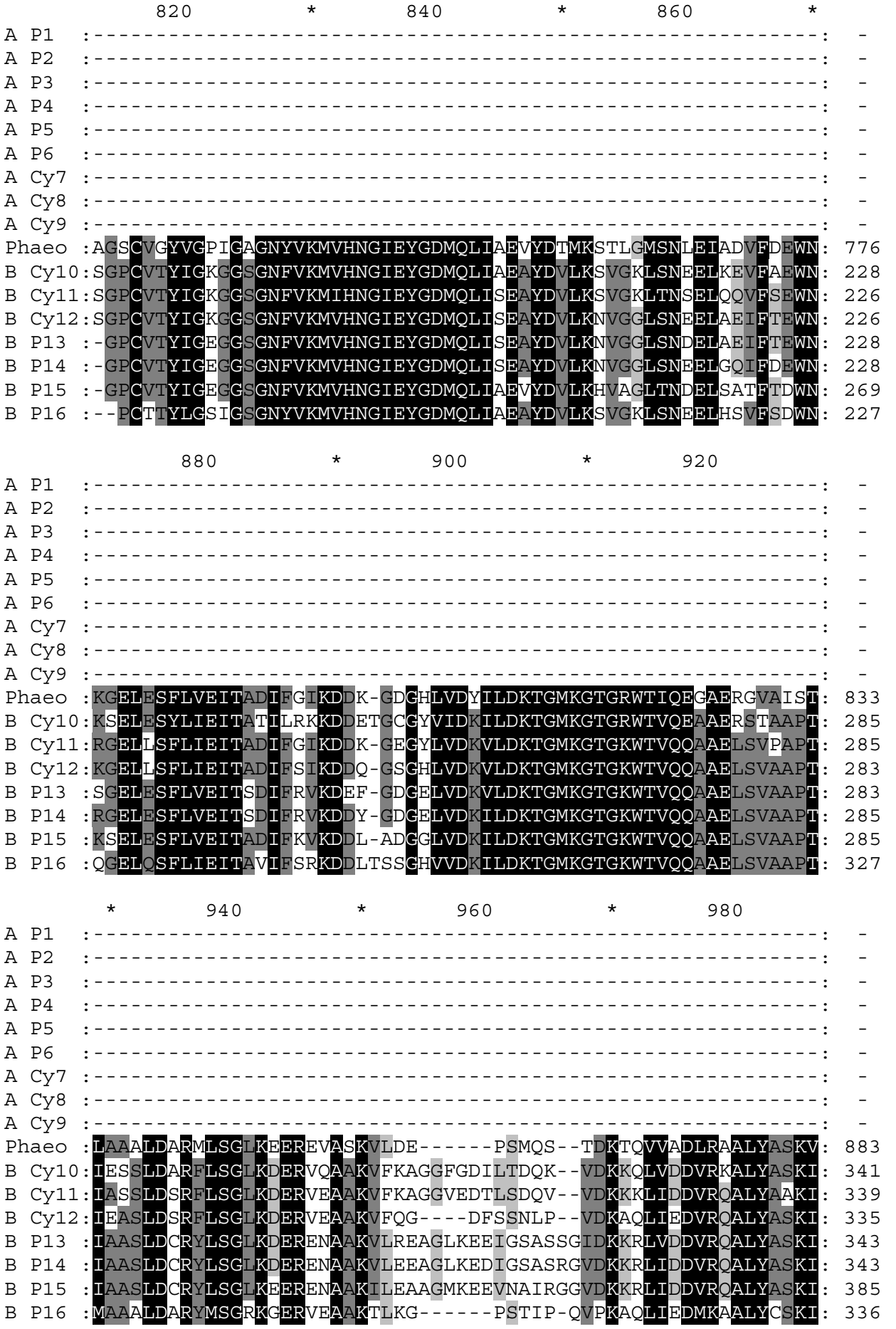


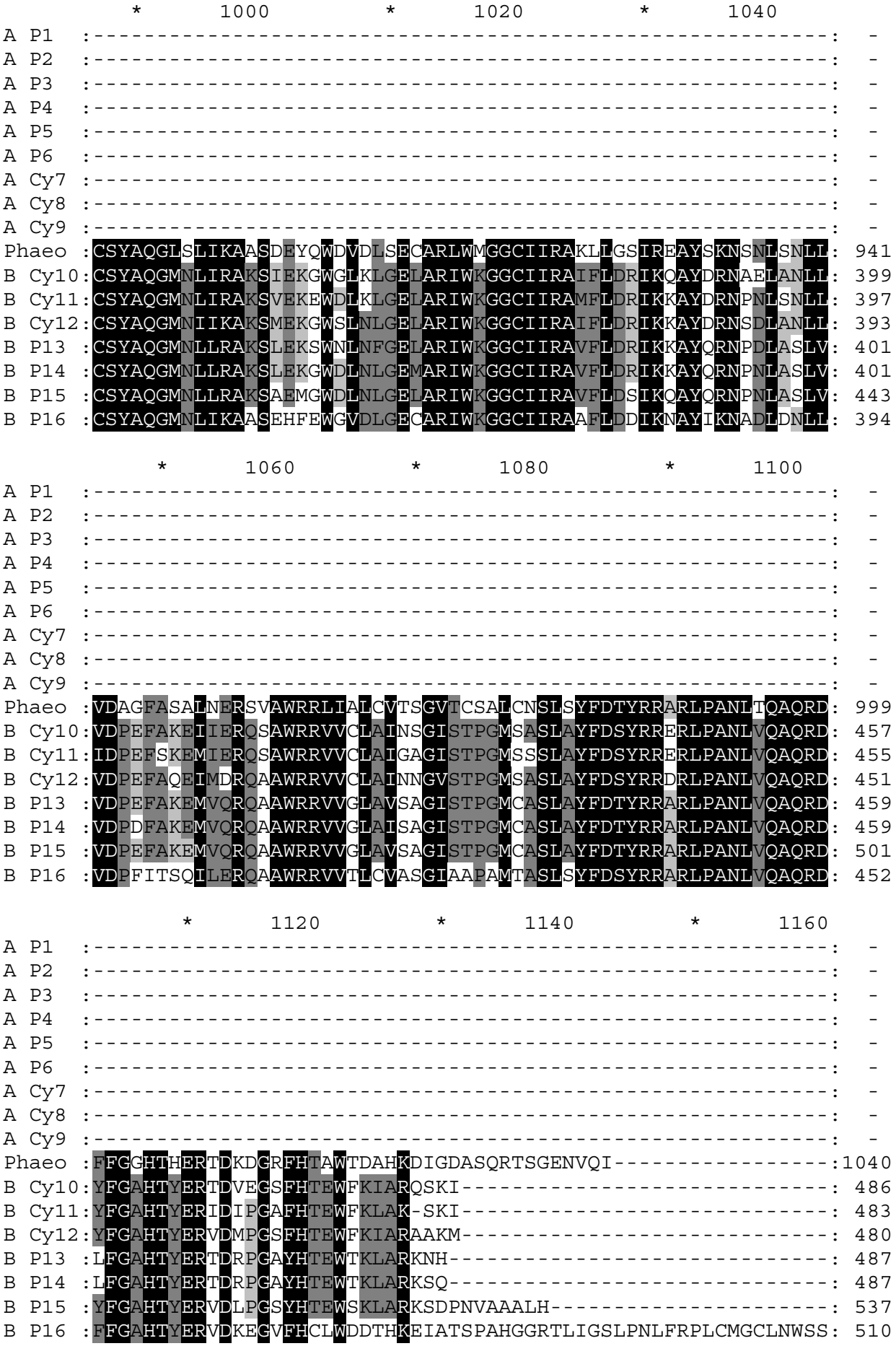

120 * 140 * 160 *
A P1 :GASGDLAKKKIFTALFALFYEDCLP-ENFIVFGYSRTKMSDEELRNMISKTLTCRIDQ: 164
A P2 :GASGDLAKKKILPALFALFYEDCLP-ENFVVFGYSRTKLSDEELRNMISTTLTCRIDK: 153
A P3 :GASGDLAKKKIFPALFALFYENCLP-ENFTVFGFSRTEMNDEELRTMISKTLTCRIDQ: 149
A P4 :GASGDLAKKKIFPALFALFYEGCLP-QDFSVFGYARTKLTHEELRDMISSTLTCRIDQ: 153
A P5 :GASGDLAKKKIFPALFALYYEGCLP-EHFTIFGYARSKMTDAELRNMVSKTLTCRIDK: 172
A P6 :GASGDLAKKKIFPALFALYYEGCLP-EHFTIFGYARSKMSDDELRNMVSKTLTCRIDK: 161
A Cy7 :GASGDLAKKKTFPALFNLYRQGFLQSNEVHIFGYARTKISDDDLRGRIRGYLSQGK--: 91
A Cy8 :GASGDLAKKKTFPALFNLYRQGFLQSNEVHIFGYARTKISDDDLRSRIRGYLSQGK--: 91
A Cy9 :GASGDLAKKKTFPALFNLFHQGFLNPDEVHIFGYARSKITDEELRDKIRGYLVDEKNA: 95
Phaeo :GASGDLAKKKTFPSLLNLYDDNLLP-KHTRIWGFARSDMSDEELRDRLRPHLTG----: 93
B Cy10:----------: -
B Cy11:----------: -
B Cy12:---------- : -
B P13 :----------: -
B P14 :----------: -
B P15 :----------: -
B P16 :----------: -
*180 * * 200 * 220 *
A P1 :RENCEAKMDHFLERCFYHSG-QYHSEDDFAELDYKLKAKEGSR-----VSNRLFYLSI: 216
A P2 :RENCDAKMEHFLERCFYHSG-QYNSEDDFAELDYKLKEKEGCR-----VSNRLFYLSI: 205
A P3 :RENCGEKMDHFLQRCFYHSG-QYNSEDDFSGLDCKLKEKEAGR-----LQNRLFYLSI: 201
A P4 :REKCGDKMEQFLKRCFYHSG-QYNSEEDFAELNKKLKEKEAGK-----ISNRLYYLSS: 205
A P5 :RENCGEKMEQFLERCFYHSG-QYDSLENFAELDKKLKEHEAGR-----FSNRLFYLSI: 224
A P6 :RENCGEKMEQFLERCFYHSG-QYDSQEHFAELDKKLKEHEAGR-----FSNRLFYLSI: 213
A Cy7 :-ENE-EEVSEFLQLIKYVSG-SYDSGEGFSLLDKAIAEHEIAKNSTEGSSRRLFYFAL: 146
A Cy8 :-ENE-GEVSEFLQLIKYVSG-SYDSAEGFTSLDKAISEHEFSKNSTEGSSRRLFYFAL: 146
A Cy9 :SKKT-EALSKFLKLIKYVSG-PYDSEEGFKRLDKAILEHEISKKTAEGSSRRLFYLAL: 151
Phaeo :-DHSKEVVDRFLARCVYRSGTSYGDQDAFTKINQDMEEYERDHQDVK-HYNRLFYFAI: 149
B Cy10:----------: -
B Cy11:----------: -
B Cy12:---------- : -
B P13 :----------: -
B P14 :----------: -
B P15 :----------: -
B P16 :----------: -
240 * 260 * 280 *
A P1 :PPNFFVDVVRCAS---LKASSTSGWTRVIVEKPFGRDLESSSELTRCLKKYLTEEQIF: 271
A P2 :PPNFFVDVVRCAS---LKASSTSGWTRVIVEKPFGRDLESSSELTRSLKKYLTEEQIF: 260
A P3 :PPNFFVDVVRCVS---HRASSASGWTRVIVEKPFGRD DSSRELTRSFKQYLSEDQIF: 256
A P4 :TPKLLVDEVRCAS---LRASSENGWTRVIVEKPFGRDSESSGELTRCLKQYLTEEQIF: 260
A P5 :PPNFFINAVRCAS---LSASSAHGWTRVIVEKPFGRDSESSAALTRSLKQYLNEDQIF: 279
A P6 :PPNFFINAVRCAS---LSASSAHGWTRVIVEKPFGRDSESSAALTGALKQYLKEDQIF: 268
A Cy7 :PPSYPSVCRMIKNYCMNKSDLGGWTRIVVEKPFGKDLASAEQLSSQIGELFDEPQIY: 204
A Cy8 :PPSYPSVCRMIKSYCMNKSDLGGWTRTVVEKPFGKDLASSEQLSSQIGELFDEPQIY: 204
A Cy9 :PPSYPPVSKMIKAWCTNKSDLGGWTRIVVEKPFGKDLESAEQLSSQIGALFEEPQIY: 209
Phaeo :PPNFFADTALAIKKTSMQDES-KGFTRLIVEKPFGRDLESFEKLNKTLAEHFYGGSHV: 206
B Cy10:----------: -
B Cy11:----------: -
B Cy12:----------: -
B P13 :----------: -
B P14 :----------: -
B P15 :----------: -
B P16 :----------: -


300 * 320 * 340
A P1 :RIDHYLGKELVENLSVLRFSNLVFEPLWSRNYIRNVQFIFSEDSGTEGRGGYFDNYGI: 329
A P2 :RIDHYLGKELVENLSVLRFSNLVFEPLWSRNYIRNVQFIFSEDFGTEGRGGYFDHYGI: 318
A P3 :RIDHYLGKELVENLSVLRFSNLVFEPLWSRNYIRNVQLIFSEDFGTEGRGGYFDNYGI: 314
A P4 :RIDHYLGKELVENLSVLRFSNLVFEPLWSRNYIRNVQLIFSEDFGTEGRGGYFDQYGI: 318
A P5 :RIDHYLGKELVENLSVLRFSNLIFEPLWSRQCIRNVQFIFSEDFGTEGRGGYFDHYGI: 337
A P6 :RIDHYLGKELVENLSVLRFFNLIFEPLWSRQYIRNVQFIFSEDFGTEGRGGYFDHYGI: 326
A Cy7 :RIDHYLGKELVQNLLVLRFANRFFLPLWNRDNIDNIQIVFREDFGTEGRCGYFDEYGI: 262
A Cy8 :RIDHYLGKELVQNLLVLRFANRFFLPLWNRDNIDNIQIVFREDFGTEGRGGYFDEYGI: 262
A Cy9 :RIDHYLGKELVQNMLVLRFANRLFLPLWNRDNIANVQIVFREDFGTEGRGGYFDEYGI: 267
Phaeo :SYRSLPWQGDGAKLDRFTFSNIWFERVWNADNIQCVILTFKEPFGTDGRGGYFDKYGI: 264
B Cy10:-
B Cy11:-
B Cy12:-
B P13 :-
B P14 :-
B P15 :-
B P16 :-
* 360 * 380 * 400
A P1 :IRDIMQNHLLQILALFAMETPVSMD----AEDIRNEKVKVLRSMRPLQLEDVVLGQYK: 383
A P2 :IRDIMQNHLLQILALFAMETPVSLD----AEDIRNEKVKVLRSMRPLQLEDVVLGQYK: 372
A P3 :IRDIMQNHLLQILALFAMETPVSLD----AEDIRNEKVKVLRSMKPLKLQDVVVGQYK: 368
A P4 :IRDIMQNHLLQILALFAMETPVSLD----AEDIRSEKVKVLRSMKPLRLEDVVVGQYK: 372
A P5 :IRDIMQNHLLQILALFAMETPVSLD----AEDIRNEKVKVLRSMRPLQLDDVIIGQYK: 391
A P6 :IRDIMQNHLLQILALFAMETPVSLD----AEDIRNEKVKVLRSMRPLQLDDVIVGQYK: 380
A Cy7 :IRDIIQNQLLQVLCLVAMEKPVSQK----PEHIRDEKVKVLQSMLPIKDEEVVLGQYE: 316
A Cy8 :IRDIIQNHLLQVLCLVAMEKPVSQK----PEHIRDEKVKVLQSMLPIEDEEVVLGQYE: 316
A Cy9 :IRDIIQNHLLQVLCLVAMEKPISLK----PEHIRDEKVKVLQSVIPIKDEEVVLGQYE: 321
Phaeo :IRDILQNHLLQVLTLLAMETPVKLEGPGASRAIRNAKVAVLNAIPPVQIEDVVLGQYE: 322
B Cy10:-
B Cy11:-
B Cy12:-
B P13 :-
B P14 :-
B P15 :-
B P16 :-
* 420 * 440 * 460
A P1 :GHSKGGKLYPAYTDDPTVPN-GSVTPTFSAAALFINNARWDGVPFLMKAGKALHTRRA: 440
A P2 :GHSNGAKSYPAYTDDPTVPN-GSITPTFSAAALFIDNARWDGVPFLMKAGKALHTKRA: 429
A P3 :GHSKGNKSYSGYTDDPTVPN-NSVTPTFAAAALFIDNARWDGVPFLMKAGKALHTKRA: 425
A P4 :GHNKGGKTYPGYTDDPTVPN-HSLTPTFAAAAMFINNARWDGVPFLMKAGKALHTRGA: 429
A P5 :CHTKGDVTYPGYTDDKTVPK-DSLTPTFAAAALFIDNARWDGVPFLMKAGKALHTRSA: 448
A P6 :SHTKGGVNYPGYTDDKTVPK-DSLTPTFAAAALFIDNARWDGVPFLMKAGKALHTRSA: 437
A Cy7 :G----------YKDDPTVPD-NSNTPTFATMVLRIHNERWEGVPFIMKAGKALNSRKA: 363
A Cy8 :G----------YKDDPTVPN-NSNTPTFATMVLRIHNERWEGVPFIMKAGKALNSRKA: 363
A Cy9 :G----------YRDDPTVPN-DSNTPTFATTILRINNERWEGVPFILKAGKAMSSKKA: 368
Phaeo :G----------YADDPTIENKDTNTPTYATIKLSINTPRWYGVPFILKAGKATNERKA: 370
B Cy10:-
B Cy11:-
B Cy12:-
B P13 :-
B P14 :-
B P15 :-
B P16 :-


480 500 520
A P1 :EIRVQFRHVPGNLYKRNFGTDLDKATNELVLRLQPDEAIYLKINNKVPGLGMRLDRSD: 498
A P2 :EIRVQFRHVPGNLYKRNFGTDMDKATNELVLRLQPDEAIYLKINNKVPGLGMRLDRSD: 487
A P3 :EIRVQFRHVPGNLYKKTFGTDLDKATNELVLRVQPDEAIYLKINNKVPGLGMRLDRTD: 483
A P4 :EIRVQFRHVPGNLYKKSFATNLDNATNELVIRVQPDEGIYLRINNKVPGLGMRLDPRD: 487
A P5 :EIRVQFRHVPGNLYNKNFGSDLDQATNELVIRVQPNEAIYLKINNKVPGLGMRLDRSN: 506
A P6 :EIRVQFRHVPGNLYNKNFGSDLDQATNELVIRVQPDEAIYLKINNKVPGLGMRLDRSN: 495
A Cy7 :EIRVQFKDVPGDIFRCKK-----QGRNEFVIRLQPSEAMYMKLTVKKPGLEMSTVQSE: 416
A Cy8 :EIRVQFKDVPGDIFRCQK-----QGRNEFVIRLQPSEAMYMKLTVKKPGLEMSTVQSE: 416
A Cy9 :DIRIQFKDVPGDIFKCQN-----QGRNEFVIRLQPSEAMYMKLTVKQPGLEMQTVQSE: 421
Phaeo :EMRIQFKDPPAASFLFEGEGENYCPRNELVMRMQPDEAVYMKTNVKSPGFTAKPIQSE: 428
B Cy10:-
B Cy11:-
B Cy12:-
B P13 :-
B P14 :-
B P15 :-
B P16 :-
540 560 580
A P1 :LNLLYKAKYR----GEIPDAYERLLLDAIEGERRLFIRSDELDAAWALFTPLLKELEE: 552
A P2 :LNLLYKAKYR----GEIPDAYERLLLDAIEGERRLFIRSDELDAAWALFTPLLKELEE: 541
A P3 :LNLCYSTRYR----GEIPDAYERLLLDAIEGERRLFIRSDKLDAAWSLFTPLLKELEE: 537
A P4 :LNLLYRSRYP----REIPDAYERLLLDAIEAERRLFIRSDELDAAWELFTPALKEREE: 541
A P5 :LNLLYSARYS----KEIPDAYERLLLDAIEGERRLFIRSDELDAAWSLFTPVLKELED: 560
A P6 :LNLLYSARYA----KEIPDAYERLLLDAIEGERRLFIRSDELDAAWSLFTPVLKELEH: 549
A Cy7 :LDLSYRQRYQG---VVIPEAYERLILDTIRGDQQHFVRRDELKAAWEIFTPLLHRIDD: 471
A Cy8 :LDLSYGQRYQG---VVIPEAYERLILDTIRGDQQHFVRRDELKAAWEIFTPLLHRIDN: 471
A Cy9 :LDLSYKQRYQD---VSIPEAYERLILDTIRGDQQHFVRRDELKAAWEIFTPLLHRIDK: 476
Phaeo :LEVNYDTRFFDHQKEANPDAYTRLILDVLQGKHAAFVRDDELRRAWEIFTPILKKIEN: 486
B Cy10:-
B Cy11:-
B Cy12:-
B P13 :-
B P14 :-
B P15 :-
B P16 :-
600 620
A P1 :KKIAPELYPYGSRGPVGAHYLAAK---------HNVRWGDLSGDD----------: 588
A P2 :KKIAPELYPYGSRGPVGAHYLAAK---------HNVRWGDLSGDD----------: 577
A P3 :KKVAPELYPYGSRGPVGAHYLAAK---------HNVRWGDLSGEDS---------: 574
A P4 :KKIIPELYPYGSRGPVGAHYLASK---------YNVRWGDLGEA----------: 576
A P5 :KKIVPEYYPYGSRGPIGAHYLAAR---------YKVRWGDLV-----------: 593
A P6 :KKIVPESYPYGSRGPIGAHYLAAR---------YKVRWGDLA-----------: 582
A Cy7 :GEVKPIPYKPGSRGPAEADELLQNVG-------YVQTHGYICIPPTL-------: 511
A Cy8 :GEVKPIPYKPGSRGPAEADELLQNAG-------YVQTHGYIWIPPTL-------: 511
A Cy9 :GEVKSVPYKQGSRGPAEADQLLKKAG-------YMQTHGYIWIPPTL-------: 516
Phaeo :ENIRPVIYKQGSRGPIESDNFIMEKAGYIRNEDYVFHEGGVARKTEGTNTMPVSQTVP: 544
B Cy10:-
B Cy11:-
B Cy12:-
B P13 :-
B P14 :-
B P15 :-
B P16 :-


640 * 660 * 680 *
A P1 :
A P2 :
A P3 :
A P4 :
A P5 :
A P6 :
A Cy7 :
A Cy8 :
A Cy9 :
Phaeo :QISIPDDELCDIGIFGQSVMGANLSLNIAESGFRVVVGNRTQKKVEATVQRAKDEGNL: 602
B Cy10:----MAVQPTRIGLAGLAVMGQNLALNIAEKGFPISVYNRTTSKVDETVERAKKEGNL: 54
B Cy11:-----MAPPTRIGLAGLAVMGQNLALNIAEKGFPISVYNRTTSKVDETVERAKQEGNL: 53
B Cy12:------MAVTRIGLAGLAVMGQNLALNIAEKGFPISVYNRTTSKVDETVQRAKVEGNL: 52
B P13 :---MESAALSRIGLAGLAVMGQNLALNIAEKGFPISVYNRTTSKVDETLDRAAVEGNL: 55
B P14 :---MESVALSRIGLAGLAVMGQNLALNIADKGFPISVYNRTTSKVDETLDRASNEGKL: 55
B P15 :-SLFSTMAASQIGLVGLAVMGQNLALNIAEKGFPISVYNRTASKVDETLDRAKSEGDL: 96
B P16 :---MSASALSDVGLYGLAVMGQNFALNMASHGFSVSVSNRSPEKVDATVARAKEEGNL: 55
700 * 720 * 740 *
A P1 :
A P2 :
A P3 :
A P4 :
A P5 :
A P6 :
A Cy7 :
A Cy8 :
A Cy9 :
Phaeo :PLVGSDGPEHFVSQLKKPRKVIILVQAGTAVDDTISSLAKYLEPGDILIDGGNEWFPN: 660
B Cy10:PLYGFHDPESFVKSIQKPRVIIMLVKAGSPVDQTIKTLSAYLEKGDCIVDGGNEWYEN: 112
B Cy11:PLYGFHDPESFVNSIQKPRVIIMLVKAGAPVDATIKTLSAYLEKGDCIIDGGNEWYEN: 111
B Cy12:PVYGFHDPASFVNSIQKPRVVIMLVKAGAPVDQTIATLAAHLEQGDCIIDGGNEWYEN: 110
B P13 :PVSGQYSPRDFVLSIQRPRSLIILVKAGAPVDQTIDAFSEYMEPGDCIIDGGNEWYQN: 113
B P14 :PVAGQYSPRDFVLSIQRPRSVIILVKAGAPVDQTISALSEYMEPGDCIIDGGNEWYQN: 113
B P15 :PLSGHYTPRDFVLSIERPRSIVILVKAGSPVDQTIASLASFMEPGDTIIDGGNEWYQN: 154
B P16 :PLRGFKDPKSFVDSLSKPRKIVLLVQAGAAVDATIATLSELLEEGDILVDGGNEWFPN: 113
760 * 780 * 800 *
A P1 :
A P2 :
A P3 :
A P4 :
A P5 :
A P6 :
A Cy7 :
A Cy8 :
A Cy9 :
Phaeo :SIRRGEFLEPKNIHFLGMGISGGEEGARKGPSLMPGGPKDAYDLVEPILSKCAAYVDE: 718
B Cy10:TERREKAVAENGFLYLGMGVSGGEEGARNGPSMMPGGSYEAYKNIEDIVLKVAAQVRD: 170
B Cy11:TERREKAMEEKGLLYLGMGVSGGEEGARNGPSMMPGGSFDAYKNIEDILTKVAAQV-D: 168
B Cy12:TERREKAMEERGLLYLGMGVSGGEEGARNGPSLMPGGSFEAYKYIEDILLKVAAQVPD: 168
B P13 :TERRISEAEQKGLLYLGMGVSGGEEGARNGPSLMPGGSFQAYDNIKDILEKVAAQVED: 171
B P14 :TERRIVEAEKKGLLYLGMGVSGGEEGARNGPSLMPGGSFTAYNNVKDILEKVAAQVED: 171
B P15 :TERRLSDAHSNGLLYLGMGVSGGEEGARFGPSLMPGGDFQAYDNIQHILKKVAAQVDD: 212
B P16 :SQRRAKELEPKKIMFVGMGVSGGEEGARNGPSLMPGGPREAYDALSPIISKCAAQVDG: 171


820 * 840 * 860 *
A P1 :----------:
A P2 :----------:
A P3 :----------:
A P4 :----------:
A P5 :----------:
A P6 :----------:
A Cy7 :----------:
A Cy8 :----------:
A Cy9 :----------:
Phaeo :AGSCVGYVGPIGAGNYVKMVHNGIEYGDMQLIAEVYDTMKSTLGMSNLEIADVFDEWN: 776
B Cy10:SGPCVTYIGKGGSGNFVKMVHNGIEYGDMQLIAEAYDVLKSVGKLSNEELKEVFAEWN: 228
B Cy11:SGPCVTYIGKGGSGNFVKMIHNGIEYGDMQLISEAYDVLKSVGKLTNSELQQVFSEWN: 226
B Cy12:SGPCVTYIGKGGSGNFVKMVHNGIEYGDMQLISEAYDVLKNVGGLSNEELAEIFTEWN: 226
B P13 :-GPCVTYIGEGGSGNFVKMVHNGIEYGDMQLISEAYDVLKNVGGLSNDELAEIFTEWN: 228
B P14 :-GPCVTYIGEGGSGNFVKMVHNGIEYGDMQLISEAYDVLKNVGGLSNEELGQIFDEWN: 228
B P15 :-GPCVTYIGEGGSGNFVKMVHNGIEYGDMQLIAEVYDVLKHVAGLTNDELSATFTDWN: 269
B P16 :--PCTTYLGSIGSGNYVKMVHNGIEYGDMQLIAEAYDVLKSVGKLSNEELHSVFSDWN: 227
880 * 900 * 920
A P1 :----------:
A P2 :----------:
A P3 :----------:
A P4 :----------:
A P5 :----------:
A P6 :----------:
A Cy7 :----------:
A Cy8 :----------:
A Cy9 :----------:
Phaeo :KGELESFLVEITADIFGIKDDK-GDGHLVDYILDKTGMKGTGRWTIQEGAERGVAIST: 833
B Cy10:KSELESYLIEITATILRKKDDETGCGYVIDKILDKTGMKGTGRWTVQEAAERSTAAPT: 285
B Cy11:RGELLSFLIEITADIFGIKDDK-GEGYLVDKVLDKTGMKGTGKWTVQQAAELSVPAPT: 285
B Cy12:KGELLSFLIEITADIFSIKDDQ-GSGHLVDKVLDKTGMKGTGKWTVQQAAELSVAAPT: 283
B P13 :SGELESFLVEITSDIFRVKDEF-GDGELVDKVLDKTGMKGTGKWTVQQAAELSVAAPT: 283
B P14 :RGELESFLVEITSDIFRVKDDY-GDGELVDKILDKTGMKGTGKWTVQQAAELSVAAPT: 285
B P15 :KSELESFLVEITADIFKVKDDL-ADGGLVDKILDKTGMKGTGKWTVQQAAELSVAAPT: 285
B P16 :QGELQSFLIEITAVIFSRKDDLTSSGHVVDKILDKTGMKGTGKWTVQQAAELSVAAPT: 327
* 940 * 960 * 980
A P1 :----------:
A P2 :----------:
A P3 :----------:
A P4 :----------:
A P5 :----------:
A P6 :----------:
A Cy7 :----------:
A Cy8 :----------:
A Cy9 :----------:
Phaeo :LAAALDARMLSGLKEEREVASKVLDE------PSMQS--TDKTQVVADLRAALYASKV: 883
B Cy10:IESSLDARFLSGLKDERVQAAKVFKAGGFGDILTDQK--VDKKQLVDDVRKALYASKI: 341
B Cy11:IASSLDSRFLSGLKDERVEAAKVFKAGGVEDTLSDQV--VDKKKLIDDVRQALYAAKI: 339
B Cy12:IEASLDSRFLSGLKDERVEAAKVFQG----DFSSNLP--VDKAQLIEDVRQALYASKI: 335
B P13 :IAASLDCRYLSGLKDERENAAKVLREAGLKEEIGSASSGIDKKRLVDDVRQALYASKI: 343
B P14 :IAASLDCRYLSGLKDERENAAKVLEEAGLKEDIGSASRGVDKKRLIDDVRQALYASKI: 343
B P15 :IAASLDCRYLSGLKEERENAAKILEAAGMKEEVNAIRGGVDKKRLIDDVRQALYASKI: 385
B P16 :MAAALDARYMSGRKGERVEAAKTLKG------PSTIP-QVPKAQLIEDMKAALYCSKI: 336


* 1000 * 1020 * 1040
A P1 :
A P2 :
A P3 :
A P4 :
A P5 :
A P6 :
A Cy7 :
A Cy8 :
A Cy9 :
Phaeo :CSYAQGLSLIKAASDEYQWDVDLSECARLWMGGCIIRAKLLGSIREAYSKNSNLSNLL: 941
B Cy10:CSYAQGMNLIRAKSIEKGWGLKLGELARIWKGGCIIRAIFLDRIKQAYDRNAELANLL: 399
B Cy11:CSYAQGMNLIRAKSVEKEWDLKLGELARIWKGGCIIRAMFLDRIKKAYDRNPNLSNLL: 397
B Cy12:CSYAQGMNIIKAKSMEKGWSLNLGELARIWKGGCIIRAIFLDRIKKAYDRNSDLANLL: 393
B P13 :CSYAQGMNLLRAKSLEKSWNLNFGELARIWKGGCIIRAVFLDRIKKAYQRNPDLASLV: 401
B P14 :CSYAQGMNLLRAKSLEKGWDLNLGEMARIWKGGCIIRAVFLDRIKKAYQRNPNLASLV: 401
B P15 :CSYAQGMNLLRAKSAEMGWDLNLGELARIWKGGCIIRAVFLDSIKQAYQRNPNLASLV: 443
B P16 :CSYAQGMNLIKAASEHFEWGVDLGECARIWKGGCIIRAAFLDDIKNAYIKNADLDNLL: 394
* 1060 * 1080 * 1100
A P1 :
A P2 :
A P3 :
A P4 :
A P5 :
A P6 :
A Cy7 :
A Cy8 :
A Cy9 :
Phaeo :VDAGFASALNERSVAWRRLIALCVTSGVTCSALCNSLSYFDTYRRARLPANLTQAQRD: 999
B Cy10:VDPEFAKEIIERQSAWRRVVCLAINSGISTPGMSASLAYFDSYRRERLPANLVQAQRD: 457
B Cy11:IDPEFSKEMIERQSAWRRVVCLAIGAGISTPGMSSSLAYFDSYRRERLPANLVQAQRD: 455
B Cy12:VDPEFAQEIMDRQAAWRRVVCLAINNGVSTPGMSASLAYFDSYRRDRLPANLVQAQRD: 451
B P13 :VDPEFAKEMVQRQAAWRRVVGLAVSAGISTPGMCASLAYFDTYRRARLPANLVQAQRD: 459
B P14 :VDPDFAKEMVQRQAAWRRVVGLAISAGISTPGMCASLAYFDTYRRARLPANLVQAQRD: 459
B P15 :VDPEFAKEMVQRQAAWRRVVGLAVSAGISTPGMCASLAYFDTYRRARLPANLVQAQRD: 501
B P16 :VDPFITSQILERQAAWRRVVTLCVASGIAAPAMTASLSYFDSYRRARLPANLVQAQRD: 452
* 1120 * 1140 * 1160
A P1 :
A P2 :
A P3 :
A P4 :
A P5 :
A P6 :
A Cy7 :
A Cy8 :
A Cy9 :
Phaeo :FFGGHTHERTDKDGRFHTAWTDAHKDIGDASQRTSGENVQI----------:1040
B Cy10:YFGAHTYERTDVEGSFHTEWFKIARQSKI----------: 486
B Cy11:YFGAHTYERIDIPGAFHTEWFKLAK-SKI----------: 483
B Cy12:YFGAHTYERVDMPGSFHTEWFKIARAAKM----------: 480
B P13 :LFGAHTYERTDRPGAYHTEWTKLARKNH----------: 487
B P14 :LFGAHTYERTDRPGAYHTEWTKLARKSQ----------: 487
B P15 :YFGAHTYERVDLPGSYHTEWSKLARKSDPNVAAALH----------: 537
B P16 :FFGAHTYERVDKEGVFHCLWDDTHKEIATSPAHGGRTLIGSLPNLFRPLCMGCLNWSS: 510

Verwendete Sequenzen:

G6PDH-Sequenzen[1]	6PGDH-Sequenzen[1]
Anabaena PCC7124 (P48992)	*Arabidopsis thaliana* Cyt (ac068900)
Arabidopsis thaliana Cyt. (AJ010970)	*Arabidopsis thaliana* Plast. P1 (ac007764)
Arabidopsis thaliana Plast. (AJ001359)	*Arabidopsis thaliana* Plast. P2 (ab005233)
Aspergillus niger (X87942)	*Bacillus subtilis* gntz (D26190)
Drosophila melanogaster (M26674)	*Candida albicans* (AB006102)
Dunaliella bioculata (AJ132346)	*Ceratitis capitata* (P41570)
Emericella nidulans (X84001)	*Citrobacter freundii* (U14466)
Erwinia chrysanthemi (P37986)	*Cunninghamella elegans* (Y17297)
Escherichia coli (Q60134)	*Drosophila melanogaster* (P41572)
Galdieria sulphuraria (AJ006246)	*Escherichia. coli* (P00350)
Haemophilus influenzae (P44311	*Glycin max* (AB007907)
Homo sapiens (P11413	*Haemophilus influenzae* (U32737)
Kluyveromyces lactis (X70373)	*Laminaria digita*ta (AJ130772)
Leukonostoc mesenteroides (P11411)	*Medicago sativa* Cyt. (U18239)
Medicago sativa Cyt. (Q42919)	*Oryza sativa* Cyt. (AP001552)
Mesembryanthemum crystallinum Cyt. (AF097663)	*Ovis aries* (P00349)
Mus musculus (Z11911)	*Salmonella enterica* (U14509)
Neisseria meningitidis MC58 (AE002487)	*Spinacia oleracea* Cyt. (AF307144)
Nicotiana tabacum Cyt. (AJ001770)	*Spinacia oleracea* Plast. P1 (AF295670)
Nicotiana tabacum Plast. P1 (AJ001772)	*Synechococcus* PCC7942 (P21577)
Nicotiana tabacum Plast. P2 (X99405)	*Synechocystis* PCC6803 (P52208)
Nostoc punctiforme (P48848)	*Zea mays* Cyt. 1 (AF061837)
Pichia jadinii (P11410)	*Zea mays* Cyt. 2 (AF061838)
Pseudomonas aeruginosa (O68282)	
Rattus norvegicus (X07467)	
Saccharomyces cerivisiae (P11412)	
Solanum tuberosum Cyt. (P37830)	
Solanum tuberosum Plast. P1 (X83923)	
Spinacia oleracea Plast. P1 (O24357)	
Synechococcus PCC7942 (P29686)	
Synechocystis PCC6803 (D90906)	
Zymomonas mobilis (P21907)	
Solanum tuberosum Plast P2 (AJ010712)	

plastidäre GAPDH-Sequenzen[1]	cytosolische GAPDH-Sequenzen[1]
Spinacia oleracea Plast. GapA (L76552)	*Chondrus crispus* GapC (X73036)
Spinacia oleracea Plast. GapB (L76553)	*Odontella sinensis* Gap-CII (AF063801)
Chondrus crispus Plast. GapA (X73033)	*Heterosigma carterae* Gap-CII (AF319449)
Galdieria sulphuraria GapA (AJ012286)	
Phaeodactylum tricornutum Gap-CI (AF063803)	*Phaeodactylum tricornutum* Gap-CII (AF063805)
Heterosigma carterae Gap-CI (AF319448)	
Odontella sinensis Gap-CI (AF063800)	

[1]Die Erscheinungsnummern beziehen sich entweder auf die *EMBL*, oder *Swiss-Prot* Datenbank.

7.2 Abkürzungsverzeichnis

ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
CER	Chloroplasten Endoplasmatisches Reticulum
Chl.	Chlorophyll
$DIOC_6$	3,3´-Dihexyl-Oxocarbocyanin-Iodid
DTNB	Dithionitrobenzoesäure
DTTox	Oxidiertes DTT, trans-4,5-Dihydroxy-1,2-dithiane
DTTred	Reduziertes DTT, Dithiothreitol
ε_λ	Extinktionskoeffizient bei der Wellenlänge λ
E4P	Erythrose-4-Phosphat
E_h	Redox-Potential des Redox-Puffersystems
EK	Endkonzentration
E_m	Mittleres Redox-Potential regulatorischer Cysteine
ER	Endoplasmatisches Reticulum
F	Faraday-Konstante
F6P	Fruktose-6-Phosphat
FbP	Fruktose-1,6-bisphosphat
FbPase	Fruktose-1,6-bisphosphatase
Fd	Ferredoxin
g	Gramm
G6P	Glukose-6-Phosphat
G6PDH	Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase
6PGDH	6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase
GAP	Glycerinaldehydphosphat
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GSSG	Oxidiertes Glutathion
h	Stunde
K	Gleichgewichtskonstante
kB	Kilobasen
kDa	kilo-Dalton
K_m	Michaeliskonstante
λ	Wellenlänge in nm
Min.	Minute
NAD^+	Oxidierte Form des Nicotinamidadenindinucleotids
NADH	Reduzierte Form des Nicotinamidadenindinucleotids
$NADP^+$	Oxidierte Form des Nicotinamidadenindinucleotidphosphats
NADPH	Reduzierte Form des Nicotinamidadenindinucleotidphosphats
PAA	Polyacrylamid
P_i	Anorganisches Phosphat
3-PGA	3-Phosphoglycerat
PRK	Phosphoribulokinase
R	Allgemeine Gaskonstante
RT	Raumtemperatur
Ru5P	Ribulose-5-phosphat
Rubisco	Ribulosebisphosphat Carboxylase/Oxygenase
RubP	Ribulose-1,5-bisphosphat
SbP	Sedoheptulose-1,7-bisphosphat
SbPase	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase

SOD	Superoxid-Dismutase
T	Absolute Temperatur in Kelvin
TNB	Thionitrobenzoesäure
TPT	Triosephosphat-Translokator
Trx	Thioredoxin
Trx-f	Thioredoxin Isoform f
Trx-m	Thioredoxin Isoform m
U	Enzymmenge die ein µmol Substrat pro Minute umsetzt
üN	Über Nacht
upm	Umdrehungen pro Minute
V	Reaktionsgeschwindigkeit
v/v	Volumenanteil pro Volumen
V_{max}	Maximale Reaktionsgeschwindigkeit
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
x g	Erdbeschleunigungskonstante g

Aminosäuren (im Drei- und Ein-Buchstaben-Kode)

Ala	A	Alanin	Leu	L	Leucin
Arg	R	Arginin	Lys	K	Lysin
Asn	N	Asparagin	Met	M	Methionin
Asp	D	Asparaginsäure	Phe	F	Phenylalanin
Cys	C	Cystein	Pro	P	Prolin
Glu	E	Glutaminsäure	Ser	S	Serin
Gln	Q	Glutamin	Thr	T	Threonin
Gly	G	Glycin	Trp	W	Tryptophan
His	H	Histidin	Tyr	Y	Tyrosin
Ile	I	Isoleucin	Val	V	Valin

Danksagung

Ich möchte mich bei Professor Dr. P. Kroth für sein Interesse an meiner Arbeit, seine wertvollen Ideen und die wissenschaftliche Unabhängigkeit, die ich genossen habe, bedanken.

Professor Dr. Strotmann danke ich für seine Diskussionsbereitschaft.

Professor Dr. Alfermann danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Professor Dr. Kowallik möchte ich hier für die Finanzierung der letzten Monate meiner Promotion ganz besonders danken.

Professor Dr. W. Martin danke ich für die Diskussionen über verschiedene Probleme der Calvin-Zyklus-Regulation.

Jürgen Schumann und Georg Groth danke ich für jede Minute, die sie sich meinen Fragen gewidmet haben. Ein besonderer Dank gilt Peter Jahns, der mich bei der Niederschrift dieser Arbeit sehr unterstützt hat.

Norbert Wedel danke ich für viele neue Impulse und Anregungen, die sich in meiner Arbeit wiederfinden, sowie für eine freundschaftliche Arbeits-Atmosphäre während langer Versuchstage in Osnabrück und während der Suche nach *Chondrus crispus* und *Mastocarpus stellatus*, die sich geschickt im Felsenwatt von Helgoland, hinter den Tetrapoden, zu verbergen wußten.

Meinem ehemaligen Kollegen Markus Lang habe ich viele neue Erkenntnisse zu verdanken!

Ich möchte mich auch bei den Mitarbeitern der anderen biologischen Institute für die gute Zusammenarbeit und die nicht nur apparative Unterstützung bedanken. Unter diesen möchte ich hier Bernd Esters, Oliver Bläsing, Henning Plücken, Katrin Henze, Andrea Hansen Thomas Lins und Carmen Rotte erwähnen. Oliver Kilian danke ich für eine fruchtbare Zusammenarbeit, Gespräche, Ideen und viel Vergnügen in freien Minuten.
Ganz besonders möchte ich mich bei Thomas Laatsch, Axel Schmitz und Markus Berns bedanken, für noch viel mehr als dem was ich hier erwähnen könnte, vor allem aber für ihre Freundschaft.

Den 50 „Verrückten“ des Panther-Teams ´86 - ´92 danke ich für so manche Lektion und für die Erkenntnis, dass man alles schafft, was man mit 110 % angeht.

Ralf, Peter, Axel, Ludolf, Kristian und Uwe danke ich dafür, dass sie mich trotz meiner erzwungen Klausur im Labor nicht völlig vergaßen.

Babette Sohnrey danke ich für die Versorgung mit Tickets (Düsseldorf-Berlin und Berlin-Düsseldorf), die eine Fern-Beziehung erleichtert haben.

Mein besonderer, ganz anderer Dank gilt Kathrin, die diese Zeit mit mir zusammen durchgestanden hat und für die ich leider manchmal zu wenig Zeit hatte.

Diese Arbeit ist meinen Eltern gewidmet, die den größten Anteil am gelingen hatten, da sie mich so unglaublich stark unterstützt haben.

Ich versichere, dass ich diese Arbeit selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Düsseldorf, den 07 Januar 2001