

**Das *OEE*-Protein 1 des Photosystem II
(*oxygen evolving enhancer*) der Grünalge
Scenedesmus obliquus besitzt
Thioredoxin-Aktivität**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Fachbereich 19 Biologie/Chemie
der Universität Kassel

von
Heinrich Heide
aus Orenburg/Russland

Kassel, 2002

Disputation hat am 16.07.2002 stattgefunden.

1. Gutachter: Prof. Dr. H. Follmann, Lehrstuhl für Biochemie, Fachbereich 19 der Universität Kassel.
2. Gutachter: Prof. Dr. H. Senger, Lehrstuhl für Pflanzenphysiologie, Philipps-Universität Marburg.

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und andere als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel nicht benutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Veröffentlichten oder unveröffentlichten Schriften entnommen sind, habe ich als solche kenntlich gemacht. Kein Teil dieser Arbeit ist in einem anderen Promotions- oder Habilitationsverfahren verwendet worden.

Kassel, 17.04.2002

Heinrich Heide

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

Wünschiers, R., Heide, H., Follmann, H., Senger, H., Schulz, R. (1999), FEBS Lett. **455**, 162-164.

Abkürzungen

<i>aqua bidest.</i>	bidestilliertes Wasser
AS	Ammoniumsulfat
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (<i>bovine serum albumin</i>)
CD	Circulardichroismus -Spektroskopie
Cyt	Cytochrom
DBMIB	2,5-Dibrom-3-methyl-6-isopropyl-p-benzochinon
DCMU	3-(3,4-Dichlorphenyl)-1,1'-dimethyl-Harnstoff
DEAE	Diethylaminoethyl
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FbPase	Fructose-1.6-bisphosphatase
Fd	Ferredoxin
FPLC	Fast Protein Liquid -Chromatographie
FT-IR	Fouriertransforminfrarot -Spektroskopie
FTR	Ferredoxin-Thioredoxinreduktase
g	G-Wert (Vielfaches der Erdbeschleunigung)
kDa	Kilo-Dalton
ME	Mercapthoethanol
MES	2-Morpholinoethansulphonsäure
MDH	Malatdehydrogenase
Mr	Molmasse
MV	Methylviologen
NADH/NAD⁺	Nikotinamid-adenin-dinukleotid (reduziert/oxidiert)
NADPH/NADP⁺	Nikotinamid-adenin-dinukleotidphosphat (reduziert/oxidiert)
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCV	Volumen dichtest gepackter Zellen (packed cell volume)
PQ	Plastochinon
PSI	Photosystem I

PSII	Photosystem II
rpm	Umdrehungen pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SF	Stimulationsfaktor
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Trx	Thioredoxin
Tricin	N-[Tris-(hydroxymethyl)-methyl]-glycin
Tris	Tris (hydroxymethyl) aminomethan
v/v	Volumen/Volumen
w/v	Gewicht/Volumen

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung.....	1-1
1.1	Enzymregulation in Pflanzen.....	1-1
1.2	Das Thioredoxinsystem der Pflanzen.....	1-7
1.3	Grünalgen als pflanzenphysiologische Objekte.....	1-14
1.4	Thioredoxine in <i>Scenedesmus obliquus</i>	1-18
1.5	Oxygen evolving enhancer Protein 1 (OEE Protein 1).....	1-20
1.6	Zielsetzung dieser Arbeit.....	1-27
2.	Experimenteller Teil.....	2-28
2.1	Materialien, Reagenzien, Geräte und allgemeine Methoden.....	2-28
2.2	Algenkulturen.....	2-30
2.3	Reinigung der Thioredoxine.....	2-33
2.3.1	Aufschluss und Fällungsschritte.....	2-33
2.3.2	Entsalzung von Proteinproben auf Sephadex G-25.....	2-34
2.3.3	Chromatographie auf DEAE-Cellulose.....	2-35
2.3.4	Gelfiltration auf FPLC-Superdex G-75.....	2-35
2.3.5	Ionenaustauschchromatographie auf Resource-Q.....	2-36
2.3.6	Chromatographie auf Uno Q-6.....	2-37
2.3.7	Ionenaustauschchromatographie auf FPLC-Mono-S.....	2-37
2.3.8	Aufbewahren der gereinigten Thioredoxinproben.....	2-38
2.4	Präparation des OEE-Proteins aus <i>S. obliquus</i>	2-39
2.5	Elektrophoretische Methoden.....	2-40
2.5.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	2-40
2.5.2	Färbemethoden.....	2-42
2.5.3	Elektrophoretisches Blotting.....	2-43
2.6	Enzymatische Testverfahren.....	2-44
2.6.1	Detektion von Thioredoxinen im FbPase-Test.....	2-45
2.6.2	Detektion von Thioredoxinen im NADP-MDH-Test.....	2-49
2.6.3	Untersuchung der Reaktion von Thioredoxinen und NiFe-Hydrogenase aus <i>Scenedesmus obliquus</i>	2-50
2.7	Immunologische Methoden.....	2-53
2.7.1	Western-Blot.....	2-53
2.7.2	ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay).....	2-54
2.8	Vorbereitung von Proteinproben für die Aminosäuresequenzierung.....	2-56
3.	Ergebnisse.....	3-58
3.1	Isolierung der Thioredoxine aus <i>Scenedesmus obliquus</i>	3-58
3.1.1	Trennung der verschiedenen Thioredoxine.....	3-58

3.1.2	Reinigung des 28 kDa-Trx <i>f</i> für die Sequenzierung	3-63
3.1.3	Präparation des <i>OEE</i> -Proteins (28 kDa-Trx <i>f</i>) aus <i>S. obliquus</i>	3-68
3.1.4	Vereinfachte Methode der Aufreinigung des <i>OEE</i> -Proteins aus <i>S. obliquus</i>	3-70
3.2	Sequenzierung des <i>OEE</i> -Proteins (28 kDa-Trx <i>f</i>) aus <i>S. obliquus</i>	3-73
3.3	Enzymatische Aktivitäten des <i>OEE</i> -Proteins (28 kDa-Trx <i>f</i>)	3-78
3.3.1	Sättigung der FbPase durch <i>S. obliquus</i> <i>OEE</i> -Protein (28 kDa-Trx <i>f</i>) ..	3-78
3.3.2	Aktivität des <i>OEE</i> -Proteins (28 kDa-Trx <i>f</i>) gegenüber der NiFe-Hydrogenase aus <i>Scenedesmus obliquus</i>	3-79
3.3.3	Aktivitätsvergleiche mit Spinat- <i>OEE</i> -Protein	3-80
3.4	Alkylierungsversuche an den <i>OEE</i> -Proteinen	3-82
3.4.1	Alkylierungsversuche an <i>OEE</i> -Protein aus <i>Scenedesmus</i> und Aktivität im FbPase-Test	3-82
3.4.2	Alkylierungsversuche an <i>OEE</i> -Protein aus Spinat und Aktivität im FbPase-Test	3-84
3.5	Analoge Proteine in anderen Grünalgen	3-86
3.5.1	Proteine aus <i>Chlorella vulgaris</i> mit FbPase-Stimulation	3-86
3.5.2	Proteine aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> mit FbPase-Stimulation	3-89
3.5.3	Immunologische Untersuchung der Algenproteine	3-90
4.	Diskussion	4-92
4.1	Das 28 kDa-Thioredoxin <i>f</i> und <i>OEE</i> der Grünalge <i>Scenedesmus obliquus</i> sind identische Proteine	4-92
4.2	Andere Fälle von Trx-„Simulation“	4-98
4.3	Untersuchungen an anderen Grünalgen	4-101
4.4	Physiologische Bedeutung der Thioredoxinaktivität des <i>OEE</i> -Proteins ...	4-102
4.5	<i>OEE</i> -Proteine und Thioredoxine: weitere Experimente und Überlegungen ...	4-105
5.	Zusammenfassung	5-107
6.	Literaturstellen	6-109
	Danksagung	118

1. Einleitung

Thioredoxine sind eine ungewöhnlich diversifizierte und multifunktionelle, universell verbreitete Familie kleiner Redoxproteine, die spezifischen reversiblen Dithiol-Disulfidwechsel in anderen Proteinen ermöglichen. Die Analyse spezifitätsbestimmender Strukturelemente und der Wechselwirkung zwischen Thioredoxinen und ihren Zielenzymen (*targets*) ist wegen der Vielfalt physiologisch ganz unterschiedlicher Kombinationen noch bei weitem nicht abgeschlossen. Die vorliegende Arbeit war innerhalb des Schwerpunkts Pflanzenbiochemie an der Universität Kassel ursprünglich darauf gerichtet, das schon früher aus der Grünalge *Scenedesmus obliquus* isolierte sog. Thioredoxin *f* ungewöhnlich hoher Molmasse (28 kDa) so weit strukturell zu charakterisieren, dass seine Verwandtschaft mit „normalen“ Thioredoxinen der Molmasse 11-12 kDa beurteilt werden konnte. Nachdem schon eine erste Aminosäuresequenzierung des N-Terminus Homologie zu einer ganz anderen Familie von Pflanzenproteinen, den chloroplastidären „*oxygen evolving enhancer*“-Proteinen (*OEE*) ergab, musste die Zielsetzung der Untersuchungen verändert und erweitert werden. Da sich die so festgestellten neuen Zusammenhänge ferner auf Grünalgen zu beschränken scheinen, muss die folgende Einleitung auf vier ganz unterschiedliche Themen eingehen: die Regulation von Enzymen des Pflanzenstoffwechsels allgemein, Grünalgen als pflanzenphysiologische Untersuchungsobjekte, die Thioredoxinprofile von höheren Pflanzenzellen und Algen sowie die bekannten Eigenschaften des *OEE*-Proteins.

1.1 Enzymregulation in Pflanzen

Pflanzen sind an das Substrat, auf dem sie wachsen gebunden und sind nicht in der Lage ihren Standort bei Änderungen der äußeren Bedingungen zu wechseln. Wie alle Lebewesen sind sie thermodynamisch gesehen offene Systeme, deren Zellen permanent Energie und Materie mit der Umgebung austauschen und damit das Fließgleichgewicht aufrecht erhalten. Da die Parameter der Außenwelt jedoch extrem schwanken können, sind sehr flexible Regulationsmechanismen an verschiedenen Punkten des Stoffwechsels erforderlich, um die Stabilität des Systems bei Änderungen der Lichtintensität, Temperatur und Feuchtigkeit zu gewährleisten.

Eine Regulation des Stoffwechsels unter verschiedenen Umweltbedingungen ist auf drei Ebenen möglich:

- Stoffwechsel-Intermediate können direkt die katalytische Aktivität der Enzyme beeinflussen und z.B. durch allosterische Regulation, kompetitive Hemmung oder andere nicht-kovalente Mechanismen die Stoffwechselwege kurzfristig beeinflussen.
- Eine *de-novo*-Synthese bestimmter Proteine wird durch Licht oder Phytohormone beeinflusst, wodurch sich die Enzymausstattung innerhalb von Stunden und Tagen an die Umweltfaktoren anpasst.
- Durch posttranslationale Modifikation der Enzymproteine kann die Aktivität verschiedener „Schlüsselenzyme“ kontrolliert und damit die betroffenen Stoffwechselwege in Minutenschnelle den jeweils herrschenden Bedingungen angepasst werden. Diesem Regulationsprinzip folgen z.B. Phosphorylierung/Dephosphorylierung, Reduktion/Oxidation und andere kovalente Veränderungen an den Enzymproteinen.

Letztlich ist das Zusammenspiel aller dieser Steuerungsmöglichkeiten für die Anpassung des Stoffwechsels verantwortlich.

Unter den Parametern der Außenwelt ist für eine Pflanze das Licht der entscheidende Faktor. Bei der im folgenden näher besprochenen „Lichtregulation“ handelt es sich um die unter dem letzten Punkt einzuordnende Redoxmodulation von Enzymen.

Aus der Tatsache, dass innerhalb der Chloroplasten die Enzyme der Synthese und des Abbaus der organischen Verbindungen koexistieren, ergibt sich, dass eine Regulation der Chloroplastenenzyme erforderlich ist. Während des Tages nutzt die Pflanze die Lichtenergie, um einen Teil des im Calvin-Cyclus assimilierten CO₂ in energiereiche Stärke umzusetzen, die dann bei Nacht in lichtunabhängigen Prozessen unter Mobilisierung der gespeicherten Energie wieder zu Triosephosphat abgebaut wird. Beide Prozesse müssen voneinander zeitlich getrennt ablaufen. Dieses setzt voraus, dass die Enzyme des Calvin-Cyclus bei Tageslicht aktiv sind und in Dunkelheit inaktiv sind. Dass für die Aktivierung bzw. Deaktivierung der Enzyme unter wechselnden Lichtintensität der Redoxzustand ihrer Disulfidbrücken von besonderer Bedeutung ist, hat B. Buchanan (Wolosiuk und Buchanan, 1977; Buchanan, 1980) erkannt.

Weil sich oxidierte und reduzierte Enzymformen stark in ihren katalytischen Eigenschaften unterscheiden, ist eine effektive Stoffwechselkontrolle durch Redoxmodulation möglich. So wird zum Beispiel durch die oxidative Inaktivierung einiger Calvin-Cyclus-Enzyme wie Glycerinaldehydphosphat-dehydrogenase, Fructose-1,6-bis-phosphatase (FbPase), Sedoheptulose-1,7-bis-phosphatase und Ribulose-5-phosphatkinase verhindert, dass im Dunkeln gleichzeitig Kohlenhydrat-Neusynthese und -Abbau als „*futile cycle*“ unter Energieverbrauch ablaufen. Ebenso wird durch Oxidation der γ -Untereinheit der chloroplastidären ATP-Synthase eine mögliche ATP-Hydrolyse im Dunkeln verhindert. Ein weiteres Enzym, das am Transport von Reduktionsäquivalenten aus den Chloroplasten beteiligt ist, ist die chloroplastidäre NADP-abhängige Malatdehydrogenase (MDH). Dieses Enzym nutzt im Chloroplasten erzeugtes NADPH zur Bildung von Malat, das über ein Translokatorprotein im Gegentausch mit Oxalacetat ins Cytosol transportiert wird. Durch diesen Mechanismus kann bei einer Überproduktion von NADPH im Chloroplasten das ATP/NADPH-Verhältnis dem Bedarf angepasst werden (Scheibe, 1987). Im Dunkeln wird ein Export von Reduktionsäquivalenten durch oxidative Inaktivierung der NADP-MDH verhindert. Zusätzlich ist dieses Enzym in C_4 -Pflanzen am Transport des im Malat fixierten CO_2 in die Bündelscheidenzellen-Chloroplasten beteiligt, wo es zusammen mit NADPH freigesetzt und über den Calvin-Cyclus effektiv assimiliert wird (Edwards *et al.*, 1985). Im Gegensatz dazu wird das Schlüsselenzym des oxidativen Pentosephosphat-Weges, die chloroplastidäre Glucose-6-phosphat-dehydrogenase durch Oxidation im Dunkeln aktiviert. Durch ihre Aktivität wird NADPH bereitgestellt, was im Licht kontraproduktiv wäre.

Tagsüber wird die Situation umgekehrt. Die Enzyme des Calvin-Cyclus und die NADP-MDH werden durch Wechsel in den reduzierten Zustand aktiviert, und es werden nun Kohlenhydrate aufgebaut; die Aktivität der Glucose-6-phosphat-dehydrogenase wird herabgesetzt da ohnehin NADPH hergestellt wird, die ATP-Synthase wird aktiviert. Auf diese Weise wird die Redoxmodulation von Chloroplastenzymen ein wirksamer Umschalter für gegenläufige Stoffwechselwege.

Dass die Reduktionsäquivalente, die bei dem Elektronentransport durch die Photosysteme II und I entstehen, als Quelle für die Redoxmodulation der Schlüsselenzyme dienen könnten, war einleuchtend. Aber erst nachdem auch in Pflanzen (Wolosiuk und Buchanan, 1978; Kallis und Holmgren, 1980) und Grünalgen Thioredoxine (Wagner und Follmann, 1977; Langlotz *et al.*, 1985; Langlotz *et*

al.,1986) sowie eine Ferredoxin-abhängige Thioredoxinreduktase (FTR) entdeckt wurden, konnte auch die stoffliche Basis erkannt und postuliert werden, dass Thioredoxine bei der Redoxregulation chloroplastidärer Schlüsselenzyme eine zentrale Funktion übernehmen. Es wurde der in Abb.1.1 gezeigte Mechanismus der lichtabhängigen Redoxregulation chloroplastidärer Enzyme vorgeschlagen (Buchanan, 1979; 1980; 1991; Scheibe, 1981) und in der Folge bewiesen:

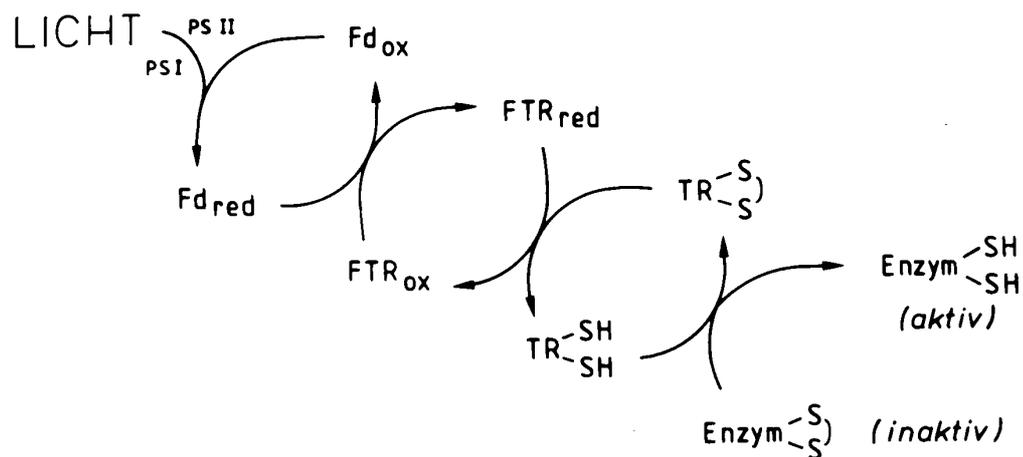


Abb. 1.1: Lichtabhängige Regulation von Zielenzymen durch das chloroplastidäre Thioredoxinsystem. Fd: Ferredoxin, FTR: Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase, TR: Thioredoxin, PS: Photosysteme

Nach diesem Schema werden Elektronen vom durch Licht angeregten Photosystem I auf Ferredoxin transferiert, das dann Reduktionsäquivalente auf die ferredoxinabhängige Thioredoxinreduktase (FTR) überträgt, die ihrerseits Thioredoxin reduziert. Das Thioredoxin reduziert nun regulatorische Disulfidbrücken im jeweiligen Zielenzym und die damit verbundene Konformationsänderung führt zu dessen Aktivierung oder Deaktivierung. Thermodynamisch gesehen ist es dabei wichtig, dass die einzelnen Glieder dieser Reaktionskette so angeordnet sind, dass die Redoxpotentiale im Ablauf der Kaskade allmählich zunehmen. Nur dann können die Reduktionsäquivalente ohne zusätzlichen Energieaufwand in Richtung des betroffenen Enzyms fließen. Die Richtigkeit dieser Anordnung wird durch die Redoxpotentiale der einzelnen Komponenten belegt (Tab 1.1).

Thioredoxine sind dabei nicht nur als Ein- und Ausschalter von Enzymaktivitäten im Chloroplastenstoffwechsel zu sehen, sie ermöglichen vielmehr eine graduelle

Anpassung an die aktuellen Lichtverhältnisse. Das spielt eine wichtige Rolle, wenn die Lichtstärke am Morgen langsam zunimmt und die Enzyme des Calvin-Cyclus allmählich aktiviert werden müssen, und umgekehrt am Abend bei abnehmender Lichtstärke und entsprechender Deaktivierung der Enzyme. Dadurch wird es möglich, das Verhältnis von Energiebedarf und Energieangebot in der Pflanze im Gleichgewicht zu halten.

Tab 1.1: Standard-Redoxpotentiale der Disulfidbindungen einzelner Proteine (gezeigt in Abb. 1.1)

Verbindung	E_0' (pH 7) in mV	Literaturstellen
Ferredoxin	-430	
Ferredoxinabhängige Thioredoxinreduktase	-230	Salamon <i>et al.</i> , 1995
Thioredoxin <i>f</i> , <i>m</i> aus Spinat	-210	Salamon <i>et al.</i> , 1995
Synthetische Bis-cysteinyloktapeptide (Modell für Proteindisulfide)	-215 bis -190	Siedler <i>et al.</i> , 1993

Außer den angesprochenen redoxregulierten Stoffwechselwegen gibt es in Pflanzen noch andere wichtige Prozesse, an denen Enzyme beteiligt sind, die durch Thioredoxine reguliert werden. Hierzu gehören das Enzym Protochlorophyllidreduktase (Kotzabasis *et al.*, 1989) der Chlorophyllbiosynthese und die Ferredoxin:Glutamatsynthase (Lichter und Häberlein, 1998), als Enzym der Stickstofffixierung. Ein weiteres interessantes Enzym, das neben Glucose-6-phosphat-dehydrogenase durch Reduktion deaktiviert wird, ist die in der Grünalge *Scenedesmus obliquus* vorkommende, am Wasserstoffmetabolismus beteiligte NiFe-Hydrogenase (Wünschiers *et al.*, 1999). Auf dieses Enzym wird in dieser Arbeit später detaillierter eingegangen. Insgesamt sind über 20 Enzyme bekannt, die durch Thioredoxin reguliert werden.

Neben der Redoxmodulation sind im Chloroplasten auch Fluktuationen von pH-Wert und Mg^{2+} -Konzentration an der Stoffwechselregulation beteiligt. Bei Belichtung erfolgt eine Ansäuerung im Thylakoidraum und ein Anstieg des pH-Wertes im Stroma von 7,2 auf 8,0 mit gleichzeitigen Erhöhung der Mg^{2+} -Konzentration. Das hat eine

zusätzliche Aktivierung der Enzyme des reduktiven Pentosephosphatweges Fructose-1,6- und Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase, die ohnehin durch reduziertes Thioredoxin stimuliert sind, zur Folge.

Einen Überblick über Thioredoxin-regulierte Prozesse und die betroffenen Enzyme in Pflanzen gibt Tab 1.2.

Tabelle 1.2: Thioredoxin-modulierte Chloroplastenenzyme der Algen und höheren Pflanzen (aus Follmann, 2000).

Enzym	Quelle	Quartärstruktur / Zahl Cysteine	Thioredoxin- reaktive Sequenz	Literaturstellen
Glucose-6-phosphat- dehydrogenase (EC 1.1.1.49)	Erbse, Kartoffel	tetramer, 6 / subunit	CRIDKRENC	Wenderoth <i>et al.</i> , 1997
NADP-Malat- Dehydrogenase (EC 1.1.1.82)	mehrere Pflanzenspezies	dimer, 8 / subunit	CYGVFCC- 11aa-C	Scheibe <i>et al.</i> , 1991; Issakidis <i>et al.</i> , 1994
NADP- Glycer- aldehydphosphat- dehydrogenase (EC 1.2.1.13)	Spinat, Erbse	tetramer, A ₂ B ₂ , 6-8 / subunit	C-265aa-C	Li <i>et al.</i> , 1994 Baalman <i>et al.</i> , 1995
Protochlorophyllid- reductase (EC 1.3.1.33)	grüne Algen	monomer	nicht identifiziert	Kotzabasis <i>et al.</i> , 1989
Glutamatsynthase (Ferreodoxin) (EC 1.4.7.1)	Mais, Spinat, Soyabohne	monomer, 18	nicht identifiziert	Lichter und Häberlein, 1998
Phospho-adenylyl- sulfat-(PAPS)- reductase (EC 1.8.x)	Spinat	dimer, (1 / subunit)	nicht identifiziert	Schwenn, 1989
Hydrogenase (EC 1.18.99.1)	grüne Algen	dimer, (> 2)	nicht identifiziert	Wünschiers <i>et al.</i> , 1999
Phospho- ribulosekinase (EC 2.7.1.19)	Spinat	dimer, 4 / subunit	C-37aa-C	Porter <i>at al.</i> , 1988
Adenylylsulfat- (APS)-kinase (EC 2.7.1.25)	grüne Algen		nicht identifiziert	Schwenn und Schriek, 1984
Fructose- bisphosphatase (EC 3.1.3.11)	mehrere Pflanzenspezies	tetramer, 6 / subunit	CVVNVC	Marcus und Harsch, 1990

Enzym	Quelle	Quartärstruktur/ Zahl Cysteine	Thioredoxin- reaktive Sequenz	Literaturstellen
Sedoheptulose- bisphosphatase (EC 3.1.3.37)	Spinat, Weizen	dimer, 6 / subunit	nicht identifiziert	Cadet <i>et al.</i> , 1987
ATP-Synthase γ -Untereinheit (EC 3.6.1.34)	Spinat	monomer, 4	CDINGKC	Miki <i>et al.</i> , 1988
Aminolevulinat- dehydratase (EC 4.2.1.24)	Rettichsämlinge		nicht identifiziert	Balange und Lambert, 1983
Glutaminsynthetase (EC 6.3.1.2)	grüne Algen	octamer, 2-3 /subunit	nicht identifiziert	Tischner und Schmidt, 1982; Beudeker und Tabita, 1985
Acetyl-CoA- carboxylase (EC 6.4.1.2)	Erbse	komplex	nicht identifiziert	Sasaki <i>et al.</i> , 1997

1.2 Das Thioredoxinsystem der Pflanzen

Thioredoxine (Trx) sind kleine säurestabile und hitzestabile Dicystein-Proteine, die in allen Organismen (Holmgren, 1977; Buchanan, 1980; 1981) gefunden werden. Sie agieren als Proteindisulfidoxidoreduktasen (Holmgren, 1985), die ihren Redoxzustand zwischen der Disulfid- und der Dithiolform wechseln können. Die zuerst erkannte Funktion der Thioredoxine war ihre Rolle als Wasserstoffdonatoren bei der Biosynthese der Desoxyribonucleotide, katalysiert durch Ribonucleotidreduktasen (Laurent, 1964; Thelander und Reichard, 1979; Lammers und Follmann, 1983). Wie später bekannt geworden, lassen sich außerdem durch Thioredoxine eine Vielzahl von Prozessen in der Zelle regulieren. Diese Regulation erfolgt im Allgemeinen über die Steuerung der Aktivität einiger Schlüsselenzyme, indem durch Thioredoxine der Redoxzustand dieser Enzyme moduliert wird. Die erforderlichen Reduktionsäquivalente werden aus dem NADPH-Pool der Zelle über Thioredoxinreduktase und Thioredoxin zur katalytisch aktiven Dicystein-Struktur eines Enzyms transferiert. Besonders wichtig und vielfältig ist eine Regulation der Enzyme in den photosynthetischen Organismen bei einem Tag-Nacht-Wechsel, wie

im Abschnitt 1.1 angesprochen. In Pflanzen dient in diesem Fall als Quelle der Reduktionsäquivalente das reduzierte Ferredoxin, das seinerseits die Elektronen von dem Photosystem I bezieht (Abb1.1) (Buchanan, 1979; Scheibe, 1981).

Obwohl die Aminosäuresequenzen der Thioredoxine verschiedener Species nur zu 27 bis 67 % identisch sind, sind die dreidimensionalen Strukturen aller Trx sehr ähnlich. Das wird durch röntgenkristallographische und NMR-Untersuchungen des *E. coli*-Trx (Eklund *et al.*, 1984; Katti *et al.*, 1990), des menschlichen Trx, und der Trx in grünen Algen (Qin *et al.*, 1994; Mittard *et al.*, 1997) belegt. Viele Aminosäuren der Primärsequenz, die für die Erhaltung der Tertiärstruktur und vor allem das aktive Zentrum mit der Sequenz -Trp-Cys-Gly-Pro-Cys-, die für die Redoxfunktion verantwortlich ist, sind hoch konserviert (Sodamo *et al.*, 1991).

Das *E. coli* Thioredoxin gilt als Prototyp der ganzen Proteinfamilie. Das globuläre Molekül (Abb. 1.2) besteht aus 5 β -Faltblattabschnitten, die von 4 α -Helices umgeben sind. Das aktive Zentrum mit der Sequenz -WCGPC- befindet sich in einer Schleife zwischen dem mittleren β -Strang und der α 2-Helix als 14-gliedriger Disulfidring innerhalb eines ungeladenen hydrophoben Bereiches. Das aktive Disulfid aus Cys 32 und Cys 35 am aminoterminalen Ende der α 2-Helix wird von dem Rest der Helix durch einen Knick am Pro 40 separiert. Dadurch gelangt das aktive Zentrum in eine exponierte Lage, während sich die Disulfidbrücke an der Innenseite der α 2-Helix befindet und durch sie bedeckt wird (Eklund *et al.*, 1991).

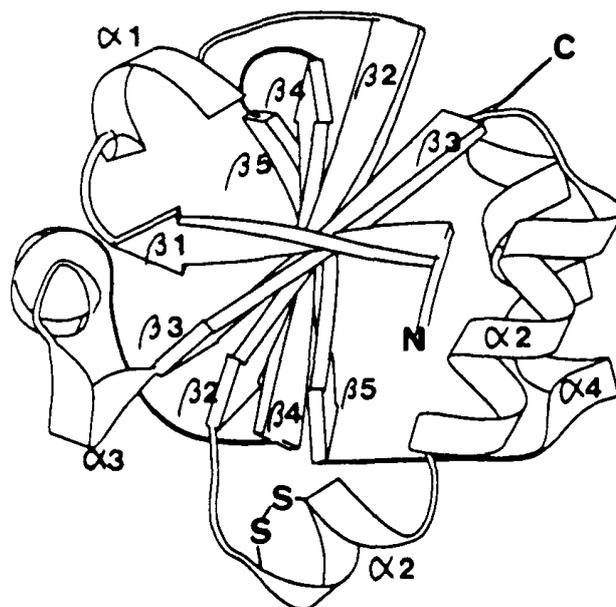


Abb. 1.2: 3D-Struktur des oxidierten *E. coli*-Thioredoxins bestimmt durch Röntgenkristallographie (Eklund *et al.*, 1991)

Die Umgebung des aktiven Zentrums ist hydrophob und gilt als Hauptbereich für die Wechselwirkungen mit der Thioredoxinreduktase und Ribonucleotidreduktase (Eklund *et al.*, 1984). Spätere Untersuchungen der Kristallstruktur der Trx-*m* und Trx-*f* aus Spinat unterstützen diese Daten (Capitani *et al.*, 2000).

NMR-Untersuchungen zeigten, dass beim Übergang von einer Disulfid- in die Dithiolform bei Thioredoxin aus *E. coli* und dem Menschen Konformationsänderungen eintreten (Jeng *et al.*, 1994; Qin *et al.*, 1994), die sich nur auf das aktive Zentrum und seine Umgebung beschränken. Die Position des Cys35 bleibt unverändert, während die Seitenkette des Cys32 von der hydrophoben Region wegrotiert. Dadurch kommt es zu einer Vergrößerung des Abstandes zwischen den beiden Schwefelatomen von 2.05 Å der Disulfidform auf 3.8 Å der Dithiolform und einer Positionsänderung von Pro34 (Dyson *et al.*, 1990) (Abb. 1.3). Die Konformationsänderung macht sich auch durch eine Verstärkung der Fluoreszenz des Trp28 bei der Reduktion des aktiven Zentrums bemerkbar.

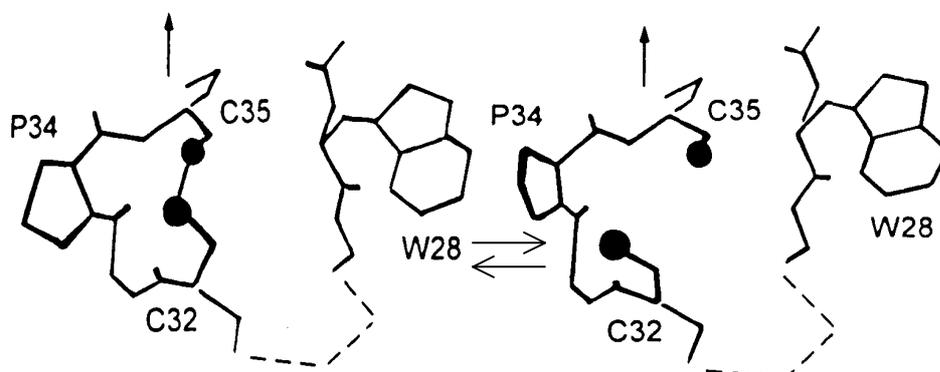


Abb. 1.3: 3D-Struktur des aktiven Zentrums des *E. coli*-Thioredoxins: links oxidiert, rechts reduziert

Einen Überblick über die Vielfalt und intrazelluläre Lokalisation der Thioredoxine in verschiedenen Organismen gibt Tabelle 1.3. Wie aus der Tabelle ersichtlich, besitzen Grünalgen und höhere Pflanzen generell mehr verschiedene Thioredoxine als Tiere und Bakterien (ausgenommen Cyanobakterien). So enthalten z.B. Sojasamen 6 verschiedene Thioredoxine (Häberlein *et al.*, 1995). Man weiß heute aus Ergebnissen des *Arabidopsis thaliana* Genomprojektes, dass die phototrophen Organismen nicht nur viele Thioredoxine haben, sondern auch mehr Gene mit

thioredoxinspezifischen und thioredoxinähnlichen Sequenzen enthalten als jeweils Thioredoxine isoliert und charakterisiert wurden. Dieses verdeutlicht die Wichtigkeit weiterer Forschung auf dem Thioredoxin-Gebiet, die in Grünalgen und höheren Pflanzen Ende der 70-er Jahre begonnen hat (Wagner und Follmann, 1977; Wolosiuk und Buchanan, 1978).

Tabelle 1.3: Vielfalt und intrazelluläre Lokalisation der Thioredoxine in verschiedenen Organismen, (*) Thioredoxin mit Mr>25 kDa (aus Follmann und Häberlein, 1996; dort zitierte Literatur)

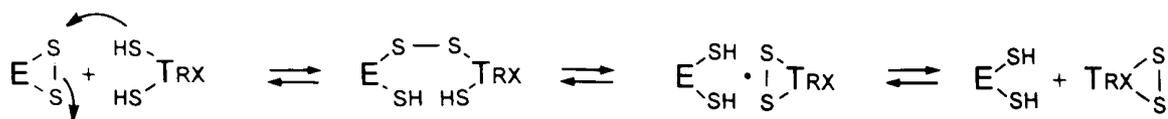
Organismus	Anzahl der isolierten Thioredoxine	Lokalisation	Anzahl an identifizierten Thioredoxin-Gene
Bakterien:			
<i>E. coli</i> und andere Bakterien	1		1 (trx A)
<i>Corynebacterium nephridii</i>	1+1 (C-1; C-2)		(>) 2
<i>Anabaena sp.</i> und andere Cyanobakterien	2+1 (T-1, T-2; f*)	In veget. Zellen und Heterocysten	2 (T-1, T-2)
Grünalgen:			
<i>Scenedesmus obliquus</i>	3+1 (I, II, III. f*)	1 chl (f), 3 cyt + mt	
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	3 (m, f, h)	2 chl, 1 cyt (h)	2 (h, m)
<i>Acetabularia mediterranea</i>	4 (m, f, h)	3 chl, 1 nicht chl.	
Höhere Pflanzen:			
Spinat (Blätter, Wurzeln)	6 (m, f, mt1, mt2; h1, h2)	2 chl, 2 mt, 2 cyt	2 (m, f)
Sojabohne (Samen, Blätter)	6 (Ia, b; IIa, b, c; III)	2 chl, 2 mt, 2 cyt	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	mehrere	Funktion der Genprodukte unbekannt	4m, 2f, 8h+andere
Pilze:			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4 (I, II, III; mt*)		3
<i>Dictyostelium discoideum</i>	3 (Dd I, II, III)		3
Tiere:			
Säuger (Rind, Schwein, Maus, Ratte, Mensch)	2	1 cyt, 1 mt	> 1+1 Pseudogen

Die Thioredoxine in Chloroplasten der Pflanzen werden in zwei Gruppen aufgeteilt: die des *f*-Typs (Trx-*f*) und des *m*-Typs (Trx-*m*). Sie unterscheiden sich im Fall der Spinat-Thioredoxine erheblich in ihren Aminosäuresequenzen, die nur 27% Homologie aufweisen (Jacquot *et al.*, 1997). Trx-*m* ist so genannt worden, weil es die

NADP⁺-abhängige MDH durch Reduktion stimulieren kann. Trx-*f* wird so bezeichnet weil es das Enzym Fructose-1,6-bisphosphatase stärker stimuliert. Während das Trx-*m* viel Ähnlichkeit mit prokaryotischen Thioredoxinen hat, wird das Trx-*f* zusammen mit dem cytosolischen Trx-*h* (*h* für heterotroph) in die eukaryotische Trx-Gruppe eingestuft, obwohl diese beiden sich auch voneinander in ihrer Aminosäurereihenfolge unterscheiden. Als Zielenzyme, die durch Trx-*f* einer Regulation unterliegen, sind einige Enzyme des Calvin-Cyclus, die bereits im vorigen Unterkapitel besprochen wurden, bekannt. Beide Trx können auch sehr effizient die ATP-Synthase der Thylakoidmembranen stimulieren (Schwarz *et al.*, 1997). Die Präferenz der Zielenzyme entweder durch Trx-*f* oder Trx-*m* reguliert zu sein, wird durch die Eigenschaften der Kontaktregion des Zielenzym bestimmt.

Die Annahme, dass die reduzierte Form eines Trx die Disulfidbrücke eines Zielenzym reduziert, das folglich eine neue Konformation annimmt und seine Aktivität dabei verändert (Holmgren, 1985; 1989; 1995) ist weitgehend akzeptiert. Dagegen ist der genaue Mechanismus der Protein-Protein-Wechselwirkung des Trx und des Zielenzym noch nicht völlig verstanden, zumal es auch einige Berichte über die Wechselwirkungen zwischen modifizierten Trx-Formen und deren Zielenzymen gibt (Häberlein *et al.*, 1992; Brandes *et al.*, 1993; Geck *et al.*, 1996).

Einen postulierten Mechanismus der Reduktion der regulatorischen Disulfidbindung am Zielenzym durch Thioredoxin zeigt folgendes Schema:



Als Reaktionsmechanismus der Wechselwirkung zwischen Thioredoxinen und von ihnen modulierten Proteinen galt anfänglich ein direkter, einfacher Dithiol-Disulfid-Austausch:



Inzwischen ist der Prozess als komplexer erkannt worden und beinhaltet nach einem anfänglichen „Enzym-Substrat-Komplex“ die Bildung eines intermediären gemischten Disulfids (Schritt 1) sowie eines Komplexes aus reduziertem Enzym und oxidiertem Thioredoxin (Schritt 2). Erst im Schritt 3 erfolgt dann die Dissoziation des

Komplexes von oxidierten Thioredoxin und dem Zielenzym. Alle diese Schritte sind Gleichgewichtsreaktionen.

Die Existenz eines physiologisch relevanten Komplexes zwischen Schritt 2 und 3 wurde insbesondere durch I. Häberlein und Mitarbeiter an der Universität Kassel postuliert und wahrscheinlich gemacht. Aus diesem Komplex, in dem das Zielenzym bereits reduziert ist, aber noch nicht in freier, aktiver Form vorliegt, kann es den äußeren Bedingungen (z. B. allmähliche Zunahme der Lichtintensität) und der Stoffwechselsituation entsprechend leichter voll aktiv freigesetzt werden als durch direkte chemische Reduktion. Eine wichtige Rolle spielen dabei Protein-Protein-Wechselwirkungen zwischen Thioredoxin und Enzym. Das wurde anhand der Tatsache gezeigt, dass auch Thioredoxine mit chemisch modifizierten Thiolgruppen in Anwesenheit von geringen Mengen an nativen Thioredoxin zu einer Stimulation von NADP-MDH und FbPase befähigt sind (Scheibe, 1981; Häberlein *et al.* 1992).

Die Komplexbildung wurde auch durch kinetische Untersuchungen der Reaktion von FbPase aus Sojabohne und Spinat mit unterschiedlichen Thioredoxinen bestätigt (Häberlein und Vogeler, 1995). Das Sättigungsverhalten des Enzyms und die Tatsache, dass eine maximal erreichbare Stimulation der FbPase von dem verwendeten Thioredoxin abhängig ist, lassen den Schluss zu, daß es bei der Reaktion zur Ausbildung eines Thioredoxin-FbPase-Komplexes kommt. Solche Protein-Enzymwechselwirkungen ermöglichen der Pflanzenzelle eine Feinregulation der Enzymaktivitäten zur Anpassung an wechselnde Lichtintensitäten und spielen offenbar eine Rolle bei der Spezifität verschiedener Thioredoxine gegenüber unterschiedlichen Enzymen.

Einen interessanten Fall stellt in diesem Zusammenhang die Redoxregulation der chloroplastidären ATP-Synthase dar. Über diesen Enzymkomplex ist bekannt, daß dessen γ -Untereinheit des CF₁-Partikels eine Region aus neun Aminosäuren aufweist, welche zwei Cysteine enthält (in Spinat Cys-199 und Cys-205) (Miki *et al.*, 1988), die eine Disulfidbrücke bilden. Diese kann durch reduziertes Trx gespalten und in die Dithiolform überführt werden, was eine Aktivierung des ATP-Synthase-Komplexes zur Folge hat. *In-vitro* Untersuchungen zum Mechanismus dieser Aktivierung mit gentechnisch veränderten Thioredoxinen *f* und *m*, bei denen beide Cysteinreste durch Serin ersetzt wurden (Stumpp *et al.*, 1999), zeigten trotz fehlenden Thiolgruppen in Anwesenheit von niedrigen Konzentrationen (1 mM) an Dithiotreit (DTT) eine Stimulation der CF₁-Untereinheit des Komplexes (10% im Fall

des Trx-*m* und 28% im Fall des Trx-*f* von der mit unverändertem Trx erreichbaren Stimulation).

Auf Grund dieser Tatsache wurde postuliert, dass bereits das Andocken des Thioredoxins an die γ -Untereinheit eine Konformationsänderung verursacht, deren Folge eine leichtere Reduzierbarkeit der Disulfidbrücke des Zielenzym durch DTT ist. Dieser Befund unterstützt die Annahme, daß Trx nicht nur ein reines Reduktionsmittel darstellt, sondern es induziert eine kritische Konformationsänderung im Zielenzym, welche die Empfindlichkeit der Disulfidbrücke des Zielenzym gegenüber DTT und insbesondere des Trx selbst um vielfaches erhöht. Es kann spekuliert werden, dass der gleiche Effekt mit alkyliertem Trx beobachtet werden sollte. In einem Experiment mit alkyliertem *E. coli*-Trx, der MDH und Fructose-1,6-bis-phosphatase konnte dieses jedoch nur teilweise bestätigt werden (Häberlein *et al.*, 1992).

Ein interessantes System für systematische Untersuchungen an dem Thioredoxin-Zielenzym Redoxsystem wurde kürzlich von Motohashi *et al.*, (2001) entwickelt. Die Autoren haben sich dabei der Eigenschaft der Reaktionspartner, ein gemischtes Disulfid zu bilden bedient. Da bekanntlich die Disulfidbrücke zwischen den beiden Reaktionspartner durch die zweite Sulfhydrylgruppe des Thioredoxins aufgelöst wird, ist dieses Disulfid-Intermediat nur kurzzeitig existent. Um eine dauerhafte Bindung des Thioredoxins an das Enzym zu ermöglichen, hat man eins der Cysteine durch Serin ersetzt. Durch die Immobilisierung der modifizierten Thioredoxine an ein Harz ist es den Autoren gelungen, gezielt nach Reaktionspartnern des Spinat-Trx *m* im Extrakt aus Spinatchloroplasten zu suchen.

So konnte man durch Anwendung dieser Methode die Rubisco-Activase (45 kDa), die Glyceraldehyd-3-phosphat-dehydrogenase und das 2-Cys-Peroxiredoxin als Reaktionspartner des Trx-*m* bestätigen. Die als Zielenzym des Trx-*f* geltende Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase aus Spinat, die durch Trx-*m* nicht stimuliert wird (Popitz, 1997), und die durch *E. coli*-Trx nicht stimulierbare Spinat-Glutaminsynthetase (Lichter und Häberlein, 1998), zeigten in diesem Fall ebenso eine Bindung an das immobilisierte Trx-*m*. Im Gegensatz dazu konnten einige Zielenzyme, wie NADP-Malat- und die Glucose-6-phosphat-dehydrogenase, die als natürliche Reaktionspartner des Trx-*m* gelten, durch Anwendung dieser Methode nicht erfasst werden. Ein interessantes Ergebnis dieses Experiments ist die gezeigte Bindung der kleinen Untereinheit der Rubisco an das immobilisierte Trx-*m*. Von

diesem Protein wurde schon früher berichtet, dass es in der Lage ist die NADP-MDH aus Mais DTT-abhängig zu stimulieren und damit eine Trx-*m*-Aktivität zeigt (Jacquot *et al.*, 1983). Schließlich konnte gezeigt werden, daß auch andere Proteine mit Trx reagieren können, z.B. ein 21,6 kDa Protein, das Homologie zu Cyclophilin aus *Arabidopsis thaliana* zeigt, ein 18,6 kDa Protein, mit Homologie zu *bacterioferritin comigratory protein* aus *E. coli* und weitere Proteine mit 43, 32 und 27,5 kDa Molmasse deren Aminosäuresequenzen bis jetzt in keiner Datenbank enthalten sind. Die Anwendung dieser Methode für die Suche nach möglichen Reaktionspartnern des Thioredoxins zeigt widersprüchliche Ergebnisse und benötigt einer ausführlicher Diskussion. Für präparative Anwendungen wäre sie jedoch gut geeignet.

Auch die Regeneration von reduziertem Thioredoxin aus der oxidierten Form durch Thioredoxinreduktasen ist in Pflanzen stärker differenziert als in Bakterien und tierischen Zellen. Pflanzen enthalten dafür drei Enzyme (Banze und Follmann, 2000), nämlich eine typisch eukaryotische NADPH-Thioredoxinreduktase (NTR), eine mitochondriale NTR etwas größerer Molmasse, und in Chloroplasten eine Ferredoxin-abhängige Thioredoxinreduktase (FTR), die aus zwei verschiedenen Untereinheiten besteht. NTR besitzen Flavine, FTR Eisen-Schwefel-Zentren für den Elektronentransport von externen Reduktionsmitteln auf Trx-Disulfidbindungen. Bei der Analyse von Thioredoxin-Effekten gegenüber Zielenzymen *in vitro* werden allerdings i.a. NTR bzw. FTR nicht verwendet, sondern Thioredoxine durch niedrige Konzentrationen von Dithiothreitol in der reduzierten Form gehalten.

1.3 Grünalgen als pflanzenphysiologische Objekte

Die Grünalgen (*Chlorophyta*) stehen den höheren grünen Pflanzen näher als den anderen Abteilungen der Algen. Ihr Photosyntheseapparat ist sehr ähnlich zu dem der höheren Pflanzen, beide Gruppen besitzen die gleichen Photosynthesepigmente (Chlorophyll *a* und *b*), den gleichen Satz an Carotinoiden (*alpha*-, *beta*- und *gamma*-Carotin, Lutein, Zeaxanthin, Violaxanthin u.a.), den gleichen Reservestoff (Stärke) und die gleiche Gerüstsubstanz der Zellwand, Cellulose. Weil sie viele Eigenschaften der höheren Pflanzen aufweisen und dabei viel leichter handhabbar sind, sind sie besonders attraktive Forschungsobjekten. Folgende Vorteile sind hier zu erwähnen:

- Grünalgen sind Eukaryonten, können jedoch mit mikrobiologischen Standardtechniken behandelt werden

- Sie sind nicht pathogen
- Sie sind einfach zu kultivieren, wachsen als photosynthetische oder auch als heterotrophe Organismen. In Kombination mit der einfachen Anzucht und der hohen Wachstumsrate (wodurch immer ausreichend biologisches Material für Untersuchungen zur Verfügung steht) stellen sie gut geeignete Systeme für unterschiedliche Studien dar
- Sie wachsen als synchrone und als asynchrone Kulturen, was sie auch zu guten Untersuchungsobjekten des Zellcyclus macht
- Sie haben einen schnellen Mitosecyclus und eine kontrollierte sexuelle Reproduktion
- Viele Mutantenstämme und DNA-Klone (allerdings noch kein komplettes Genom) sind verfügbar

Grünalgen sind weit verbreitet. Die meisten Arten findet man im Süßwasser, andere im Salzwasser, im Boden, an Baumstämmen oder als Symbionten von Protozoen (*Paramecium bursaria*), Coelenteraten (*Hydra*) und Pilzen (Flechten: *Lichenes*). Die meisten Vertreter der *Chlorophyta* sind stets oder zeitweise begeißelt. Begeißelte Stadien (vegetative Zellen, Zoosporen, Gameten) bewegen sich phototaktisch, viele Arten besitzen ein Stigma ("Augenfleck"), das in der Regel in einem Chloroplasten lokalisiert ist. Die Grünalgen besitzen meist viele und unterschiedlich strukturierte Chloroplasten.

Es wird verstärkt versucht, Näheres über den phylogenetischen Hintergrund der *Chlorophyta* zu erfahren, insbesondere über ihre Beziehung zu den Landpflanzen (Chapman und Buchheim, 1992). So wird dem Bau des Geißelapparates, des Cytoskeletts, der Mitose und Cytokinese zunehmend Bedeutung beigemessen. Aufgrund von DNA-Sequenzierung einiger Gene, besonders der ribosomalen Untereinheiten, zeichnen sich in letzter Zeit neue phylogenetische Zusammenhänge ab, die zu einer erheblichen Umstellung des herkömmlichen Systems der Grünalgen führen könnten (Coleman, 1999; Buchheim und Chapman, 1991).

Für die physiologische und biochemische Forschung sind besonders zwei Ordnungen der Klasse *Chlorophyceae* von großem Interesse, da zu denen einige wichtige Untersuchungsobjekte gehören:

Die ***Volvocales*** enthalten einzellige und koloniebildende, in der Regel begeißelte Arten. Die Zellen der *Volvocales* sind meist von einer mehrschichtigen, protein- und

kohlenhydrathaltigen Wand umgeben. Die Lage und Form des Chloroplasten ist artspezifisch. Typisch ist der becherförmige Chloroplast von *Chlamydomonas*, der ein großes Pyrenoid enthält und den Zellkern umgibt. Im vorderen Bereich des Chloroplasten, dicht unter der Plastidenhülle und Plasmalemma liegt das carotinoidhaltige Stigma. Der eigentliche Photorezeptor wird von den peripher dazu liegenden Membranen gebildet. Die stets einzelligen Arten aus der Gattung *Chlamydomonas* gehören zu den viel genutzten Objekten pflanzlicher Grundlagenforschung, von denen insbesondere *Chlamydomonas reinhardtii* bekannt ist. *Chlamydomonas reinhardtii* ist eine einzellige begeißelte etwa 10 µm lange Grünalge (Abb. 1.4). Besondere Beachtung fanden die Kompatibilitätstypen (= Paarungstypen) von ansonsten isogamen Arten (+ und - Stämme).

Die **Chlorococcales** sind dadurch charakterisiert, dass sie üblicherweise unbegeißelt sind und feste Zellwände besitzen. In diesem Zustand fehlen dann auch pulsierende Vakuolen und Stigmen. Gameten und Zoosporen haben allerdings Geißeln und gleichen den reproduktiven Stadien der *Volvocales*. Manche Arten bilden keine Zoosporen, sondern Tochterzellen innerhalb der Mutterzellwand, die der Mutterzelle gleichen (Autosporen).

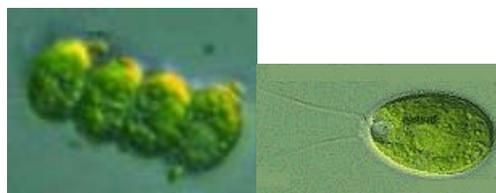


Abb. 1.4: *Scenedesmus obliquus* (links), *Chlamydomonas reinhardtii* (rechts), nicht maßstabsmäßig dargestellt.

Es gibt einzellige und koloniebildende Arten. Vielzellige Arten bestehen oft aus einer bestimmten Anzahl von Zellen die in Verbänden vorliegen wie bei *Scenedesmus* (Abb 1.4). Diese Zellverbände entwickeln sich aus Tochterzellen, die nach der Teilung die Mutterzellwand zunächst nicht verlassen und sich dann in typischer Weise arrangieren. Beim Heranwachsen sprengen später die Tochterzellen die Mutterzellwand.

Die Zellwand der *Chlorococcales* besteht meist aus einem Cellulosegerüst, in das andere Moleküle eingelagert sind. Bei vielen Arten ist sie mehrschichtig, so besteht z.B. eine der Schichten der *Chlorella*- und *Scenedesmus*-Wand aus Polymeren aus

ungesättigten Kohlenwasserstoffketten, die sich aus der Fettsäurebiosynthese herleiten lassen. Oft sind den Wänden strukturbildende Substanzen aufgelagert. Sexuelle Fortpflanzung findet nur selten statt. In vielen Gattungen, z.B. *Chlorella*, wurde nie eine Gametenbildung gesehen.

Der bekannteste Vertreter der *Chlorococcales* ist *Chlorella*. Arten dieser Gattung sind Standardobjekte der Photosyntheseforschung. Sie sind im Süß- und Salzwasser sowie im Boden verbreitet. Die Zellen enthalten ein einziges, auffallend komplex strukturiertes Mitochondrium. Auch *Scenedesmus obliquus* ist eine allgemein verbreitete Grünalge und tritt häufig als fast reine Kultur im Süßwasserplankton auf. Übliche Lebensräume sind saubere Teiche, Seen und Flüsse. Sie tritt in Kolonien von zwei, vier oder acht Zellen auf. Die Morphologie der Kolonie kann durch das Verändern des Mediums verändert werden, in dem die Zellen wachsen. Bei einem Mangel an Phosphor gehen diese Algen zu einem einzelligen Wachstum über. Diese Algen haben einen einzelnen lamellenförmigen Chloroplasten. Die Zellwand enthält hauptsächlich Cellulose, Pektin und Sporopollenine, was sie extrem widerstandsfähig macht. *Scenedesmus obliquus* vermehrt sich vorwiegend asexuell. Ein frei bewegliches Stadium in dem Lebenszyklus (Zoosporen) ist ein sehr seltenes Phänomen und kann nur unter Stickstoffentzug beobachtet werden. Wie alle *Chlorophyta* hat *Scenedesmus* Chlorophyll *a* und *b* als photosynthetische Pigmente und bildet Stärke innerhalb des Chloroplastes. Da diese Spezies leicht kultiviert werden kann, wurden schon früh Untersuchungen an dieser Alge durchgeführt. Eins der interessantesten Phänomene, das bei Grünalgen beobachtet wurde, ist der von Gaffron (1939; 1940), einem Mitarbeiter von Otto Warburg, entdeckte Wasserstoffmetabolismus in *Scenedesmus obliquus*. Seit langem wird versucht die Eigenschaft der Alge, Wasserstoff zu entwickeln nützlich zu machen. Der entstehende Wasserstoff könnte in Zukunft in Verbindung mit Brennstoffzellen als Energielieferant mit hohem Wirkungsgrad dienen. Allerdings sind die dafür verantwortliche Enzyme sehr Sauerstoffempfindlich und es ist bisher lediglich gelungen diese Idee in einem kleinen Laboransatz umzusetzen (Wüschiers und Schulz, 1998).

Der Reichtum an Inhaltsstoffen macht die Vertreter der *Chlorococcales* auch ernährungswissenschaftlich und wirtschaftlich interessant. An Proteingehalt übertrifft z.B. *Chlorella vulgaris* Sojabohnen und Hühnereier, und so reichen 100 Gramm Algen in Pulverform, um den täglichen Eiweißbedarf eines Menschen zu decken.

Außerdem sind sie reich an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie Linolen- und Linolsäure, Mineralstoffen wie Calcium und Magnesium, Spurenelementen wie Eisen und Selen, Vitaminen. Insbesondere Vitamin *E* und Carotinoide stärken die Widerstandskraft des Organismus gegen den Angriff freier Radikale.

Tests mit Nutztieren belegen, dass bei 0,5 Prozent Mikroalgenzusatz im Futter Hennen mehr und größere Eier legen. Der Cholesteringehalt im Eigelb sinkt um 16% und der Carotingehalt ist deutlich höher als gewöhnlich. Vor allem in Südostasien weiß man die ernährungsphysiologischen Besonderheiten von Algen zu schätzen, wo man Algen in größeren Maßstab heranzüchtet. In Deutschland beschäftigt sich u.a. das Fraunhofer-Institut für Bioverfahrenstechnik mit der Kultivierung von Grünalgen in neuartigen Airlift-Reaktoren.

1.4 Thioredoxine in *Scenedesmus obliquus*

An Grünalgen wurde als erstes das Thioredoxin-Profil von *Scenedesmus obliquus* detailliert untersucht (Wagner *et al.*, 1978; Langlotz *et al.*, 1986a, 1986b). Es ist bekannt, daß sie vier Thioredoxine enthält, nämlich Thioredoxine I, II und III mit regulären Molmassen von 12 kDa und ein Thioredoxin *f* mit anomalem M_r von 28 kDa. Thioredoxine I und II sind in der Lage, die NADP-Malaldehydrogenase stark zu stimulieren und fungieren als Wasserstoffdonor der homologen Ribonucleotidreduktase (Hofmann *et al.*, 1985).

Die Fructose-1,6-bisphosphatase wird durch diese zwei Trx auch stimuliert, aber wesentlich schwächer. Das 28 kDa-Trx *f* stimuliert dagegen stark die Fructose-1,6-bisphosphatase, aber auch die *Scenedesmus*-eigene NADP-MDH, kaum dagegen die des Spinats. Ein weiteres Enzym, mit dem das 28 kDa-Trx *f* eine schwache Reaktion gezeigt hat, ist die Ribonucleotidreduktase aus *E. coli*, nicht jedoch die eigene aus *Scenedesmus*. Um die Vielfalt der Prozesse auf die das 28 kDa-Trx *f* Einfluss hat zu unterstreichen, muss man hier auch die Protochlorophyllidreduktase erwähnen, die für die Reduktion des Protochlorophyllids zu Chlorophyllid verantwortlich ist. Dieses Enzym, wie von Kotzabasis *et al.* (1988) beobachtet, wird durch Thioredoxine I und II stimuliert, am meisten aber durch Trx-*f*.

Außerordentlich interessant ist die vor wenigen Jahren von Wünschiers *et al.* (1999) beobachtete starke Inhibition der aus *Scenedesmus obliquus* isolierten, unter

anaeroben Bedingungen induzierbaren NiFe-Hydrogenase durch *Scenedesmus-Trx-f*.

Das Thioredoxin III ist in der Lage die Ribonucleotidreduktase, die NADP- Malatdehydrogenase und die Fructose-1,6-bisphosphatase schwach zu stimulieren und ist wahrscheinlich mitochondrialer Natur.

Durch Untersuchungen an einer nichtgrünen, heterotroph wachsenden Mutante dieser Alge (Stamm C2A'), die im Dunklen keine intakten Chloroplasten ausbildet (Senger und Bishop, 1972), wurde festgestellt, dass die Thioredoxine I, II, und III auch in der nichtgrünen Mutante präsent sind. Das 28 kDa-Trx *f* wurde jedoch erst parallel zur Ergrünung dieser Mutante in Licht gebildet (Langlotz *et al.*, 1985; Langlotz *et al.*, 1986), was darauf hindeutet, dass es ein chloroplastidäres Thioredoxin ist.

Ein vergleichbares, außergewöhnlich großes Thioredoxin mit einer Molmasse von 26 kDa konnte bisher außer in *S. obliquus* nur in dem Cyanobakterium *Anabena sp.* 7119 nachgewiesen werden. Das Protein zeigte eine Stimulation der Spinat-FbPase und wurde als Trx-*f* beschrieben (Whittaker und Gleason, 1984).

Außer den Thioredoxinen von *Scenedesmus* ist das Thioredoxin-Muster auch in anderen Grünalgen, wie *Chlamydomonas reinhardtii*, *Acetabularia mediterranea* und *Chlorella* untersucht worden. *Chlamydomonas reinhardtii* enthält drei oder vier verschiedene Proteine mit Thioredoxinaktivität, die jedoch von den Autoren mehrfach umbenannt wurden und mit den in *Scenedesmus* nicht ohne weiteres verglichen werden können (Huppe *et al.*, 1990; Decottignies *et al.*, 1990; Decottignies *et al.*, 1991; Stein *et al.*, 1995). Ein großes, mit dem 28 kDa *Scenedesmus*-Thioredoxin *f* vergleichbares Protein wurde nicht gefunden, seine Existenz kann allerdings nach den verwendeten Aufreinigungsmethoden auch nicht ausgeschlossen werden. Aus *Acetabularia mediterranea* sind ein Trx-*f*, zwei Trx-*m* aus Chloroplasten und ein nicht chloroplastidäres Trx-*h* isoliert worden, alle Trx haben reguläre Molmassen von 12,9 bis 13,8 kDa (Van Langendonck und Vanden Driessche, 1992). In *Chlorella* ist die Erforschung der Thioredoxine nur ansatzweise geschehen. So wurde gezeigt, daß der hitzestabile Extrakt aus *Chlorella pyrenoidosa* in der Lage ist die Glutaminsynthetase aus der selben Alge zu aktivieren (Schmidt, 1981). Ein isoliertes Thioredoxin (CP-I) beschrieben von Tsang, (1981) mit einer Molmasse von 14 kDa zeigte eine Reaktion mit NADPH-Thioredoxinreduktase und in Anwesenheit von Dithiotreit (DTT) mit PAPS-Reduktase.

1.5 Oxygen evolving enhancer Protein 1 (OEE Protein 1)

Die vorliegende Arbeit hat zu dem Ergebnis geführt, dass das 28 kDa-Trx *f* aus *Scenedesmus obliquus* in Wirklichkeit mit dem *oxygen evolving enhancer* Protein 1 identisch ist. Aus diesem Grund ist es notwendig, hier detailliert auf die Eigenschaften und Funktion dieses Proteins einzugehen.

Das extrinsische *oxygen evolving enhancer* (OEE) Protein 1 ist ein Produkt des *psbO*-Gens der höheren Pflanzen. Zusammen mit zwei anderen extrinsischen Proteinen *psbP* (Untereinheit mit 23 kDa) und *psbQ* (16 kDa-Untereinheit) bilden diese drei Proteine den lumenal exponierten Sauerstoff-entwickelnden Komplex (OEC), welcher eng mit dem Mangan-Cluster des PSII (Abb. 1.5) assoziiert ist (Andersson und Åkerlund, 1987; Ghanotakis und Yocum, 1985; Murata und Miyao, 1985). Das OEE Protein 1 wird häufig auch als OEC 33, oder 33 kDa manganstabilisierendes Protein (MSP) bezeichnet. Es wird im Kerngenom kodiert und hat vor der Prozessierung im Chloroplasten eine Größe von 292-331 Aminosäuren. Obwohl es nach dem Verhalten auf SDS-PAGE als ein „33 kDa-Protein“ beschrieben wird, ist die berechnete Molmasse 26,5 kDa (Nixon *et al.*, 1992).

Aminosäuresequenzen für OEE-Proteine sind aus Spinat (Oh-Oka, 1986; Yamamoto, 1986), den Grünalgen *Chlamydomonas reinhardtii* (Mayfield, *et al.*, 1989) und *Volvox carteri* (Meissner *et al.*, 1999) sowie Cyanobakterien *Synechococcus sp.* PCC 7942 beschrieben worden (Kuwabara, 1987). Das Protein ist überall hoch konserviert, z.B. zwischen Spinat und Erbse zu 87%. Das wird auch durch Kreuzexperimente bestätigt, in denen man das Protein aus Cyanobakterien, Rotalgen und höheren Pflanzen und den entsprechenden PSII-Partikeln miteinander unter Erhalt der O₂-Entwicklung kombiniert hat (Enami *et al.*, 2000). Es enthält nach dem Abspalten der Leadersequenz, die den Proteintransport zum Chloroplasten leitet, 241 bis 247 Aminosäurereste. Im Spinat ist dann die N-terminale Aminosäure das Glu85.

Diesem Protein wird eine wichtige Rolle in der Erhaltung der optimalen Umgebung um den Mangan-Cluster des Photosystems II zugeschrieben. Verschiedene Studien zeigen, dass es den Mn-Cluster stabilisiert, aber es gibt keine Beweise, dass es die Mn-Ionen direkt bindet. EXAFS-Messungen, die Informationen über die Umgebung der Metallatome in Proteinen liefern, haben gezeigt, dass die Organisation des Mangan-Clusters durch das Herauslösen der äußeren 33 kDa-Untereinheit unberührt

bleibt. Auch eine Deletion des *psbO*-Gens in *Synechocystis* PCC 6803 hat die O₂-Entwicklung und den photoautotrophen Wachstum dieses Organismus nicht verhindert (Burnap und Sherman, 1991; Mayes *et al.*, 1991; Philbrick *et al.*, 1991). Außerdem konnte die Funktion des 33 kDa-Proteins durch das nur bei Cyanobakterien und Rotalgen gefundene Cytochrom c550 (Shen *et al.*, 1995) ersetzt werden.

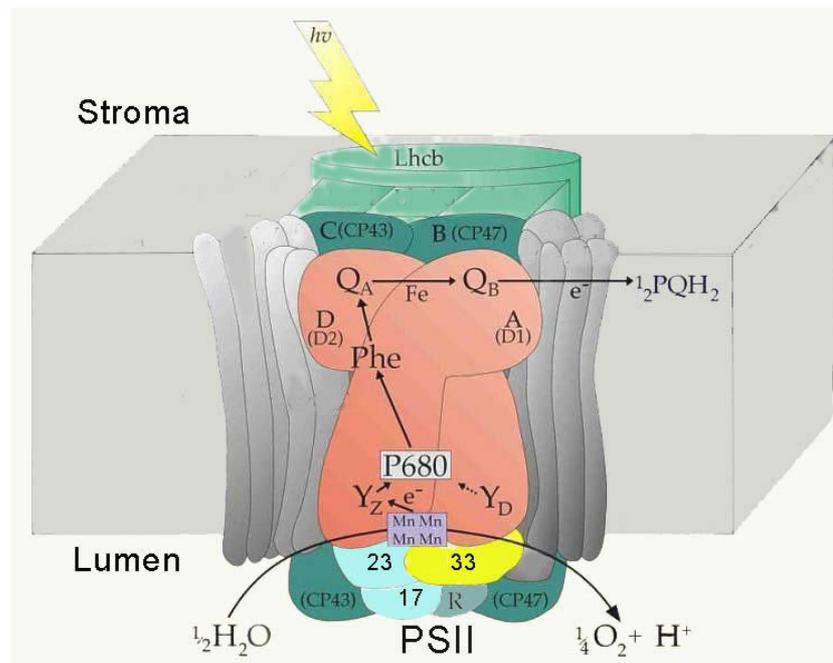


Abb. 1.5: Einordnung des 33 kDa-Proteins im Photosystem II (gelb dargestellt). Nach J. Nield (1997), vereinfacht dargestellt.

In anderen Experimenten an höheren Pflanzen hat das Herauslösen des 33 kDa-Proteins sowie der zwei anderen extrinsischen 23-kDa und 16-kDa Proteinen aus den PSII-Partikeln durch Behandlung mit 1M CaCl₂ (Ono und Inou, 1984) oder 2,6 M Harnstoff und 200 mM NaCl (Miao und Murata, 1984) ohne signifikanten Verlust an Mangan zu einer bis zu 40 % niedrigeren O₂-Entwicklung und einer extremen Empfindlichkeit gegen Licht, Temperaturerhöhung, und endogenen Reduktionsmitteln geführt. Eine Rekombinierung der PSII-Partikeln mit dem 33 kDa-Protein normalisierte die Stabilität des Mangan-Komplexes und die O₂-Entwicklung. Dieses unterstützt die Meinung, dass die 33 kDa-Untereinheit und seine Ca²⁺-Bindung die Funktion hat, den Mangan-Cluster zu optimieren, ohne direkt bei der Wasserspaltung mit beteiligt zu sein.

Die Lokalisation des *OEE*-Proteins im Photosystem II ist durch die erst seit einem Jahr vollendete Röntgenstrukturanalyse des PS II aus dem Cyanobakterium *Synechococcus elongatum* mit 3,8 Å Auflösung sichergestellt worden (Zouni *et al.*, 2001). Es liegt auf der luminalen Membranoberfläche unterhalb des Mangan-Clusters und der transmembranständigen Proteine D1 und D2 des Reaktionszentrums sowie der Antennenproteine CP43 und CP47 (Abb. 1.6). Die Strukturaufklärung hat viele Crosslinking-Experimente zur Position von *OEE* im wesentlichen bestätigt (Bricker *et al.*, 1988; Enami *et al.*, 1991; Enami *et al.*, 1992; Odom und Bricker, 1992; Gleitner *et al.*, 1994; Putnam-Evans *et al.*, 1996; Seidler, 1996). Die Kräfte, durch die das Protein mit anderen Untereinheiten des PSII assoziiert wird, sind nur elektrostatischer Natur, was dadurch bewiesen wird, dass das 33 kDa-Protein durch CaCl_2 oder Butanol-Behandlung aus dem PSII herausgelöst werden kann.

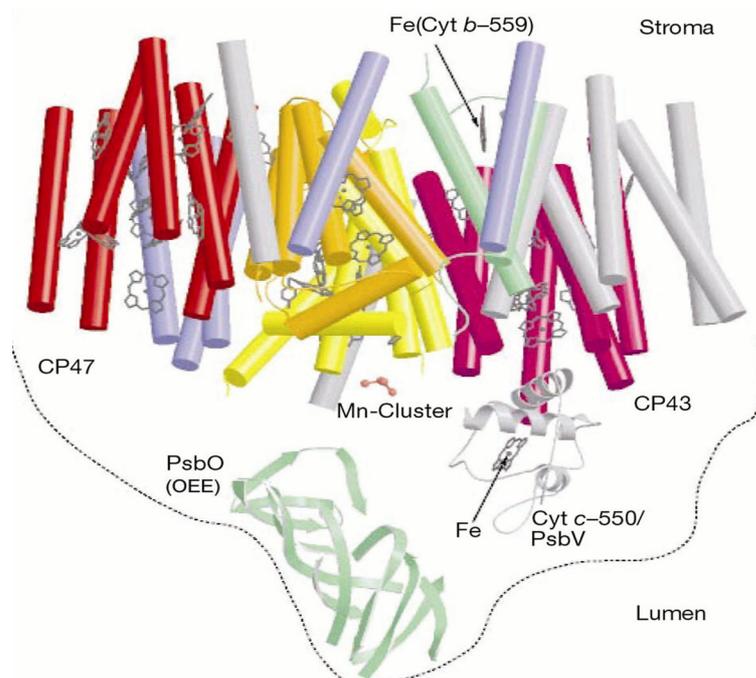


Abb. 1.6 Seitenaufsicht auf das PS II laut der röntgen-kristallographischen Daten (aus Zouni *et al.*, 2001). Das 33 kDa *OEE*-Protein ist grün bezeichnet und liegt luminal exponiert unterhalb des Mn-Clusters, die Proteine D1 und D2 sind gelb dargestellt.

Die 33 kDa-Untereinheit enthält zwei Cysteinreste (Cys28 und Cys51 im Spinat) die eine Disulfidbrücke bilden, die für die Funktion des 33 kDa-Polypeptids im sauerstoffentwickelnden Komplex wichtig ist (Tanaka und Wada, 1988). In Experimenten mit herausgelöstem Protein durch CaCl_2 -Behandlung und anschließende Reduktion der Disulfidbrücke mit Mercaptoethanol konnte keine

Rekombination des herausgelösten Proteins mit den PSII-Partikeln und Sauerstoffentwicklung erreicht werden. Dies wurde erst nach einer Reoxidation der Sulfhydrylgruppen zur Disulfidbrücke durch Rühren an der Luft möglich. Untersuchungen durch Circular dichroismus-Spektroskopie zeigten, dass die Konformation der oxidierten und reduzierten Proteinspezies sich nicht nur in der Region der Disulfidbrücke unterscheidet, sondern in allen Regionen des Proteins, was den Redoxzustand für die Erhaltung der Funktion so wichtig macht. Diesen Ergebnissen widersprechen jedoch Betts *et al.* (1996). Bei einem Austausch der beiden Cysteine durch Alanin im Spinatprotein konnte kein funktioneller Unterschied zwischen dem mutierten und dem Wildtyp-Protein beobachtet werden.

Es liegt keine röntgenkristallografische 3D-Struktur dieses Proteins vor. Dafür zeigen zahlreiche CD-Messungen (Xu *et al.*, 1994), dass die Aminosäuren zu 38% in β -Faltblatt, zu 9% in α -Helices und zu 17% in Schleifen organisiert sind, die restlichen 35% der Aminosäuren sind ungeordnet (*random coil*). Anhand dieser Daten wurde ein Modell postuliert, in dem das 33 kDa-Protein elf β -Faltblatt und zwei α -Helix-Domänen enthält. Die Verteilung der vorausgesagten Sekundärstruktur-Elemente in diesem Protein ist symmetrisch (Abb. 1.7).

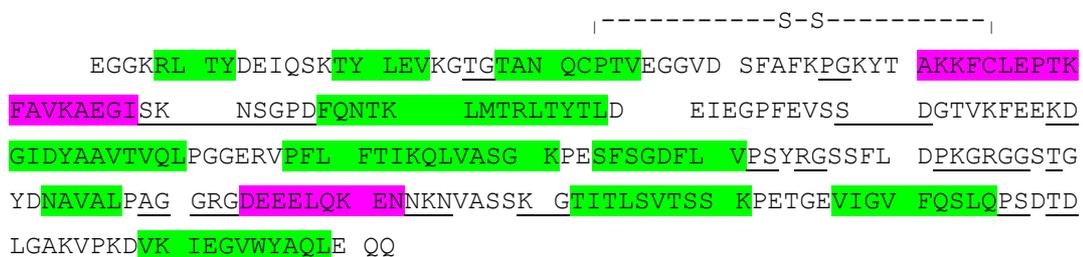


Abb.1.7: Anordnung der Aminosäuren in Sekundärstrukturen im Spinat-33-kDa Protein (nach Xu *et al.*, 1994), XXX β -Faltblatt, XXX α -Helix, XXX-Schleifen.

Die β -Faltblatt-Domänen des Proteins sind verhältnismäßig reich an hydrophoben Aminosäureresten. Dieses würde mit einer Tertiärstruktur übereinstimmen, in der die β -Faltblattregionen den hydrophoben Kern des Proteins bilden würden, während die ungeordneten Bereiche sowie Schleifen und α -Helix-Domänen an der Oberfläche des Proteins liegen. Das wird auch von Bricker und Frankel (1998) bestätigt, die voraussagen, dass der relativ hydrophobe Kern aus antiparallelen β -Faltblatt

Domänen ausgebildet wird. Ein hypothetisches Modell der Faltung der Sekundärstrukturen des 33 kDa-Proteins zeigt Abb. 1.8.

Einige Autoren (Hutchison *et al.*, 1998; Enami *et al.*, 1998) meinen dass dieses Protein beim Andocken an das PSII Konformationsänderungen erfährt, insbesondere in der hydrophoben β -Faltblatt Region. So muss eine Zunahme des β -Faltblattanteils, was intramolekular oder auch möglicherweise intermolekular geschieht, sowohl eine Abnahme der ungeordneten Bereichen erfolgen, wodurch das Proteinmolekül kompakter wird. Dafür sprechen Ergebnisse der Vernetzung einiger Lys- mit Glu-Resten innerhalb des Proteinmoleküls mit Carbodiimid. Die Vernetzung konnte eine Rekombination mit dem PSII nicht verhindern, die O_2 -Entwicklung konnte dagegen nicht wiederhergestellt werden. Die Starrheit des intramolekular vernetzten Proteinmoleküls verhindert scheinbar die Konformationsänderung des Proteins nach der Anlagerung an das PSII-Partikel.

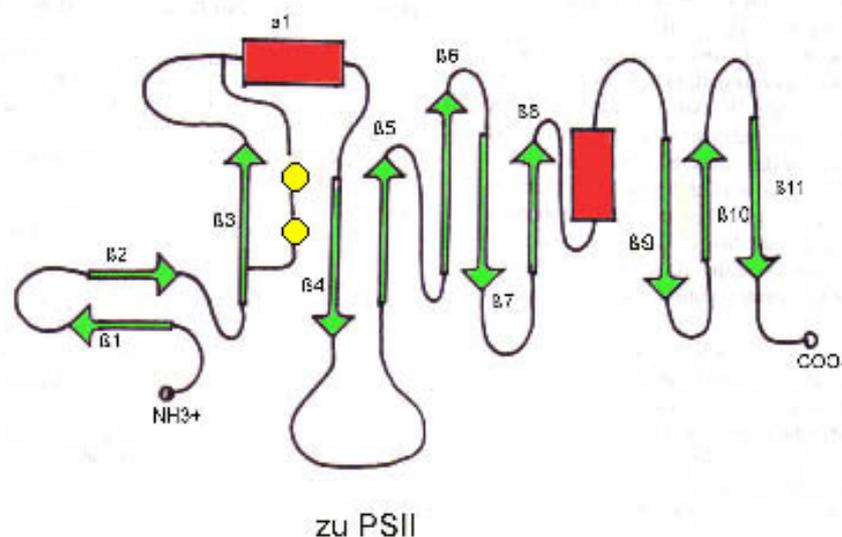


Abb. 1.8: Model der Faltung der Sekundärstrukturen des Spinat-33-kDa Proteins (Bricker und Frankel, 1998), ■ β -Faltblatt, ■ α -Helix, ○ - S-Atome.

Bei hydrodynamischen Studien und Bestimmung der Sedimentationskonstante dieses Proteins (2,26 S) (Zubrzycki *et al.*, 1998) wurde eine Asymmetrie des Proteinmoleküls in Lösung festgestellt. So müsse es eine ellipsoide Form mit einem Seitenverhältnis von 4,2 (12,6 nm x 3,0 nm) haben. Ein Grund dafür, und auch für das anomale Verhalten dieses Proteins bei der SDS-PAGE und Molekularsiebchromatographie, könnte der hohe Anteil an ungeordneten

Aminosäuren sein (Betts *et al.*, 1998). Es verhält sich nämlich wie ein 33 kDa-Protein und nicht wie ein globuläres mit einer errechneten Molmasse von 26,5 kDa.

Untersuchungen zur Hitzebeständigkeit des Proteins (Lydakis-Simantiris *et al.*, 1999) zeigten, dass ein Erhitzen der Proteinproben auf 90 °C und anschließendes Abkühlen auf 25 °C des zuvor aus den PSII-Partikeln herausgelösten 33 kDa-Protein eine Rekombination mit den PSII-Partikeln und Reaktivierung der O₂-Entwicklung nicht verhinderte. Die Autoren haben auch Unterschiede zwischen den Eigenschaften des nativen, aus PSII-Partikeln herausgelöstem Protein und rekombinant hergestelltem Protein festgestellt. So wurde beobachtet, dass das erhitze native Protein im stöchiometrischen Verhältnis 1:1 mit den PSII-Partikeln assoziierte, wie auch das nicht erhitze native Protein. Das rekombinante, erhitze Protein dagegen assoziierte mit PSII-Partikeln im Verhältnis 2:1, und erst bei diesem Verhältnis konnte die O₂-Entwicklung wiederhergestellt werden, wobei jedoch der ursprüngliche Wert nicht vollständig erreicht werden konnte. Dieses Verhalten, sowie Daten der FTIR-Messungen deuten auf eine mögliche Aggregatbildung der Proteinmoleküle mit einander bei dem Erhitzen. CD- und FTIR-Messungen zeigten, dass Erwärmen eine Abnahme des Aminosäureanteils in Sekundärstrukturen hervorruft, und dieses geschieht in einem breiten Temperaturbereich über 35° C. Die Umfaltung des Proteinmoleküls, die als Folge der Änderung der Sekundärstrukturen auftritt ist in diesem Fall kein kooperativer Prozess, der normalerweise bei kompakten, hoch organisierten Proteinmolekülen beobachtet wird.

Diese Hitzestabilität des 33 kDa Proteins spricht für eine Flexibilität der Sekundärstrukturen (und folglich auch der Tertiärstruktur). Die Eigenschaften des Proteins, wie Hitzestabilität, ein saurer isoelektrischer Punkt von 5.2, anomales Verhalten auf SDS-PAGE und Molekularsiebchromatographie wegen der länglichen Form des Moleküls, ein hoher Prozentsatz der ungeordneten Sequenzbereiche und Schleifen in der Sekundärstruktur machen es sehr ähnlich mit anderen als „*natively unfolded*“ bezeichneten Proteinen. Das hat die Autoren (Lydakis-Simantiris *et al.*, 1999) veranlasst, das 33 kDa-Protein auch als „*natively unfolded*“ zu bezeichnen. Diese Proteine benötigen die Flexibilität ihrer Konformation für das Assembling in hochorganisierte Strukturen, von denen sie Bestandteile sind. So zeigen z.B. einige Proteine, wie Caldesmon, NACP („*non-Aβ component of Alzheimer's disease amyloid plaque*“, Weinreb *et al.*, 1996) usw. ähnliche Eigenschaften.

Einige Eigenschaften des 33 kDa Proteins, wie Hitzestabilität und der saure isoelektrische Punkt von 5,2 machen dieses Protein offensichtlich auch den Thioredoxinen sehr ähnlich.

Während zunächst vermutet wurde, dass das 33 kDa nicht mit den Untereinheiten des Reaktionszentrums selbst assoziiert ist, wird ihm in der letzten Jahren verstärkt eine schützende Funktion für D1-Protein im Reaktionszentrum gegen Licht- und Hitzeschädigung zugeschrieben (Yamamoto, 2001). So soll die ausgedehnte, abgeflachte Struktur des 33 kDa Proteins die relativ große Fläche der lumenal exponierten Seite des D1 Proteins abschirmen und es gegen Sauerstoffradikale, die während der Wasserspaltung entstehen, schützen. Außerdem beobachteten Ettinger und Theg (1991) in Spinat im Thylakoidlumen große Pools an frei vorliegenden *OEE*-Untereinheiten. Aufgrund dieser Tatsachen wird vermutet, dass das 33 kDa *OEE*-Protein mit lichtgeschädigtem D1-Protein, das einem *turnover* unterliegt, auch nach dem Verlassen des PS II assoziiert bleibt. Es spielt möglicherweise die Rolle eines Chaperons und verhindert die unspezifische Aggregation des geschädigten D1 mit dem PS II bis es durch Proteasen abgebaut wird. Ob dieser Abbau im Thylakoidlumen stattfindet ist unklar, da bis jetzt kein Hinweis für lumenale Proteasen gefunden wurde. Dafür gibt es mehrere Hinweise für den Abbau des D1 durch stromale und stromaseitig membranassoziierte Proteasen (Ishikawa *et al.*, 1999; Ferjani *et al.*, 2001; Haussuhl *et al.*, 2001).

Von den zwei anderen extrinsischen Proteinen, die eng mit dem 33 kDa-Protein assoziiert sind ist bekannt, daß die 23 kDa Untereinheit unter Mangelbedingungen an Ca^{2+} (75, 166) und Cl^- -Ionen dem PSII erlaubt Sauerstoff zu entwickeln (Miyao und Murata, 1984a; Miyao und Murata, 1984b). Es wird vermutet, daß die 23 kDa-Untereinheit die Rolle eines Konzentrators dieser Ionen spielt (Murata und Miyao, 1985). Dem 16 kDa-Polypeptid wird eine Hilfsfunktion zugeschrieben, die Sauerstoffentwicklung unter stark begrenzten Cl^- -Konzentrationen (< 3mM) zu unterstützen (Akabori *et al.*, 1984). Diese Proteine enthalten ebenfalls ein Transitpeptid, das nach dem Transport in das Thylakoidlumen abgespalten wird.

1.6 Zielsetzung dieser Arbeit

Die Kenntnis der vielen verschiedenen Thioredoxine und thioredoxin-ähnlicher Proteine in Pflanzen und der von ihnen abhängigen oder modulierten Stoffwechselprozesse ist noch keineswegs komplett. Die pflanzenbiochemische Arbeitsgruppe von Follmann und Mitarbeitern an der Universität Kassel analysiert seit Jahren die in Pflanzenzellen tatsächlich exprimierten Thioredoxin-Profile (offenbar sehr verschieden von der Gesamtheit der Trx-Gene; Starke, 2001) und betreibt zugleich eine systematische Suche nach neuen thioredoxin-regulierten Enzymsystemen. Neue und überraschende Ergebnisse betreffen die Thioredoxin-Wirkung auf die Hydrogenase von *S. obliquus* (in Zusammenarbeit mit der Pflanzenphysiologie der Universität Marburg) sowie Alkoholdehydrogenase der Hefe (T. Brodegger, in Zusammenarbeit mit der genetischen Arbeitsgruppe der Universität Kassel). Derartige physiologisch relevante und mechanistisch interessante Fälle können durch die anderswo betriebene, ausschließlich auf Gensequenzen gerichtete Thioredoxinforschung (Y. Meyer u.a., Universität Grenoble) nicht aufgedeckt werden. In diesem Zusammenhang war die Charakterisierung des an sich schon früher beschriebenen „großen“ Thioredoxin *f* aus *S. obliquus*, das auch ein cyanobakterielles Gegenstück zu haben scheint (Whittaker und Gleason, 1984) und Algen-Hydrogenase mit hoher Aktivität inhibiert (Wünschiers *et al.*, 1999), mit heutigen präparativen und analytischen Methoden überfällig. Da Grünalgen-Genome noch nicht sequenziert sind, war ein biochemischer Ansatz nicht nur selbstverständlich, sondern der einzig gangbare Weg. Ein Nachteil ist allerdings, dass Grünalgen-Chloroplasten aus den Zellen i.a. nicht als Organellen-Fraktion zu isolieren sind.

Folgende Aufgaben wurden als Ziel dieser Arbeit gesetzt:

- Das 28 kDa-Thioredoxin *f* aus *Scenedesmus obliquus* sollte mit Hilfe moderner hochauflösender Reinigungsmethoden, die früher nicht zur Verfügung standen, in ausreichender Menge und Reinheit präpariert werden, um seine Aminosäuresequenz feststellen zu können.
- Andere Vertreter der *Chlorophyta* waren mit gleichen Methoden zu untersuchen, mit dem Ziel, ähnliche Proteine mit Thioredoxin-Aktivität und außergewöhnlichen Molmassen zu finden und diese charakterisieren.

- Obgleich schon eine ganze Reihe von Enzym-Interaktionen mit dem großen Thioredoxin-*f* beschrieben sind, werden aus einer Sequenzanalyse Verwandtschaftsbeziehungen zu anderen Thioredoxinen bzw. anderen Proteinen und Rückschlüsse auf weitere, unbekannte Funktionen erhofft.

2. Experimenteller Teil

2.1 Materialien, Reagenzien, Geräte und allgemeine Methoden

Chemikalien und Reagenzien wurden, soweit nicht anders vermerkt, von den Firmen Biomol, Calbiochem, Boehringer bzw. Roche, Merck, Riedel de Haen, Roth, Serva und Sigma bezogen und entsprachen den Reinheitsgraden "p.A." oder "für biochemische Zwecke". Als Referenz-Thioredoxin diente das rekombinante *E.coli*-Thioredoxin der Firma IMCO Corporation Ltd. AB, Schweden. OEE-Protein aus Spinat wurde freundlicherweise von Dr. A. Seidler, Universität Bochum, zur Verfügung gestellt.

Für die säulenchromatographische Trennungen wurden folgende Materialien verwendet: DEAE-Cellulose 52 (Whatman), Superdex-HiLoad-75 (Pharmacia), Resource-Q, Mono-Q, Mono-S (Pharmacia), Uno-Q-6 (Bio-Rad). Zur Flüssigkeitschromatographie wurde ein FPLC-System von Pharmacia mit 2 P-500-Pumpen, 2 photometrischen Einheiten (Control Unit, Optical Unit), einem Liquid Chromatography Controller LCC-500 Plus, einer Gradientensteuerung GP-250 und einem Fraktionssammler Frac 100, sowie ein FPLC-System „Biologic“ der Firma Bio-Rad eingesetzt. Einige Chromatographie-Einheiten wurde aus einer LKB-Peristaltikpumpe, einem Uvicord S II-Durchflußphotometer, RediFrac-Fraktions-sammler und einem GM-1-Gradientenmischer von Pharmacia aufgebaut.

Zentrifugationen wurden mit Kühlzentrifugen Super T21 und RC5C von Sorvall Instruments mit den Festwinkelrotoren GS3, GSA und SS 34 durchgeführt. Für kleinere Volumina bis 1 ml stand eine Hettich-Tischzentrifuge zur Verfügung. Zum Ernten der Algen wurde eine Beckman-Zentrifuge mit dem Ausschwingrotor GH-3.7 verwendet.

Proteinlösungen konnten entweder mit einer YM 5-Membran von Amicon mit einem Ausschlußvolumen von 5 kDa in Rührzellen der gleichen Firma ankonzentriert

werden oder in einem Dialyseschlauch unter Verwendung von Aquacide II der Firma Calbiochem.

Zum Sterilfiltrieren von Puffer- und Proteinlösungen wurden Sterilfilter GVWP bzw. GV (0,22 µm) von Millipore verwendet.

Für mikroskopische Untersuchungen stand ein Leitz Biomed-Mikroskop zur Verfügung.

Gelelektrophoretische Arbeiten erfolgten in einer Minigelapparatur (8x6 cm) "Miniprotean II" von BioRad.

Blotten der Proteine aus SDS-PAGE-Gelen auf Membranen für die Sequenzierung und für Immunoblots erfolgte mit einer Multiphor-Apparatur (Pharmacia). Es wurden Immobilon PVDF und P^{SQ} Membranen von Millipore verwendet.

Die Nährmedien und alle für die Kultivierung der Algen verwendeten Glasgefäße wurden für 25 min bei 120°C und einem Dampfdruck von 1,5 bar mit Hilfe eines Laborautoklaven (Wolf Sanoklav) sterilisiert. Überimpfen der Algenkulturen erfolgte unter einer Sterilbank der Firma M.D.H. Intermed.

Für photometrische Messungen wurden Geräte der Firma Kontron (Uvikon 860 und 930) eingesetzt.

Alle präparativen Arbeiten wurden, soweit nicht anders angegeben, bei 0-4°C durchgeführt, die Kühlzentrifugen wurden bei 4°C betrieben. Die pH-Werte der Puffer- und Proteinlösungen sowie die der Nährmedien wurden bei der jeweiligen Arbeitstemperatur eingestellt.

Proteinbestimmung:

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte nach der Methode von Bradford (1976) unter Verwendung des Farbstoffkonzentrates von BioRad. Zu 0,8 ml der Proteinprobe in 50 mM Tris/HCl-Puffer, pH 7,0, werden 0,2 ml BioRad-Reagenz gegeben und sorgfältig durchmischt. Die Extinktion wird nach 10 min bei 595 nm gemessen. Die ermittelten Proteinkonzentrationen ergeben sich als Mittelwerte einer Dreifachbestimmung aus der nachfolgenden Eichkurve (Abb. 2.1).

Zur Erstellung der Eichkurve dienen Rinderserumalbumin- (BSA) Lösungen mit Konzentrationen von 1-30 µg/ml. Bei hochgereinigten Thioredoxin-Fraktionen wurde die Extinktionsdifferenz E₂₈₀-E₃₁₀ als Maß verwendet:

$$E_{280}-E_{310} = 1 \Rightarrow \text{entspricht } 1 \text{ mg/ml Protein.}$$

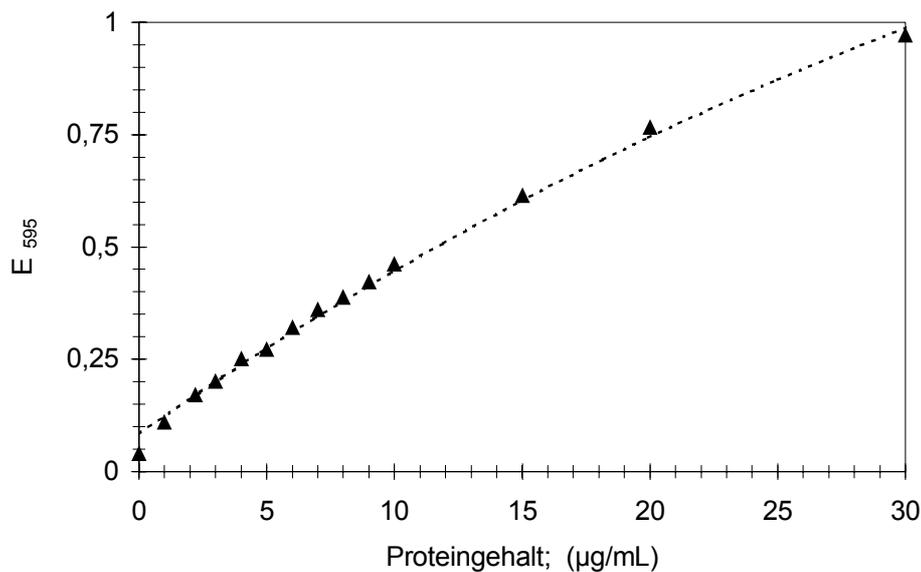


Abb. 2.1: Eichkurve zur Proteinbestimmung nach Bradford (1976)

$$\mu\text{g/ml} = 11,247(E)^3 - 5,4719(E)^2 + 26,692(E) - 2,0284$$

Bestimmung des Chlorophyllgehaltes:

In einigen Fällen ist die Bestimmung des Chlorophyllgehaltes in Lösungen notwendig. Sie erfolgt nach Arnon (1949). 50 µl der Suspension werden zu 1 ml 80% Acetonlösung in Wasser gegeben, gemischt und 10 min im Dunklen stehen gelassen. Nach 3 min Zentrifugation in der Tischzentrifuge wird die Extinktion des Überstandes nacheinander bei 645 und 663 nm bestimmt. Der Chlorophyllgehalt errechnet sich nach folgender Formel:

$$\text{Chlorophyll (mg/ml)} = (20,2 \cdot E_{645} + 8,02 \cdot E_{663}) \cdot F$$

$$F = \text{Gesamtvolumen}(\mu\text{l}) / (1000 \cdot \text{Probevolumen}(\mu\text{l}))$$

2.2 Algenkulturen

Als Untersuchungsobjekte dieser Arbeit dienten einzellige Grünalgen *Scenedesmus obliquus*, Wildtyp, Stamm D3, aus der Sammlung von Prof. Dr. H. Senger, Fachbereich Biologie, Marburg, *Chlorella vulgaris* Stamm 30.80 und *Chlamydomonas reinhardtii* Stamm 33.89 aus der Algensammlung der Universität

Göttingen. Über die taxonomische Einordnung, Lebensräume und Lebensbedingungen dieser Algen wurde bereits im Kapitel 1.3 gesprochen.

Da der Thioredoxingehalt der Algen vom Zellzyklus unabhängig ist, konnten die Zellen in batch-Kulturen unter Dauerlicht gezogen werden. Die Anzucht erfolgte in einem Lichtthermostat der Firma F. Kniese (Abb. 2.2). Die Anzucht der Algen wurde unter sterilen Bedingungen durchgeführt (alle Gefäße und Nährmedium werden vorher sterilisiert). Die Algen wachsen optimal bei 28°C in 1 Liter-Röhren, gefüllt mit anorganischem Nährmedium (Tabelle 2.1) unter Begasung mit an CO₂ angereicherter Luft (3 % CO₂) im Dauerlicht von 12000 Lux. Unter diesen Bedingungen leben die Algen unabhängig voneinander bis die Nährstoffe verbraucht sind oder die Lichtversorgung durch die steigende Zellzahl begrenzt wird.



Abb. 2.2: Algenkultur in dem Lichtthermostat der Firma F. Kniese

5 Tage nach dem Animpfen der Röhre mit je 10 ml einer dunkelgrünen Algensuspension wurden die Algen geerntet. Die Behälter mit Algen wurden über Nacht in den Kühlraum gestellt, am nächsten Morgen dekantiert man das Medium von den abgesetzten Algen. Die Algen wurden mit dem restlichen Nährmedium in Zentrifugenbecher überführt und in der Beckman-Zentrifuge mit Schwingrotor 15 min bei 2500 rpm zentrifugiert. Danach wurden die Algenzellen in ca. 150 ml Aufschlußpuffer (50 mM Tris/HCl, 5 mM Mercaptoethanol, pH 7,85) resuspendiert und noch einmal zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen, die Algen können portioniert und eingefroren werden, oder sie werden gleich aufgeschlossen. Pro 1 Liter Nährmedium erhält man auf diese Weise bis zu 8,5 g Algen (Feuchtgewicht)

Tabelle 2.1: Nährmedium für *Scenedesmus obliquus* (nach Bishop *et al.*, 1971)

	Konzentration Stammlösung	Konzentration im Medium
Stammlösung I		
CaCl ₂ * 2H ₂ O	1,5 g/l	1 * 10 ⁻⁴ M
KNO ₃	80,9 g/l	8 * 10 ⁻³ M
MgSO ₄ * 7 H ₂ O	24,6 g/l	1 * 10 ⁻³ M
NaCl	47,0 g/l	8 * 10 ⁻³ M
Stammlösung II		
Na ₂ HPO ₄ * 2H ₂ O	17,8 g/l	1 * 10 ⁻³ M
NaH ₂ PO ₄ * H ₂ O	40,5 g/l	3 * 10 ⁻³ M
Fe ₂ (SO ₄) ₃ * H ₂ O	0,4 g/l	7,5 * 10 ⁻⁶ M
Na-Citrat * 2H ₂ O	16,5 g/l	5,5 * 10 ⁻⁴ M
Spurenelemente		
H ₃ BO ₃	2,86 g/l	4,5 * 10 ⁻⁵ M
MnCl ₂ * 4H ₂ O	1,81 g/l	8 * 10 ⁻⁶ M
ZnSO ₄ * 7H ₂ O	0,222 g/l	7 * 10 ⁻⁷ M
CuSO ₄ * 5H ₂ O	0,079 g/l	3 * 10 ⁻⁷ M
Na ₂ MoO ₄ * 2H ₂ O	0,0242 g/l	1 * 10 ⁻⁷ M

Die Stammlösungen und Spurenelementlösung werden mit *Aqua bidest* angesetzt, autoklaviert und im Kühlschrank aufbewahrt. Für das Nährmedium werden je 10 ml der Stammlösungen I und II und 1 ml der Spurenelementlösung auf einen Liter mit demineralisiertem Wasser verdünnt. Das Nährmedium wird unmittelbar nach dem Ansetzen autoklaviert.

Die Anzucht von *Chlorella vulgaris* erfolgte in gleichem Nährmedium. Für *Chlamydomonas reinhardtii* –Kulturen wurde zusätzlich zu einem Liter Medium 20 ml

Bodenextrakt (hergestellt nach Anleitung der Sammlung von Algenkulturen der Universität Göttingen) hinzugefügt. Weil das Nährmedium sich nach 5 Tagen Anzucht durch Ausscheidungsprodukte der Algen ansäuerte (pH 5,5) ist es nicht gelungen, mehr als 5,3 g Feuchtmasse/Liter Medium an *Chlamydomonas* zu ernten.

2.3 Reinigung der Thioredoxine

Einige der im folgenden beschriebenen Trennungsmethoden wurden hauptsächlich für die Aufreinigung der Thioredoxine aus *Scenedesmus obliquus* verwendet, z. B. Trennung auf DEAE-Cellulose, Resource-Q, Mono-S. Die Aufschlussmethode und Fällungen, sowie andere Trennungsmethoden, wie Molekularsiebchromatographie auf Superdex-75, Ionenaustausch auf Uno-Q-6 wurden auch für Reinigung der Proteine aus *Chlorella vulgaris* und *Chlamydomonas reinhardtii* eingesetzt.

2.3.1 Aufschluss und Fällungsschritte

Der Aufschlußpuffer enthält 50 mM Tris/HCl, 5 mM Mercaptoethanol, pH 7,85. Zur Homogenisierung wurden frisch geerntete oder bei -70° C eingefrorene Algenzellen im Verhältnis 1:3 mit Aufschlußpuffer suspendiert und in einer Vibrogen-Zellmühle der Firma E. Bühler, Tübingen-Weilheim, mit Glaskugeln (\varnothing 0,7 mm) aufgeschlossen. Der Aufschluß dauert 4 x 5 min mit je 2 min Unterbrechung, das Aufschlußgefäß wird während des Vorgangs mit einer Mischung aus Eis und Wasser gekühlt. Um die Glaskugeln abzutrennen, saugt man das Rohhomogenat über eine Glasfritte ab und wäscht mindestens zweimal mit Aufschlußpuffer nach. Die Glaskugeln können mit Wasser gewaschen und wieder verwendet werden.

Das Rohhomogenat wird anschließend 20 min bei 20000 g zentrifugiert und der Überstand weiter verarbeitet. Das Sediment wird verworfen. Der grüne Rohextrakt wird durch Zutropfen einer 4 % Streptomycinsulfatlösung auf eine Konzentration von 0,8 % Streptomycinsulfat gebracht (je ml Rohextrakt 0,25 ml 4 % Lösung). Nach Beendigung des Zutropfens wird noch 15 min weitergerührt und dann abzentrifugiert (20 min, 20000 g). Durch diese Behandlung werden Nucleinsäuren und andere polyanionische Stoffe ausgefällt und abgetrennt.

Den nun klaren, gelblichen Überstand unterzieht man einer Säure-Fällung. Mit kalter 1 N Essigsäure wird rasch ein pH-Wert von 4,3 eingestellt. Dann folgt eine kurze

Zentrifugation (5 min, 20000 g) und anschließendes Neutralisieren des Überstandes mit kalter 1 N Ammoniaklösung bis zum pH-Wert 7-7,5.

Als nächster Schritt erfolgt eine fraktionierte Hitzedenaturierung der Proteine durch Erhitzen auf 60° C, 5 min Inkubation bei 60° C und nach dem Abkühlen 20 min Zentrifugation bei 20000 g. Da nicht alle Proteinflocken sedimentieren, muss der Überstand über Glaswolle filtriert werden.

Um das Volumen des Extraktes zu verringern, werden die Proteine durch Zugabe von festem Ammoniumsulfat bis zur Endkonzentration 90 %, (Zugabe 0,662 g pro ml Extrakt) vollständig ausgefällt. Der pH-Wert wird während des Fällungsvorganges mit konzentrierter Ammoniaklösung im Bereich von 7,5 gehalten.

Nach der Zugabe des Ammoniumsulfates wird 1 Stunde weitergerührt, danach bleibt die Lösung über Nacht in der Kälte stehen oder kann auch länger so aufbewahrt werden, bevor sie zentrifugiert wird (20 min, 20000 g).

Die mit Ammoniumsulfat gefällten Proteine können nach Wiederauflösung auf unterschiedliche Weise weiterverarbeitet werden. Wie von P. Langlotz (1986) vorgeschlagen, werden die Proteine zunächst auf einer Sephadex G-25-Säule entsalzt und die im Durchbruch eluierenden Proteine auf DEAE-52 Cellulose getrennt. Alternativ können die Proteine zuerst einer Molekularsiebchromatographie auf Superdex-75 unterzogen und danach die Fraktionen mit FbPase-Aktivität auf einem Anionenaustauscher weiter aufgereinigt werden.

2.3.2 Entsalzung von Proteinproben auf Sephadex G-25

Das abzentrifugierte rotbraune Sediment wird im kleinstmöglichen Volumen Ammoniumacetatpuffer (20 mM, 5 mM Mercaptoethanol, pH 8.6) aufgenommen. Geringe Mengen unlöslicher Bestandteile entfernt man durch erneute Zentrifugation (5 min, 30 000 g). Die Entsalzung der konzentrierten Proteinlösung erfolgt durch Chromatographie auf einer Sephadex G-25-Säule.

Säulenmaß: 5 x 25 cm

Puffer: 20 mM Ammoniumacetat, 5 mM Mercaptoethanol, pH 8,6

Flußrate: 40 ml/Stunde

Fraktionsgröße: 8 ml /12 min

Die Säule wird zunächst mit dem Puffer gespült (mind. 2 Säulenvolumina), bevor die Probe aufgetragen wird. Das Elutionsprofil wurde anhand des Durchflussphotometers registriert und die Fraktionen des Durchbruchs mit hohem Proteingehalt weiter verwendet. Zur Kontrolle des Salzgehaltes der nacheluirenden Fraktionen wurde ein Konduktometer 702 von Knick verwendet.

2.3.3 Chromatographie auf DEAE-Cellulose

Säulenmaß: 3 x 20cm (gefüllt mit 50 ml Material DEAE-52)
 Säulenpuffer: a) 20 mM Ammoniumacetat, 5 mM Mercaptoethanol, pH 8,6
 b) 250 mM Ammoniumacetat, 5 mM Mercaptoethanol, pH 8,6
 Flußrate: 30 ml/Stunde
 Fraktionsgröße: 8 ml /16 min
 Gradient: 20-250 mM Ammoniumacetat, 5 mM Mercaptoethanol, pH 8,6
 (jeweils 250 ml)

Entsalzte Proteinfractionen der Sephadex G-25-Säule werden auf die zuvor mit dem Puffer a) equilibrierte DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen. Es wird so lange mit dem Säulenpuffer gespült, bis ungebundenes Protein von der Säule gewaschen ist (1,5 bis 2 h). Gebundene Thio-redoxine eluiert man mit einem linearen Salzgradienten. Die Fraktionen mit Thio-redoxinaktivität werden getrennt nach Aktivitätspeaks, gepoolt und 12 h gegen gesättigte, neutralisierte Ammoniumsulfatlösung dialysiert. Die ausgefällten Proteinproben werden einer Molekularsiebchromatographie auf Superdex-75 unterzogen.

2.3.4 Gelfiltration auf FPLC-Superdex G-75

Säulenmaß: 1,6 x 60 cm
 Säulenpuffer: 25 mM Tris/HCl, 100 mM NaCl, 5 mM Mercaptoethanol, pH 7,8
 Flußrate: 1 ml/min
 Fraktionsgröße : 3 ml

Die mit Ammoniumsulfat ausgefällte Proteine werden im SS34-Rotor abzentrifugiert (20 min 20000 g). Das Pellet nimmt man im kleinstmöglichen Volumen (3-4 ml)

Säulenpuffer auf, der zusätzlich 10 mM DTT enthält. Nach 30 min Inkubation entfernt man geringe Mengen unlöslicher Bestandteile durch erneute Zentrifugation (5 min, 20000 g), danach wird die Probe über ein Sterilfilter auf die Superdex 75-Säule einer FPLC-Anlage aufgetragen. Die Kalibrierung der Säule ist aus Abb. 2.3 ersichtlich. Fraktionen, die zwischen 72 und 78 ml Elutionsvolumen von der Säule eluieren und der Molmasse von 25 bis 30 kDa entsprechen, enthalten das große (28 kDa) *Scenedesmus*-Trx *f*. Fraktionen von 80 bis 86 ml Elutionsvolumen enthalten Thioredoxine der üblichen Molmasse von 11-12 kDa. Diese Fraktionen werden separat weiter verarbeitet.

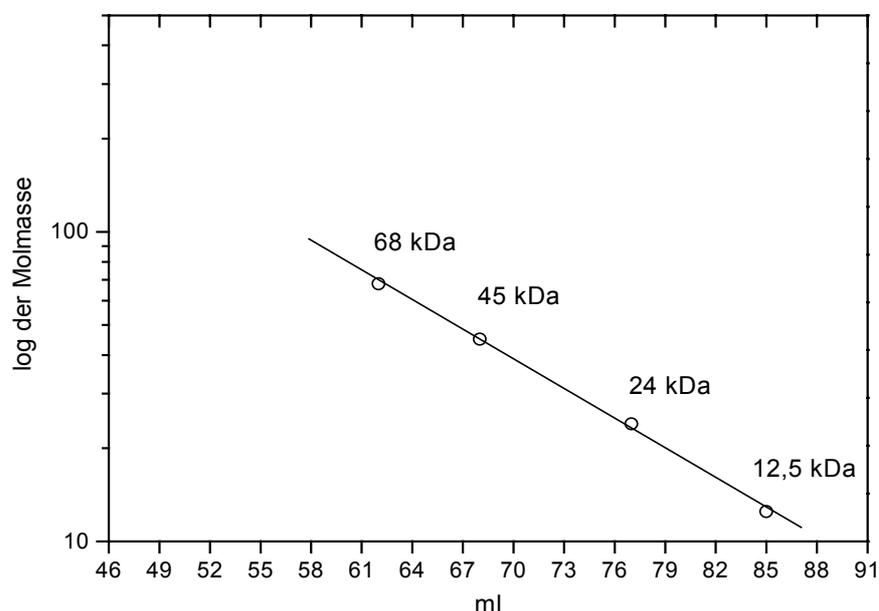


Abb. 2.3: Kalibrierung der Superdex G-75-Säule; logarithmische Auftragung der Molmassen; Eichproteine: BSA 68 kDa, Ovalbumin 45 kDa, Chymotrypsinogen A 24 kDa, Cytochrom C 12,5 kDa.

2.3.5 Ionenaustauschchromatographie auf Resource-Q

Fraktionen der Superdex G-75-Gelfiltration mit Thioredoxin-Aktivität können weiterhin durch Ionenaustauschchromatographie auf einer Resource-Q-Säule gereinigt werden. Hierfür werden die Fraktionen der entsprechenden Aktivitätspeaks gepoolt, über Nacht gegen ein 100-faches Volumen des Puffers a) dialysiert, danach kann die Probe über ein Sterilfilter auf die Säule aufgetragen werden. Nach dem

Probenauftrag wird die Säule mit ca. 5 ml Puffer gewaschen um die nicht gebundene Proteine von der Säule zu spülen. Dann lässt man den Gradienten ansteigen. Der Aktivitätspeak wird anschließend mit FbPase detektiert.

Säulenmaß: 1 ml (HR/5) (Rpharmacia)
 Säulenpuffer: a) 25 mM Tris, 5 mM Mercaptoethanol, pH 7,9
 b) 25 mM Tris, 5 mM Mercaptoethanol, 1M NaCl, pH 7,9
 Flußrate: 0,5 ml/min
 Fraktionsgröße: 1 ml
 Gradient: 0 bis 300 mM NaCl

2.3.6 Chromatographie auf Uno Q-6

Säule: Uno-Q-6 -Fertigsäule (Firma Bio-Rad)
 Säulenpuffer: a) 20 mM Ammoniumacetat, 5 mM Mercaptoethanol, pH 8,6
 b) 1 M Ammoniumacetat, 5 mM Mercaptoethanol, pH 8,6
 Flußrate: Probeaufgabe: 1ml/min; Elution: 2 ml/min
 Fraktionsgröße: 4 ml
 Gradient: 20-300 mM Ammoniumacetat, 5 mM Mercaptoethanol, pH 8,6

Die Proteinfractionen der Sephadex-75-Säule, oder die mit Ammoniumsulfat gefällten Proteine werden gegen 20 mM Ammoniumacetatpuffer pH 8,6 dialysiert. Durch Zugabe von 10 mM DTT werden sie 30 min reduziert und anschließend auf die Uno-Q-6 aufgetragen. Es wird so lange mit Säulenpuffer gespült, bis ungebundenes Protein von der Säule gewaschen ist (3-4 Säulenvolumina). Gebundene Thioredoxine werden dann durch einen linearen Gradienten mit Puffer b) eluiert.

2.3.7 Ionenaustauschchromatographie auf FPLC-Mono-S

Die Fraktionen der Uno-Q-6 mit Thioredoxin f-Aktivität aus *Scenedesmus* werden gepoolt, über Nacht gegen 10 mM Na-Acetatpuffer pH 4,9 dialysiert und nach einer Reduktion mit 10 mM DTT der Kationenaustauschchromatographie auf Mono-S unterzogen.

Säulenmaße: 1 ml (HR/5)
 Säulenpuffer: a) 10 mM Na-Acetat, 5 mM Mercaptoethanol, pH 4,9
 b) 10 mM Na-Acetat, 5 mM Mercaptoethanol, 1M NaCl, pH 4,9
 Flußrate: 0,5 ml/min
 Fraktionsgröße: 1 ml
 Gradient: bis 250 mM NaCl; 1% Kochsalz pro ml

Nach dem Probenauftrag wird die Säule mit ca. 5 ml Puffer gewaschen um die nicht gebundenen Proteine von der Säule zu spülen. Dann lässt man den NaCl-Gradienten ansteigen. Der Aktivitätspeak wird anschließend mit FbPase detektiert.

2.3.8 Aufbewahren der gereinigten Thioredoxinproben

Die mit Ammoniumsulfat ausgefällten Proteinfraktionen mit Thioredoxinaktivität aus *Scenedesmus* und *Chlorella* können ohne Aktivitätsverlust mehrere Tage im Kühlschrank bei +4°C, oder als abzentrifugierte Niederschläge mehrere Monate bei minus 20° C aufbewahrt werden. Die Ammoniumsulfatfällung empfiehlt sich nicht bei hochgereinigten Proben, deren Proteingehalt sehr gering ist.

P. Langlotz (1986) berichtet, dass wässrige Lösungen mit Thioredoxin *f* – Aktivität aus *Scenedesmus* nicht gefriergetrocknet werden oder als Lösung im Gefrierschrank eingefroren werden dürfen, da dies zu totalem Aktivitätsverlust führt. Das 28 kDa Thioredoxin *f* in Lösung soll jedoch in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C aufbewahrt werden.

Nach unserer Erfahrung verliert das 28 kDa-Trx *f* auch nach dem Einfrieren in flüssigem Stickstoff ca. 50% der Aktivität. Deshalb wurden die Proben, die in einem vorgereinigten Zustand in 90%-iger Ammoniumsulfatlösung aufbewahrt wurden, erst kurz vor den Tests in weiteren Schritten aufgereinigt. Danach konnte man die aufgereinigten Fraktionen eine Woche im Kühlschrank bei +4°C ohne nennenswerten Aktivitätsverlust aufbewahren. Nach 3-4 Stunden bei +25°C verlor das 28 kDa *Scenedesmus*-Thioredoxin *f* seine Aktivität im Hydrogenase-Test, die Fraktionen mit den Thioredoxinen I+II blieben bei gleichen Bedingungen noch aktiv.

2.4 Präparation des *OEE*-Proteins aus *S. obliquus*

Alternativ kann das als Trx-*f* beschriebene Protein, was nach dem Ergebnis der Sequenzierungsarbeiten ein *OEE*-Protein aus dem Photosystem II ist, mittels Butanolextraktion aus Thylakoidmembranen isoliert werden. Als Grundlage für die Aufreinigung des Proteins wurde die von Yamamoto *et al.* (1986) für die Isolierung des Spinat-*OEE* Proteins entwickelte Methode verwendet, die entsprechend den Bedürfnissen angepasst wurde.

Im ersten Schritt folgt ein Totalaufschluß der Algenzellen mit Glasperlen in der Vibrogen-Zellmühle im Puffer A (70 mM MES; 120 mM NaCl; 0,33 M Sorbit; pH 6,5) vorgenommen (4 mal 5 min mit 2 min Unterbrechung). Das Rohhomogenat saugt man über eine Glasfritte ab, um die Glasperlen abzutrennen. Anschließend wurde das Rohhomogenat auf Eis 30 s mit Ultraschall bei 100 Watt Einstellung behandelt um die eventuell intakt erhaltene Chloroplasten zu zerstören. Danach erfolgt eine 10 min Zentrifugation bei 700 g im GSA-Rotor. Der noch dunkelgrüne Überstand wird vorsichtig dekantiert, das hellgrüne Pellet, das zum größten Teil aus Zellwänden und Stärkekörnern besteht, wird verworfen. Der Überstand wird bei 12000 g 12 min im GSA-Rotor zentrifugiert und dekantiert. Der Überstand wird verworfen, das erhaltene, aus zwei Schichten bestehende Pellet wird weiter verarbeitet. Die obere dunkelgrüne Schicht, die schwere Thylakoidfragmente, wird vorsichtig im Puffer A mit Hilfe eines Pinsels resuspendiert, die untere hellgrüne Schicht (restliche Zelltrümmer) wird verworfen. Die erhaltene grüne Suspension wird mit Triton X-100 in einem Verhältnis Triton/Chlorophyll 25 (w/w) versetzt und 2 min in der Kälte gerührt. Anschließend wird die Suspension 5 min bei 3000 g zentrifugiert um die tritonresistente Thylakoidfraktion zu entfernen. Der Überstand wird vorsichtig dekantiert und abzentrifugiert (35000 g, 20 min im SS-34 Rotor). Die mit PSII-Partikeln angereicherte Fraktion wird als Pellet erhalten. Diese wird einer 1 M NaCl Behandlung unterworfen. Zu diesem Zweck wird das Pellet in Puffer A resuspendiert und mit festem NaCl unter Rühren in der Kälte auf eine Konzentration von 0,12 M auf 1 M gebracht und weitere 30 min gerührt. Nach einer Zentrifugation (35000 g, 20 min) wird das Pellet einmal mit Puffer A gewaschen bei wiederholter Zentrifugation. Das gewaschene Pellet wird in 50 ml 25 mM MES Puffer pH 6,5 resuspendiert, mit gleichem Volumen kaltem n-Butanol versetzt und in einem verschlossenen Zentrifugenbecher 30 s kräftig geschüttelt. In diesem Becher wird die Mischung 5 min

bei 5000 g zentrifugiert. Die untere wässrige farblose Phase wird mit Hilfe einer Spritze abgesaugt. Die obere grüne Butanolphase, sowie die kleinen Mengen weißen Pellets werden verworfen. Ist die erhaltene wässrige Phase immer noch grünlich, so wird die Butanolbehandlung wiederholt. Die Lösung wird sterilfiltriert und auf eine mit 25 mM MES Puffer pH 6,5 equilibrierte Uno-Q-6 Säule aufgetragen. Nicht gebundene Proteine werden mit 2 Säulenvolumina von der Säule gespült, anschließend wird in dem gleichen Puffer mit einem Salzgradienten von 0 bis 0,5 M NaCl eluiert.

2.5 Elektrophoretische Methoden

2.5.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Trennung von Proteinen durch SDS-PAGE erfolgt nach der Variante von Lämmli (1970) in einer Miniprotein II-Apparatur der Firma BioRad und dient der Molmassenbestimmung mit Hilfe von Markerproteinen und der Reinheitskontrolle der Proben. Es werden Polyacrylamid-Gele der Größe 8 x 6 cm mit einer Schichtdicke von 1 mm hergestellt.

Der Gefahrstoff Acrylamid wird lt. Betriebsanweisung verwendet, Reste davon werden zur Entsorgung gesammelt.

Probenvorbereitung:

Die Proteinprobe wird mit 72% Trichloressigsäure (TCA) im Verhältnis 10 :1 versetzt und über Nacht im Kühlschrank belassen. Anschließend wird das ausgefällte Protein für 15 min in der Tischzentrifuge abzentrifugiert und das Pellet nach vorsichtigem Absaugen des Überstandes mittels einer Wasserstrahlpumpe in 15 µl Extraktionsmedium aufgenommen. Zur Neutralisation sind zur Probe einige Tris-Kristalle bis zum Farbumschlag nach blau zuzusetzen. Die Probe wird gründlich durchmischt, kurz abzentrifugiert und für 3 min im Wasserbad gekocht.

Extraktionsmedium:

5,0 g Saccharose
1,0 g SDS

0,5 g 2-Mercaptoethanol
15,0 mg Bromphenolblau
werden mit 125 mM Tris/HCl-Puffer pH 8,6 auf 50 ml aufgefüllt.

Trenngel:

Für eine Trennung im Molmassenbereich von 10-100 kDa ist ein SDS-Gel mit 12 % Acrylamid / Methylenbisacrylamid gut geeignet.

Acrylamidstammlösung:

48,0 g Acrylamid
1,1 g Methylenbisacrylamid
werden mit Wasser (Bidest) auf 100 ml aufgefüllt.

Gel-Zusammensetzung:

1,3 g Glycerin
2,02 ml Acrylamidstammlösung
5,72 ml Gelpuffer (3 M Tris/HCl, pH 8,45; 0,3% SDS)
1,18 ml Wasser
10,0 µl Tetramethylethylendiamin (TEMED)

Durch Zugabe von 50 µl einer 10%-igen $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ - Lösung (frisch angesetzt) wird die Polymerisation gestartet. Die Glasplatten der Gelapparatur werden bis ca. 1,5 cm unter den oberen Rand mit Trenngel-Lösung befüllt und mit Wasser überschichtet, um eine gerade Oberfläche zu erhalten. Nach etwa 30 min ist die Polymerisation vollständig.

Sammelgel:

Das Wasser wird von der Geloberfläche entfernt, Reste saugt man mit Filterpapierstreifen ab. Zur Ausbildung der Probestaschen im Sammelgel wird ein Kamm zwischen die beiden Glasplatten gesteckt und bis zum oberen Rand mit Sammelgel-Lösung gefüllt.

Sammelgel - Zusammensetzung:

0,50 ml Acrylamidstammlösung

2,05 ml	Gelpuffer
3,70 ml	Wasser
10,0 µl	TEMED
30,0 µl	10%-ige $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ - Lösung

Nach etwa 30 min ist die Polymerisation beendet, die Apparatur wird nach Anleitung zusammengebaut und die Elektrodenkammern mit Anoden- bzw. Kathodenpuffer befüllt, der Kamm wird entfernt.

Anoden Puffer: 200 mM Tris/HCl, pH 8,9

Kathoden Puffer: 100 mM Tris, 100 mM Tricin, 0,1% SDS, es stellt sich ein pH-Wert von 8,25 ein

Die Proteinproben werden durch Unterschichten mit einer Hamilton-Spritze vorsichtig in die Taschen eingefüllt.

Laufbedingungen:

Zum Ankonzentrieren der Proben im Sammelgel legt man zunächst für etwa 30 min eine Spannung von 35 V an bis die blauen Banden auf einer Ebene fokussiert sind. Zur Trennung der Proteine erhöht man die Spannung auf 100 V. Nach etwa 90 min hat das Bromphenolblau das Ende des Gels erreicht, die Elektrophorese ist beendet.

2.5.2 Färbemethoden

Coomassieblau-Färbung:

Proteine in Polyacrylamidgelen können mit einer Coomassie Brillant Blue-Lösung angefärbt werden. Nach Beendigung der Elektrophorese werden die Gele für mindestens 60 min in der Farblösung geschwenkt. Zur Entfärbung des Gelhintergrundes wird das Gel dann für 2-3 h in einem Entfärberbad geschwenkt. Durch häufiges Austauschen des Entfärbers kann der Vorgang beschleunigt werden.

Färbebad:

250 ml Methanol
 25 ml Eisessig
 1,25 g Coomassie Brillant Blue R 250
 mit bidest. Wasser auf 500 ml auffüllen

Entfärbebad:

300 ml Eisessig und 200 ml Ethanol werden mit Wasser auf 2 l aufgefüllt.

2.5.3 Elektrophoretisches Blotting

Proteine, die in einem 12%-igem SDS-Acrylamid-Gel aufgetrennt, aber nicht angefärbt wurden, werden anschließend elektrophoretisch auf eine Polyvinylidendifluorid-(PVDF)-Membran (Immobilon-P, Millipore) übertragen. Das geschieht in einer Multiphor-Apparatur von Pharmacia nach dem "Semi-Dry-Blotting" Verfahren. Die Membran wird direkt vor dem Blotten einige Sekunden in Methanol geschwenkt und dann im Transferpuffer äquilibriert. Das Gel wird ebenfalls 15-20 min in dem Transferpuffer äquilibriert.

Transfer-Puffer:

48 mM 39 mM 0,0375% 20%
 Tris/HCl pH 9,2
 Glycin
 SDS
 Methanol

Aufbau einer Protein-Transfer-Einheit:

Zunächst werden die Kathode und Anode mit demineralisiertem Wasser angefeuchtet. Acht Lagen Filterpapier werden mit Transferpuffer getränkt und luftblasenfrei übereinander auf die Anode der Blot-Apparatur gelegt. Die mit Transferpuffer getränkte Membran wird auf die Filter gelegt, gefolgt von dem Polyacrylamidgel. Auf das Gel werden wiederum acht Lagen mit Transferpuffer getränkte Filter gelegt. Die eventuell zwischen den Schichten auftretenden

Luftblasen werden entfernt, wobei man mit einem Reagenzglas vorsichtig ohne starkem Druck über die Schichten rollt. Anschließend wird von oben mit mehreren Tropfen Transferpuffer angefeuchtet und die Kathode aufgelegt. Dann wird die Apparatur zusammengebaut und an das Netzteil angeschlossen.

Laufbedingungen:

Die Stromstärke für den Proteintransfer ist abhängig von der Größe des Gels und beträgt 0,8-1,5 mA/cm² Gelfläche. Gele mit 0,75 mm Dicke werden 35 min geblottet. Die Stromstärke muss während des Laufes nachjustiert werden, da sie nach einigen Minuten sinkt.

Nach Beendigung des Vorganges kann die Membran mit Blot-Färber für 1 min angefärbt werden. Zur Entfärbung wird der Blot nur wenige Minuten in Blot-Entfärber geschwenkt.

Blot-Färber:

0,1 %	Coomassie Blue R-250
40 %	Methanol
1 %	Eisessig

Blot-Entfärber:

Methanol 50 % in Aqua Bidest

2.6 Enzymatische Testverfahren

Thioredoxine besitzen keine eigene enzymatische Aktivität, ihre Detektion ist darum nur durch die von ihnen ausgelöste Stimulation von Zielenzymen möglich. Als Zielenzyme wurden routinemäßig Fructose-1,6-bisphosphatase und NADP-Malatdehydrogenase verwendet. NADP-Malatdehydrogenase kann rasch präpariert werden und ist in vorgereinigter Form lange Zeit bei -20°C lagerbar.

Die Präparation der Fructose-1,6-bisphosphatase ist aufwendiger, dafür hat sich die Detektion der *f*-Thioredoxine mit diesem Enzym als sehr zuverlässig erwiesen. Das Enzym ist im eingefrorenem Zustand bei -70°C bis zu einem Jahr ohne Aktivitätsverlust lagerbar.

2.6.1 Detektion von Thioredoxinen im FbPase-Test

Thioredoxine (insbesondere die sogenannten *f*-Typ-Thioredoxine) sind in der Lage, in Gegenwart suboptimaler Konzentrationen von DTT (1 mM im Test) die chloroplastidäre alkalische Fructose-1,6-bis-phosphatase (EC 3.1.3.11) zu stimulieren. In Chloroplasten spielt dieses Enzym eine wichtige Rolle im reduktiven Pentosephosphatcyclus. Das gebildete Phosphat kann photometrisch bestimmt werden:



Isolierung der Fructose-1, 6-bis-phosphatase:

Die Isolierung der Fructose-1,6-bisphosphatase erfolgte nach Rother *et al.*, (1988). Alle Schritte der Aufarbeitung werden auf Eis bzw. bei 4° C durchgeführt, Pellets in der sich die FbPase befindet, sollte man stets gut ablaufen lassen.

500 g Spinatblätter ohne Stiele (am günstigsten frisch) und 1 l Na-acetat-Puffer (50 mM, pH 6) ca. 1-2 min im vorgekühlten Waring Blender mixen; die Blätter müssen vollständig zerkleinert sein. Durch Mull und Miracloth oder ein Handtuch filtrieren, Flüssigkeit kräftig durchdrücken.

55% -Ammoniumsulfat-Fällung:

Zugabe des Ammoniumsulfates portionsweise, nach letzter Zugabe noch mind. 30 min rühren. Zentrifugation im GS3 oder GSA-Rotor 25 min jeweils bei maximaler rpm-Zahl, Pellet verwerfen, Volumen des Überstandes bestimmen.

55-90% Ammoniumsulfat-Fällung:

Zugabe des Ammoniumsulfates portionsweise, nach letzter Zugabe mind. 30 min rühren lassen. Zentrifugation der 90 %-Fällung im GS3 bzw. GSA-Rotor 25 min bei jeweils maximaler rpm Zahl, Ammoniumsulfatlösung von den Pellets gut ablaufen lassen. Pellets in Na-acetat-Puffer (50 mM, pH 5,5) resuspendieren und auf 125 ml auffüllen.

1.PEG-Fällung:

Polyethylenglycol (PEG) 6000 von Serva in fester Form portionsweise zugeben (0,15 g/ml), nach letzter Zugabe noch mindestens 30 min rühren lassen, abzentrifugieren im SS34 oder GSA-Rotor 20 min bei maximaler Umdrehungszahl.

2.PEG-Fällung:

0,15 g/ml PEG des ursprünglichen Volumens (also die gleiche Menge) portionsweise zum Überstand der vorherigen Zentrifugation zugeben, nach der letzten Zugabe noch mind. 30 min rühren lassen. Nach der 2. PEG-Fällung folgt eine Zentrifugation im SS34 oder GSA-Rotor 30 min bei maximaler Umdrehungszahl.

Die sehr viskose Flüssigkeit vom Pellet gut ablaufen lassen, Pellet in 3,5 ml Na-acetat-Puffer, (50 mM pH 5,0 + 0,2 M NaCl) resuspendieren und gut homogenisieren, unlösliches Material abzentrifugieren (Rotor SS 34 bei 15000 g 10 min), Überstand der Zentrifugation auf 25 ml mit Na-acetat-Puffer (50 mM, pH 6,0 + 0,1 M NaCl) auffüllen.

DEAE-Cellulose im Batch-Verfahren:

3,75 g feuchte DEAE-Cellulose (neues Material) in 150 ml Na-acetat-Puffer (50 mM, pH 6,0) geben, pH-Wert genau auf 6,0 einstellen, anschließend in diesem Puffer inkubieren. Danach über eine Glasfritte absaugen (nicht trocken saugen) und das Material zu dem auf 25 ml aufgefüllten Überstand der SS 34-Zentrifugation geben, sofort den pH Wert der Suspension auf 6 einstellen (pH-Meter dabei auf 4°C einstellen), 15-20 min in der Kälte rühren, auf einer Glasfritte absaugen. Bei allen Filtrationen darauf achten, daß die DEAE-Cellulose nicht zu trocken gesaugt wird. Mit 25 ml Na-acetat (50 mM, pH 6 + 0,1 M NaCl) waschen (= Filtrat 1, vereinigt mit der direkt von der Probe abgesaugten Lösung), 2 mal mit 25 ml Na-acetat (50 mM, pH 5,5 + 0,2 M NaCl) waschen, dabei mit einem Spatel rühren und absaugen (= Filtrat 2), 1 mal mit 12,5 ml Na-acetat, (50 mM, pH 5,5 + 0,5 M NaCl) waschen (= Filtrat 3)

Von allen Filtraten wird die Aktivität der FbPase durch Verwendung von 10 mM und 100 mM DTT-Stammlösung (1 bzw. 10 mM DTT im Test) im FbPase-Test bestimmt. Durch 10 mM DTT im Test wird die FbPase ohne Zusatz von Thioredoxin *f* stimuliert. Die stimulierbare FbPase sollte im Filtrat 3 vorhanden sein. FbPase, die nach dieser

Vorschrift isoliert wurde, ist von hoher Reinheit und zeigt auf der SDS-PAGE eine starke Bande im Bereich 40 kDa (Abb. 2.4).

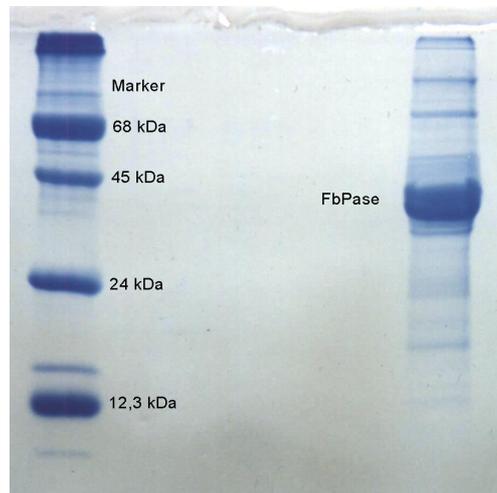


Abb. 2.4: SDS-PAGE der FbPase-Präparation

FbPase-Test:

<u>Endvolumen:</u>	<u>500 µl</u>	<u>Endkonzentration im</u>
		<u>Test:</u>
Testpuffer:	50 µl (1 M Tris/HCl, 10 mM MgSO ₄ , pH 7,9)	1mM Mg ²⁺
DTT (frisch angesetzt):	50 µl (10 mM DTT in H ₂ O)	1 mM
FbPase:	50 µl	variabel
Thioredoxin:	bis 300 µl oder entspr. Säulenpuffer als Blindwert (keinen Phosphatpuffer)	variabel

auffüllen mit H₂O auf 0,45 ml, durchmischen.

Die Mischung wird 5 min bei Zimmertemperatur inkubiert und dann die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 60 mM Fructose-1,6-bis-phosphatlösung in H₂O gestartet (Endkonzentration im Test 6 mM); gut durchmischen. Nach 25 min Inkubation bei 30°C werden 0,2 ml von dem Testansatz in 1 ml- Plastikküvetten umpipettiert, die Reaktion durch Zugabe von 0,8 ml Phosphatreagenz gestoppt (insgesamt 30 min nach dem Start) und nach weiteren 10 min bei Zimmertemperatur der Phosphatgehalt photometrisch bei 660 nm bestimmt. Bei Bestimmung der Thioredoxinaktivität in einzelnen Fraktionen der FPLC-Reinigungsschritte wird nur

der Wert von E_{660} angegeben. Anhand der Eichkurve in Abb. 2.5 können auch absolute Werte angegeben werden.

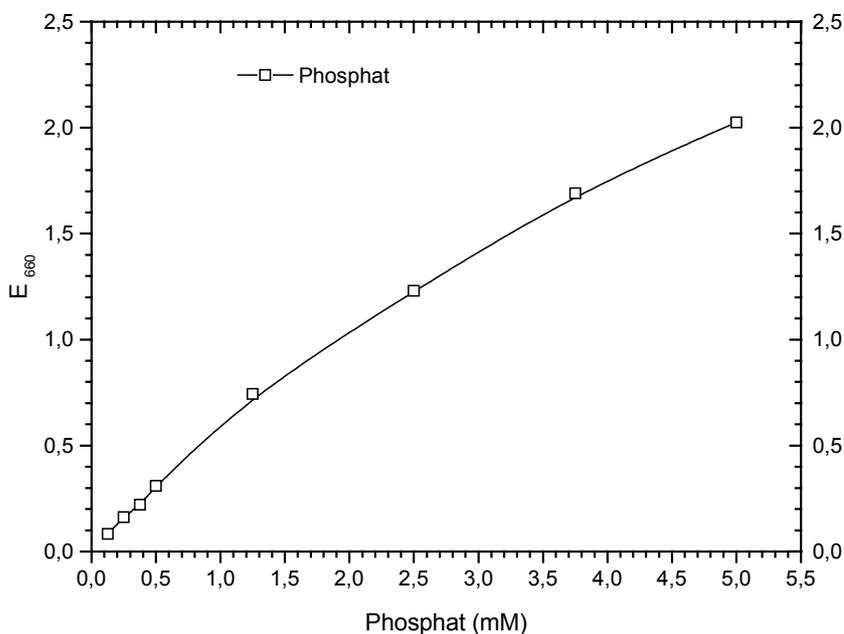


Abb. 2.5: Eichkurve zur Phosphatbestimmung nach Taussky und Shorr (1963); P_i (mM) = $0,0858(E_{660})^3 + 0,3298(E_{660})^2 + 1,4352(E_{660}) + 0,0143$

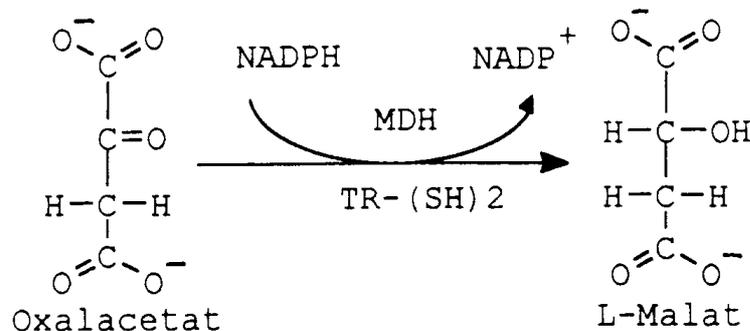
Die Phosphatkonzentration wird mit Hilfe des Algorithmus zur Eichkurve in Abb. 2.3 berechnet. $E_{660} = 1$ entspricht einer Phosphatkonzentration von 1,86 mM. Unter den Reaktionsbedingungen (1mM DTT und 1 mM Mg^{2+} im Testansatz) bedeutet das eine FbPase-Aktivität von 34 nmol/min. Durch Zugabe von 1 μ g homogenes Trx *f* aus Spinat wird die Aktivität der FbPase von 3,6 nmol/min auf 65 nmol/min erhöht.

Phosphatreagenz:

- 125 ml Aqua bidest
- 25 ml 9 N H_2SO_4
- 25 ml Molybdatlösung ($(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O$; 6,6 g/100 ml)
- 25 ml Fe (II)-Lösung (2 g $FeSO_4$ / 24ml H_2O + 1 ml 9 N H_2SO_4)

2.6.2 Detektion von Thioredoxinen im NADP-MDH-Test

Chloroplastidäre NADP-Malatdehydrogenase (EC 1.1.1.82) katalysiert in C₃ – und C₄ - Pflanzen die Umwandlung von Malat zu Oxalacetat. Im Test wird die umgekehrte Reaktion verfolgt:



NADP-MDH wird *in vivo* durch Licht aktiviert. *In vitro* können Thiole wie DTT und reduziertes Thioredoxin diese Funktion übernehmen. Durch Messung des NADPH-Verbrauchs in Abhängigkeit von der Thioredoxin-Menge ergibt sich ein photometrischer Test auf Thioredoxin.

Isolierung der NADP-Malatdehydrogenase aus Spinat:

Die Präparation der NADP-Malatdehydrogenase erfolgte nach Jacquot *et al.*, (1978). 100 g frischer Spinat, ohne Stiele und Blattrippen, werden mit 300 ml Phosphatpuffer (100 mM, 0,1 % Mercaptoethanol, pH 7) unter ständigem Kühlen im Mixer zerkleinert. Das Rohhomogenat wird durch ein Tuch gepresst und die Flüssigkeit 20 min bei 20000 g zentrifugiert. Anschließend unterzieht man den hellgrünen Rohextrakt einer 40 % Ammoniumsulfatfällung, rührt 1 Stunde und zentrifugiert erneut (20 min, 20000 g). Der Überstand wird mit festem Ammoniumsulfat auf 80 % Sättigung gebracht. Nach einstündigem Rühren und Zentrifugation (20 min, 20000 g) löst man das gelbgrüne Pellet in Phosphatpuffer (200 mM KH₂PO₄, pH 7) ohne Mercaptoethanol und friert in 1 ml Portionen bei -70°C ein. Die Malatdehydrogenase ist so mehrere Monate haltbar. Zur Verwendung in Thioredoxin-Tests, chromatographiert man eine Portion über eine Sephadex G-50 Säule (3 x 40 cm), um endogene Thioredoxine abzutrennen. Die Säule ist mit 200 mM KH₂PO₄ – Puffer, pH 7 äquilibriert; dieser Puffer dient auch zur Elution. Es werden Fraktionen von 5

ml/10 min aufgefangen. Das Enzym befindet sich im Durchbruch. Diese Fraktionen können direkt für den Thioredoxin-Test verwendet werden oder sie werden in 1 ml-Portionen in Eppendorf-Cups eingefroren und bei -70°C aufbewahrt.

MDH-Test:

<u>Endvolumen:</u>	<u>1 ml</u>	<u>Endkonzentration im</u>
		<u>Test:</u>
Testpuffer:	0,3-0,5 ml (200 mM Tris/HCl, pH 7,9)	variabel
DTT (frisch angesetzt):	0,1 ml (50 mM in Testpuffer)	5 mM
MDH:	0,05 ml	variabel
Thioredoxin:	0,05-0,3 ml (oder Puffer der Blindprobe)	variabel

gut durchmischen.

Nach 30 min Inkubation bei 37°C wird die Reaktion durch Zugabe von 0,1 ml 25 mM Oxalacetatlösung in Testpuffer (Endkonzentration im Test 2,5 mM) und 0,1 ml 2,5 mM NADPH - Lösung in Testpuffer (Endkonzentration im Test 0,25 mM) in 1 ml-Quarzküvetten gestartet (gut durchmischen). Verfolgt wird die Extinktionsänderung bei 340 nm.

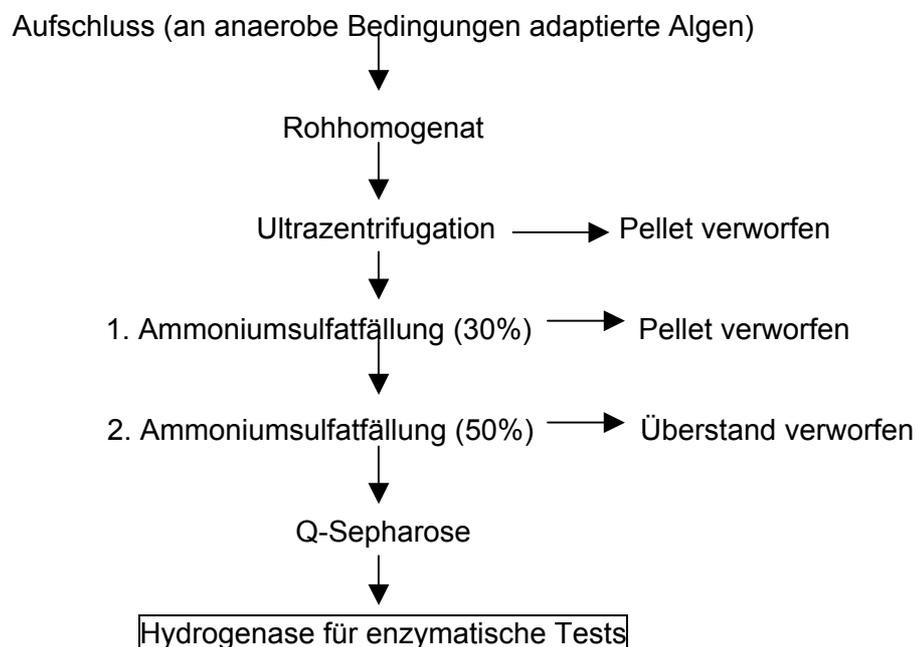
Thioredoxinaktivität wird als Stimulationsfaktor der MDH ausgedruckt:

$$\text{Stimulationsfaktor (SF)} = \frac{\Delta E/\text{min (MDH + TR)}}{\Delta E/\text{min (MDH - TR)}}$$

2.6.3 Untersuchung der Reaktion von Thioredoxinen und NiFe-Hydrogenase aus *Scenedesmus obliquus*

Die Anaeroben-Apparatur sowie die gereinigte NiFe-Hydrogenase aus *Scenedesmus obliquus* für die Untersuchung der Thioredoxinwirkung auf das Enzym wurden freundlicherweise im Fachgebiet Pflanzenphysiologie (Prof. Dr. H. Senger) der Philipps-Universität Marburg bereitgestellt.

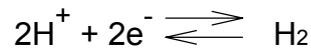
Die Hydrogenase in *Scenedesmus obliquus* wird erst bei der Adaptation im Dunklen unter Stickstoffbegasung aktiviert (Zinn und Schulz, 1996). Eine nachträgliche Aktivierung der Hydrogenase *in vitro* ist nicht möglich (Strecker und Senger, 1981; Urbig et al. 1993), deshalb müssen die Algen im heterotrophen Medium im Dunklen angezogen werden. Als Nährmedium dienten die Stammlösungen und Spurenelementlösung wie in 2.2.1., dem zusätzlich 0,5% (w/v) Glucose und 0,25% (w/v) Hefeextrakt (Bishop und Wong, 1971) zugesetzt wurden. Die Ernte erfolgte bei 4°C unter schwachem grünem Sicherheitslicht und unmittelbar danach wurden die Algen an anaerobe Bedingungen adaptiert. Dazu wurde die Algensuspension in ein gasdicht verschließbares Gefäß überführt und 60 min bei Raumtemperatur mit O₂-freiem Stickstoff durchperlt. Anschließend wurde die Adaptation ohne Begasung in einem Wasserbad bei 30°C unter Schütteln für weitere 3 Stunden fortgeführt. Da die Hydrogenase für die Tests von der Arbeitsgruppe Dr. R. Schulz bereitgestellt wurde, wofür ich insbesondere Herrn Dr. R. Wünschiers danken möchte, werden an dieser Stelle die Anreicherungsschritte des Enzyms nur anhand des folgenden Schema erklärt:



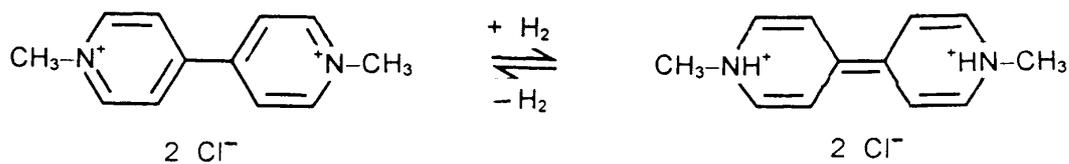
Alle Arbeitsschritte der Aufreinigung werden unter anaeroben Bedingungen durchgeführt, was die Isolierung einer intakten Hydrogenase sehr aufwendig macht.

Hydrogenase-Tests:

Ferredoxin-abhängige Hydrogenasen (EC 1.18.99.1) katalysieren die Reaktion:



Um die enzymatische Aktivität der Hydrogenase in zellfreien Präparationen messen zu können, ist die Anwesenheit eines künstlichen Elektronendonators bzw. - Akzeptors notwendig. Hierzu hat sich Methylviologen (1,1'-Dimethyl-4,4'-bipyridindichlorid) bewährt (Schlegel und Schneider, 1978; Schnackenberg, 1993):



Die Hydrogenaseaktivität kann durch die polarographische Verfolgung der Produktion von molekularem Wasserstoff mit Hilfe einer Clark-Elektrode bestimmt werden, wobei die Hydrogenase Elektronen von reduziertem Methylviologen auf die Protonen des Puffers überträgt. Alternativ kann die Geschwindigkeit der umgekehrten Reaktion photometrisch gemessen werden, wobei die Reduktionsäquivalente von molekularem Wasserstoff auf oxidiertes Methylviologen übertragen werden.

Die Tests wurden nach der 2. Methode in dicht verschließbaren Glasküvetten unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Gemessen wird die Absorptionszunahme des reduzierten Methylviologens bei 578 nm. Da Sauerstoff die Hydrogenase irreversibel hemmt, wird vorher aus allen Lösungen durch Begasen mit einer Mischung aus Stickstoff und Wasserstoff der Sauerstoff entfernt. Danach werden die Lösungen in eine Anaerobenkammer eingeschleust, wo der Reaktionsansatz zusammenpipettiert wird. Die Reaktion wird durch Zugabe von 0,1 ml mit Wasserstoff gesättigter Methylviologen-Lösung (50 mM; Endkonzentr. 5 mM im Test) gestartet und die Extinktionszunahme 20 min lang bei 578 nm photometrisch verfolgt. Die Messküvette bleibt dabei dicht verschlossen.

Hydrogenase-Testzusammensetzung:

<u>Endvolumen:</u>	<u>1 ml</u>	<u>Endkonzentration im Test:</u>
Testpuffer:	0,1 ml (25mM Tris, 100mM NaCl, pH 7,9)	25mM Tris; 100 mM NaCl
DTT (frisch angesetzt):	0,1 ml (10 mM DTT in Testpuffer)	1 mM
Hydrogenase:	0,1 ml (präpariert im Puffer wie Testpuffer)	variabel
Thioredoxin:	0-0,6 ml (in Trispuffer 25mM, 100mM NaCl, 5mM ME, pH 7.9)	variabel

2.7 Immunologische Methoden**2.7.1 Western-Blot**

Die geblotteten Proteine wie in Kapitel 2.5.3 werden einem immunologischen Nachweis unterworfen. Dazu wird die nicht angefärbte Membran in Blockierungspuffer überführt.

Blockierungspuffer:

PBS- Puffer + 5 % Milchpulver

PBS-Puffer (Phosphate buffered saline):

14,24 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

2,76 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times 1\text{H}_2\text{O}$

5,8 g NaCl

mit H_2O auf 1 l auffüllen

Antikörpernachweis:

- Die Membran wird mindestens 1 h im Blockierungspuffer geschwenkt, um die freien Bindungsstellen abzusättigen. Die Blockierung sowie alle weiteren Schritte erfolgen unter leichtem Schütteln bei Raumtemperatur.
- Der Blockierungspuffer wird durch 3x5 min waschen mit PBS-Puffer entfernt.

- Die Membran wird für mindestens 2 h in der Lösung des *E. coli*-Thioredoxin-spezifischen Antikörpers aus Schaf (Firma IMCO) inkubiert. Die Arbeitsverdünnung ist 1:1000 in Blockierungspuffer.
- Überschüssige Antikörper werden durch 3x5 min Waschen mit PBS-Puffer entfernt.
- Die Membran wird in die Lösung mit dem Peroxidase-gekoppelten Antikörper gegen Schaf-IgG (Sigma A3415) überführt und 1-2 h inkubiert. Die Verdünnung dieses Antikörpers beträgt 1:1000 in Blockierungspuffer.
- Überschüssige und nicht gebundene Antikörper werden durch 3x5 min Waschen mit PBS-Puffer entfernt.
- Die Membran wird in Substratlösung überführt. Die Membran sollte höchstens 20 min in der Substratlösung verbleiben, um eine Überentwicklung des Hintergrundes zu vermeiden.

Substratlösung:

Als Substrat für die Peroxidase wurde 3,3'-Diaminobenzidin (Sigma D-4418) verwendet, dessen Oxidationsprodukte als braune Signale auf der Membran sichtbar sind. Diaminobenzidin in Tablettenform wird nach Anleitung im Beipackzettel unmittelbar vor Gebrauch in Wasser aufgelöst.

2.7.2 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

Proteine binden durch spontane Adhäsion an die Gefäßwände von Mikrotiterplatten (F-Form aus Immunolon, Fa. Dynatech). Durch Inkubation mit spezifischem Antiserum werden spezifische Antikörper an die immobilisierten, zu detektierenden Proteine gekoppelt. Der an den Mikrotiterplatten fixierte Antikörper/Antigen-Komplex wird anschließend mit Peroxidase-gekoppeltem Antikörper gegen Immunglobuline aus Schaf inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen wird der Enzym-markierte Antikörper/Antigen-Komplex durch eine Farbreaktion nachgewiesen.

Durchführung:

- Das Antigen (Thioredoxin-Probe) wird in Kopplungspuffer gelöst, je Napf der Mikrotiterplatte werden 200 µl eingebracht und über Nacht bei 4°C inkubiert.
- Das Antigen wird abpipettiert, freie Bindungsstellen mit 300 µl Blockierungspuffer abgesättigt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert.
- Durch Ausschlagen des Puffers werden die Näpfe geleert und zweimal mit je 300 µl Waschpuffer gespült (je 15 min).
- Der spezifische *E. coli*-Thioredoxin-Antikörper aus Schaf (IMCO) wird eingebracht, die Stammlösung wird 1:1000 mit Blockierungspuffer eingestellt. Pro Napf werden 200 µl Serumlösung zugesetzt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert.
- Überschüssige Antikörper werden viermal mit je 300 µl Waschpuffer ausgespült (je 15 min).
- Pro Napf werden 200 µl Peroxidase-markierte Antikörper gegen Schafs IgG (Sigma A3415) mit einer Verdünnung von 1:1000 in Blockierungspuffer eingebracht und 2 h inkubiert.
- Überschüssige, nicht gebundene Antikörper werden durch viermaliges Spülen mit je 300 µl Waschpuffer entfernt.
- Für die Farbreaktion werden pro Napf 200 µl Substratlösung eingefüllt. Nach 10 min wird die Reaktion durch Zugabe von 100 µl 1 N Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion der einzelnen Proben gegen einen entsprechenden Blindwert (BSA) sofort bei 410 nm vermessen.

Kopplungspuffer:

0,2 M (17 ml) Na_2CO_3
 0,2 M (8 ml) NaHCO_3
 mit H_2O auf 100 ml auffüllen

Carbonatpuffer:

0,1 M Na_2CO_3
 0,1 M NaHCO_3
 1:1 Mischung mit konz. HCl auf pH 7,9 einstellen

Blockierungspuffer:

Carbonatpuffer mit 1% BSA (v/w)

Waschpuffer:

PBS-Triton (phosphate buffered saline)

2,33g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$

0,31g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

8,18g NaCl

5ml Triton x 100

mit H_2O auf 1 l auffüllen

Enzymtestlösung :

[2,2'-Azino-di(3-ethylbenzthiazolinsulfonsäure)] (ABTS) von Sigma (A1888); 10 mg in 100 ml 50 mM Phosphat-Citrat-Puffer pH 5,0 lösen und pro 100 ml Lösung 3 μl H_2O_2 -Lösung (30%) zugeben.

2.8 Vorbereitung von Proteinproben für die Aminosäuresequenzierung

Die Sequenzierungsarbeiten wurden freundlicherweise von der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung (GBF), Braunschweig, durchgeführt. Dafür möchte ich an dieser Stelle insbesondere Herrn Dr. Henryk Kalisz recht herzlich für die erfolgreiche Zusammenarbeit danken. Die N-terminale Sequenzierung mit Phenylisothiocyanat nach Edman geschah dort in einem Sequenzer der Fa. Applied Biosystems im 10-20 pmol-Maßstab. Die Vorbereitung der Proben erfolgte in Kassel. Für eine Ansequenzierung des untersuchten Proteins ohne vorhergehenden tryptischen Abbau wurden gereinigte Proteinproben auf SDS-PAGE getrennt, aber nicht angefärbt, und wie oben beschrieben elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran (Immobilon P^{SQ} von Millipore) geblottet. Nach anschließendem Anfärben wurden die Banden im relevanten Molmassenbereich sorgfältig mit einem sterilen Skalpell unter proteinfreien Bedingungen ausgeschnitten und in Eppendorf-Cups zum Sequenzieren eingeschickt.

Zur Detektion der im Inneren der Peptidsequenz liegenden für Thioredoxine typischen Cysteine, die bei einem Edman-Abbau zerstört würden, muss man diese Reste durch Alkylierung modifizieren. Die Alkylierung erfolgte nach Inglis (1983).

Hierfür wurden Iodessigsäure sowie Iodacetamid verwendet, wie vom Sequenzierungslabor vorgeschlagen wurde.

Die Alkylierung von Cysteinresten muss vor der SDS-PAGE vorgenommen werden, da Cystein auch mit Resten von nicht vollständig auspolymerisiertem Acrylamid im Gel unter Addition reagieren kann. Proben wurden auf drei unterschiedliche Weisen behandelt:

- Die Alkylierung wird bei pH 8,0 durchgeführt. Gereinigte Thioredoxin-Proben wurden mit frisch angesetzter 100 mM DTT-Lösung auf 10 mM gebracht und 30 min inkubiert. Danach wurde die Probe mit frisch angesetzter 0,5 M Iodacetamid- bzw. Iodacetat-Lösung (Lösungen vor Licht schützen) auf 50 mM gebracht und wieder 30 min im Dunklen inkubiert. Nach der Inkubation werden die Proben sofort mit 72 % TCA 1 Stunde gefällt, abzentrifugiert und für die SDS-PAGE wie oben beschrieben vorbereitet. Die 0,5 M Iodessigsäure-Stammlösung muss statt mit *bidest* mit 0,5 M NaOH angesetzt werden, damit sie neutralisiert ist.
- Die Behandlung wurde unter anaeroben Bedingungen durchgeführt. Die Probe und die Lösungen wurden zuerst 10 min in luftdichten vials mit Stickstoff begast. Lösungen wurden mittels Spritze mit Injektionskanüle oder Hamiltonspritze durch den Serumstopfen zusammenpipettiert. Reduziert wurde statt mit 10 mM mit 1 mM DTT, nach der Inkubation wurde die Probe wie zuvor mit 0,5 M Iodacetamid- bzw. Iodacetat-Stammlösung auf 50 mM gebracht, 30 min inkubiert und anschließend mit TCA gefällt. Auf diese Weise wird ein größerer Überschuss an Alkylierungsreagenz zu Reduktionsmittel erzielt.
- Die Behandlung erfolgte wie im ersten Fall, jedoch wurde die Proteinprobe vor der Behandlung mit 4,5 M Guanidinhydrochlorid versetzt und die Proteine damit denaturiert. Dafür wurde die Probe mit 9 M Guanidinhydrochlorid-Stammlösung 1:1 gemischt (um das Guanidinhydrochlorid vollständig aufzulösen erwärmt man die Stammlösung in warmen Wasser). Danach folgt eine Behandlung mit 10 mM DTT und 50 mM Iodacetamid- bzw. Iodacetat wie oben beschrieben. Die 100 mM DTT-Stammlösung und die 0,5 M Iodacetamid- bzw. Iodacetat-Stammlösung werden in diesem Fall in 4,5 M Guanidinhydrochlorid vorbereitet. Nach der Alkylierung muss die Probe von Guanidinhydrochlorid befreit werden, weil es bei der TCA-Fällung ausflockt. Für diesen Zweck wurde eine HiTrapTM 5 ml-Ensalzungssäule von Pharmacia benutzt. Die alkylierte und entsalzte Proteinprobe wurde dann mit TCA gefällt und für die SDS-PAGE vorbereitet.

Nach der SDS-PAGE werden die angefärbten Proteinbanden im relevanten Molmassenbereich aus dem Polyacrylamidgel ausgeschnitten. Die Spaltung der Proteinprobe mit Trypsin erfolgte im Sequenzierungslabor direkt im Gel. Die Spaltprodukte wurden auf einer HPLC-RP-C18 Chromatographiesäule getrennt und die Peptide dem Edman-Abbau unterworfen.

3. Ergebnisse

3.1 Isolierung der Thioredoxine aus *Scenedesmus obliquus*

In der säurestabilen und hitzestabilen Proteinfraction mechanisch homogenisierter *S. obliquus*-Algenzellen können insgesamt vier Thioredoxine identifiziert werden (Langlotz, 1986). Drei davon, mit üblichen Molmassen von 12 kDa, werden nur durch Numerierung (I, II, III) unterschieden, während ein 28 kDa-Protein mit hoher Aktivität im FbPase-Test als Thioredoxin *f* bezeichnet wurde.

Bei der Isolierung der Thioredoxine aus *S. obliquus* erwies sich die Kombination von Fällungsschritten mit ionenaustauschchromatographischen Methoden und Molekularsiebchromatographie für die Aufreinigung der Proteine als vorteilhaft und wurde in früheren Arbeiten etabliert (Wagner und Follmann, 1977; Wagner, 1978; Langlotz, 1986). Diese vor mehr als 10-20 Jahren angewandte Trennungsmethoden wurden am Beginn dieser Arbeit verifiziert und als erfolgreich bestätigt, allerdings mit heutigen hochauflösenden Chromatographiesystemen, die damals noch nicht verfügbar waren.

3.1.1 Trennung der verschiedenen Thioredoxine

Der grüne Rohextrakt aus der Zellmasse (ca. 200 ml) im Dauerlicht kultivierter Algen wird zunächst durch mehrere Fällungsschritte in Volumen und Proteingehalt reduziert. Hier bewährten sich Streptomycinsulfatfällung, Hitzefällung und Säurefällung. Durch die Streptomycinsulfatfällung werden saure Komponenten wie Nucleinsäuren, saure Proteine und Chlorophyll entfernt. Der Proteinextrakt ist danach chlorophyllfrei und klar. Anschließend rasche Erniedrigung des pH-Wertes

bis 4,3 und Abtrennung der säuredenaturierbaren Proteine führt noch einmal zu Reduktion der Proteinmenge ohne größere Einbußen an Aktivität. Da zur Detektion der Thioredoxine die Stimulation exogener Enzyme (MDH und FbPase aus Spinat) genutzt werden muss, ist eine Hitzefällung bei 60°C sinnvoll, um die endogenen Enzyme zu denaturieren. Als positiver Nebeneffekt tritt bei der Hitzefällung eine deutliche Verminderung des Proteingehaltes auf. Die endogenen unspezifischen Phosphatasen, die in den FbPase-Tests durch Substratabbau erheblich stören sind jedoch säure- und hitzestabil und können erst mittels chromatographische Methoden abgetrennt werden.

Eine Ankonzentrierung der Proteine erfolgt durch Ammoniumsulfatfällung. Es wird direkt eine 90 % -Sättigung vorgenommen, da wie bereits gezeigt (Wagner, 1978), man bei 0-40%, 40-80% und 80-96 % Sättigung in jeder Stufe Thioredoxinaktivität beobachtet und damit kein präparativer Vorteil einer fraktionierter Ammoniumsulfatfällung erzielt werden kann.

Die mit Ammoniumsulfat gefällten Proteine werden über eine Sephadex G-25-Säule entsalzt, der entsalzte rötliche Durchbruch wird auf eine DEAE-Cellulose-Säule aufgetragen und die eluierten Fraktionen mit FbPase und MDH getestet. Ein Elutionsprofil von der Säule zeigt Abb. 3.1.

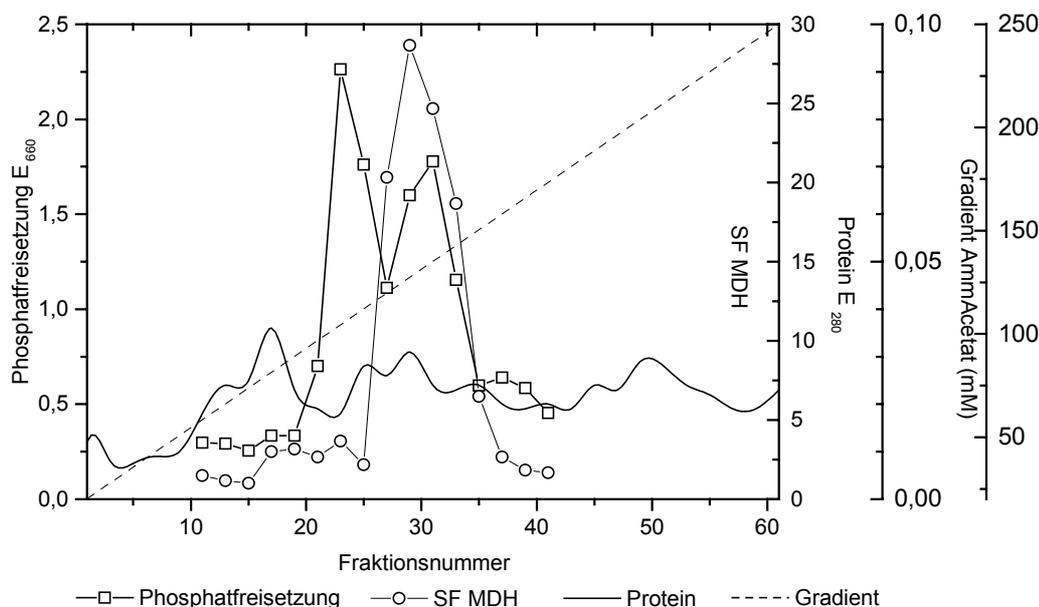


Abb. 3.1: Chromatographie auf DEAE-Cellulose; gezeigt sind: Proteinprofil E₂₈₀; Phosphatfreisetzung E₆₆₀; Stimulationsfaktor der MDH und Gradient der Ammoniumacetat-Konzentration (mM)

Ein großer Teil der Proteine wird im verwendeten 20 mM Ammoniumacetatpuffer bei pH 8,6 gar nicht an das Säulenmaterial gebunden, andere, wie das rote Cytochrom *f* (Cyt C₅₅₃) sowie das braune Ferredoxin binden sehr fest auf der Säule. Dazwischen ist ein Gradient von 20 bis 250 mM Ammoniumacetat geeignet, um die Thioredoxinspecies zu eluieren. Wie von P. Langlotz (1986) bereits beschrieben wurde, zeigt in diesem Fall der MDH-Test zwei Aktivitätspeaks, eine geringe Stimulation in Fr. 17-18 (eluiert bei 80 mM Ammoniumacetat) und eine starke Stimulation in den Fr. 27-34 (eluiert bei 130 mM Ammoniumacetat). Tests mit FbPase zeigen eine starke Stimulation in den Fr. 20-26 (eluiert bei 100 mM Ammoniumacetat) und einen weiteren, etwas schwächeren Aktivitätspeak in Fr. 27-34, der mit der Aktivität der MDH übereinstimmt.

Während die geringe Aktivität im MDH-Test in Fr. 17-18 vermutlich das Trx III darstellt, das hier nicht weiter untersucht wurde, ist der hohe Aktivitätspeak (Fr. 20-26) im FbPase-Test das Trx-*f*. Diese Species zeigt nur geringe Fähigkeit, Spinat-MDH zu stimulieren, hat jedoch eine gute Reaktivität mit Spinat-FbPase. Der Aktivitätspeak in den Fr. 27-34 ist eine nicht komplett aufgetrennte Mischung aus restlichem Trx-*f*, und den Thioredoxinen I und II, die beide Testenzyme stimulieren.

Die Fraktionen mit Trx-*f* (Fr. 20-26), sowie Trx *f*, I und II (Fr. 27-34) der DEAE-Cellulose-Chromatographie werden getrennt gegen gesättigte Ammoniumsulfatlösung dialysiert, gefällt und separat der weiteren Trennung auf Superdex-75 unterworfen. Die Molekularsiebchromatographie über Superdex-75 zeigt Abb. 3.2.

Die Chromatographie der Fraktionen 20-26 der DEAE-Cellulose auf Superdex-75 führt nicht zur Auftrennung in mehrere Peaks. Der einzelne Peak der FbPase-Aktivität (72-78 ml Elutionsvolumen) liegt im Molmassenbereich 28 kDa.

Die Chromatographie der Fraktionen 27-34 der DEAE-Cellulose-Chromatographie auf Superdex-75 führt dagegen zur Auftrennung in zwei diskrete Peaks (Abb. 3.3). Wie erwartet, wird hier Trx-*f* Aktivität im Molmassenbereich 28 kDa gefunden (72-78 ml), sowie Aktivität der Thioredoxine I+II im Molmassenbereich 12 kDa (84-90 ml Elutionsvolumen).

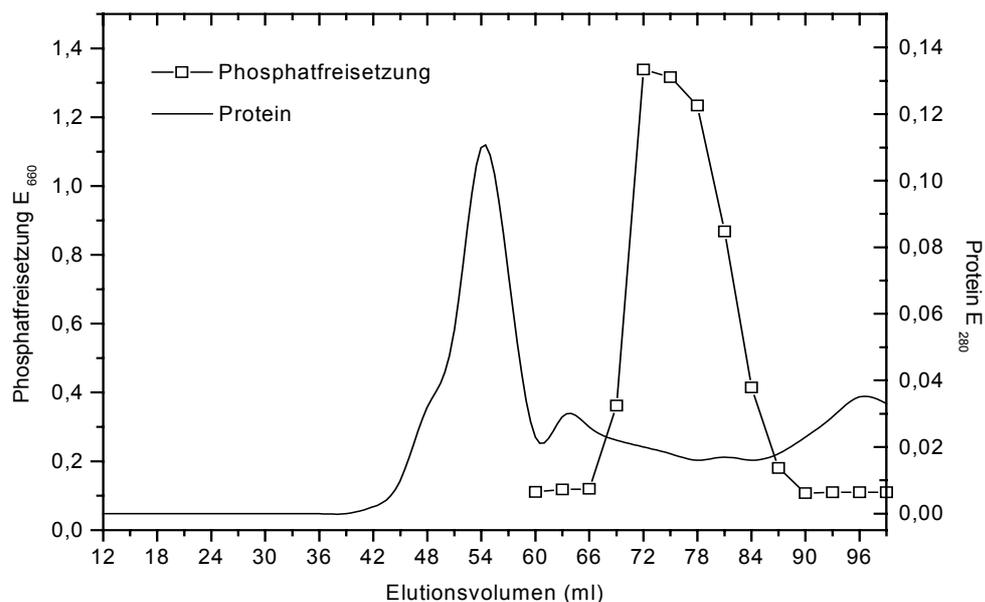


Abb. 3.2: FPLC-Chromatographie der Fraktionen 20-26 der DEAE-Cellulose-Chromatographie auf Superdex 75; Fraktionsgröße 3 ml; gezeigt sind Phosphatfreisetzung E₆₆₀; Proteinprofil E₂₈₀

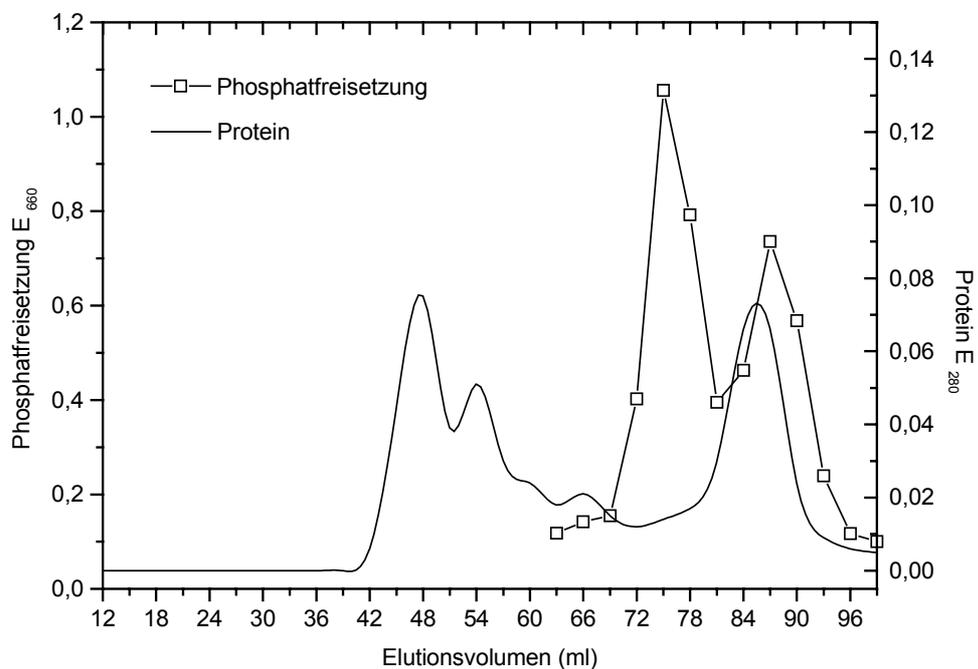


Abb. 3.3: FPLC-Chromatographie der Fraktionen 27-34 der DEAE-Cellulose-Chromatographie auf Superdex G-75; Fraktionsgröße 3 ml; gezeigt sind Phosphatfreisetzung E₆₆₀; Proteinprofil E₂₈₀

Über Thioredoxine wird berichtet, dass sie bei Oxidation über intermolekulare Disulfidbrücken zur Bildung von Dimeren neigen und so mehrere Proteine vortäuschen obwohl es sich nur um eine Species handelt (Hermann und Moore, 1973). Um diesem Verhalten der Thioredoxine vorzubeugen und Chromatographie eindeutiger zu gestalten, wurde die Proteinlösung vor dem Auftragen auf die Säule mit 10 mM DTT behandelt und das Säulenbett mit mindestens einem Säulenvolumen Puffer gespült, dem 5 mM Mercaptoethanol zugesetzt wurde. Damit ist sicher, dass die beiden Elutionspeaks in Abb. 3.3 nicht auf Dimerenbildung beruhen.

In einem weiteren Schritt zur Reinigung des Thioredoxin des ersten Peaks bei 72-78 ml der Superdex-75 durch FPLC auf dem Anionenaustauscher Resource-Q ergibt sich nur ein einzelner Aktivitätspeak des 28 kDa-Trx *f* bei 190 mM des NaCl-Gradienten (Abb. 3.4). Die Fraktionen 82-90 ml Elutionsvolumen der Superdex-75-Gelchromatographie im Molmassenbereich 12 kDa (Trx I und II) sind ebenfalls in der Lage FbPase zu stimulieren, aber in geringerem Ausmaß.

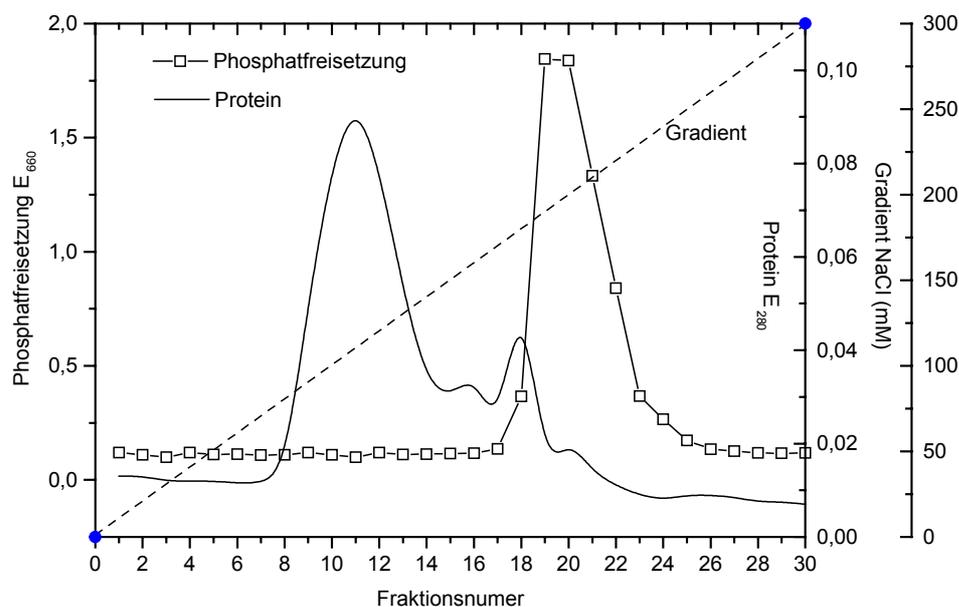


Abb. 3.4: Chromatographie auf Resource-Q; Fraktionsgröße 1 ml, Aufgetragen sind Fraktionen 72-78 ml der Superdex-75 Chromatographie; gezeigt sind: Phosphatfreisetzung E₆₆₀ im FbPase-Test; Proteinprofil E₂₈₀ und NaCl -Gradient

Die Aktivität dieser Fraktionen zerfällt bei der Trennung auf Resource-Q in zwei diskrete Peaks, mit hohen Aktivität beim Salzgradienten von 70 mM und wesentlich niedrigeren bei 110 mM NaCl (Abb. 3.5).

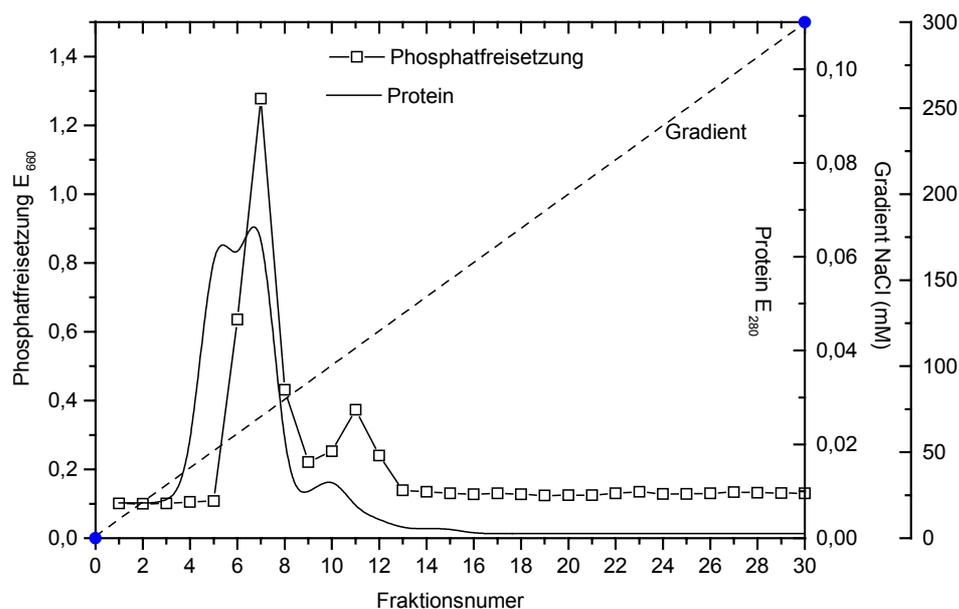


Abb. 3.5: Chromatographie auf Resource-Q; Fraktionsgröße 1 ml, Aufgetragen sind Fraktionen 84-90 ml der Superdex-75 Chromatographie; gezeigt sind: Phosphatfreisetzung E₆₆₀ im FbPase-Test; Proteinprofil E₂₈₀ und NaCl -Gradient

An dieser Stelle wurde auf eine weitere Chromatographie auf dem Kationenaustauscher CM-Cellulose zur Zuordnung der beiden Aktivitätspeaks zu Thioredoxin I bzw. II, wie von P. Langlotz (1986) beschrieben, verzichtet, da die Identität dieser Proteine als „normale“ Thioredoxine feststeht.

3.1.2 Reinigung des 28 kDa-Trx *f* für die Sequenzierung

Durch Verwendung der unter 3.1.1. beschriebenen Kombination von Reinigungsschritten gelingt es nicht, das 28 kDa-Trx *f*, das im Mittelpunkt des Interesses stand, bis zu genügender Reinheit für eine Sequenzierung mittels Edman-Abbau zu reinigen. Erst mit Hilfe der FPLC auf dem Material Uno-Q-6 von Bio-Rad konnte ein entsprechend hoher Reinheitsgrad erzielt werden. Dazu musste allerdings der Trennungsgang insgesamt modifiziert werden.

Mit schnellen FPLC-Methoden ist es wesentlich günstiger als ersten Schritt nach Ammoniumsulfatfällung eine Molekularsiebchromatographie auf Superdex-75 vorzunehmen und erst dann eine Ionenaustauschchromatographie auf Uno-Q-6 statt DEAE-Cellulose anzuschließen. Da die Trennungseigenschaften des Superdex-75-Materials für diesen Zweck optimal sind, kann man in einem Schritt die

Probe von restlichem Ammoniumsulfat befreien, endogene Phosphatasen abtrennen (diese sind wesentlich größer und eluieren zuerst von der Säule) und das große Trx-*f* von den Thioredoxinen der regulären Molmasse fraktionieren. Das Elutionsprofil eines FPLC-Laufs auf Superdex-75 direkt nach der Ammoniumsulfatfällung ist im FbPase-Test in Abb. 3.6 gezeigt.

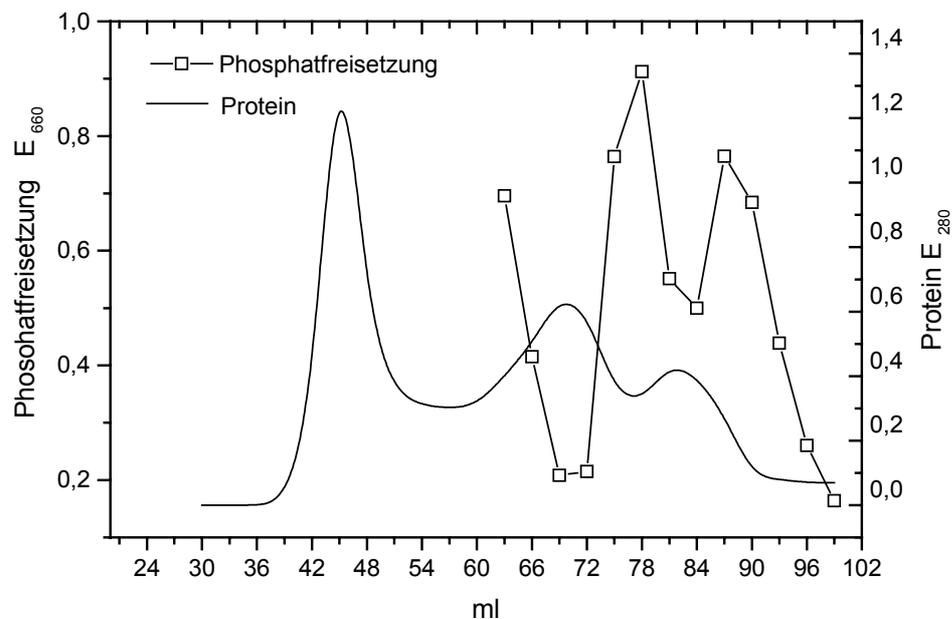


Abb. 3.6: FPLC-Chromatographie auf Superdex 75 nach der Ammoniumsulfatfällung; Fraktionsgröße 3 ml

Da nicht alle Fraktionen des Durchbruchs getestet wurden, sieht man nur den absteigenden Ast (60-69 ml) der Aktivität der unspezifischen Phosphatasen. Solche Fraktionen mit unspezifischer Phosphatase-Aktivität sind leicht zu detektieren, weil man auch ohne Zusatz von Spinat-FbPase zum Testansatz hohe Phosphatfreisetzung in diesen Fraktionen beobachtet. Die Fraktionen mit 72-78 ml und 84-90 ml Elutionsvolumen beinhalten die Aktivitäten des 28 kDa-Trx *f* bzw. der Thioredoxine mit 12 kDa Molmasse. Diese Fraktionen werden getrennt von einander gepoolt und weiterverarbeitet oder mit Ammoniumsulfat gefällt und aufbewahrt. Die Fraktionen 72-78 ml werden über Nacht gegen den Puffer der anschließenden Anionenaustauschchromatographie auf Uno-Q-6 dialysiert, mit DTT reduziert und auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgt durch einen Ammoniumacetatgradienten von 20 bis 300 mM. Das Elutionsprofil der Uno-Q-6-Säule zeigt Abb. 3.7. Fraktion 10, die bei 100 mM Ammoniumacetat eluiert, hat eine hohe FbPase-Stimulation und zeigt

auf der SDS-PAGE eine deutliche starke Bande im Molmassenbereich 28 kDa (Abb. 3.8).

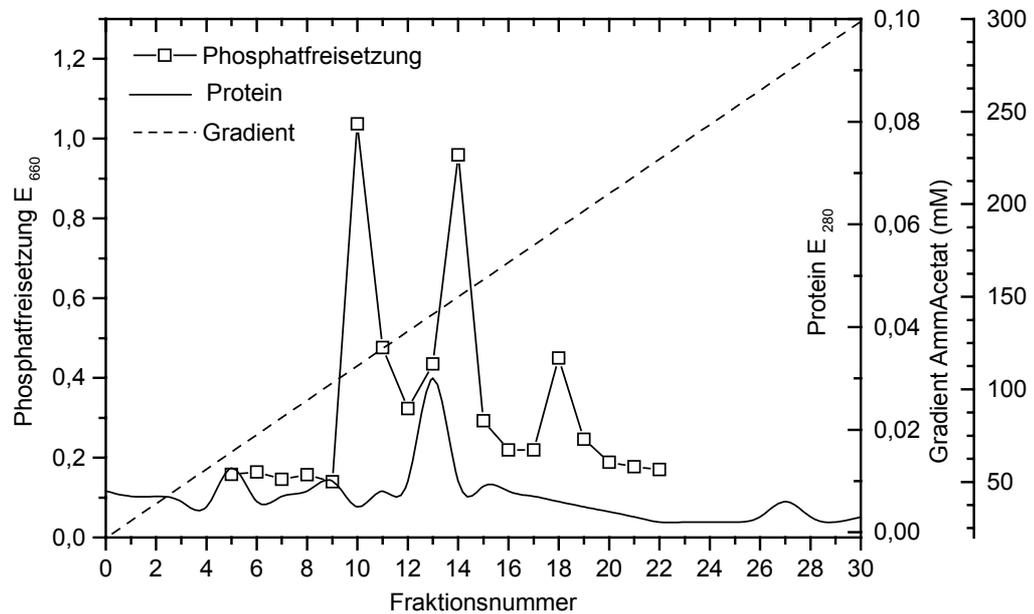


Abb. 3.7: FPLC auf Uno-Q-6 der Fraktionen 72-78 ml der Superdex-75 Chromatographie; Fraktionsgröße 3 ml; gezeigt sind Phosphatfreisetzung E₆₆₀; Proteinprofil E₂₈₀

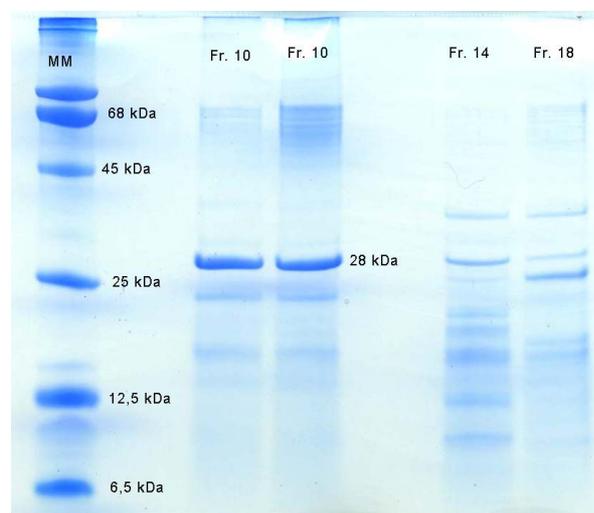


Abb. 3.8: SDS-PAGE der Fraktionen der Uno-Q-6; links nach rechts: Marker (BSA, Ovalbumin, Chymotrypsinogen, Cytochrom C, Aprotinin), Fr. 10 behandelt mit Iodacetat, Fr. 10 beh. mit Iodacetamid, Fr. 14, Fr. 18 (Fr. 10 ohne Iodacetat-Behandlung zeigt genau dasselbe Laufverhalten)

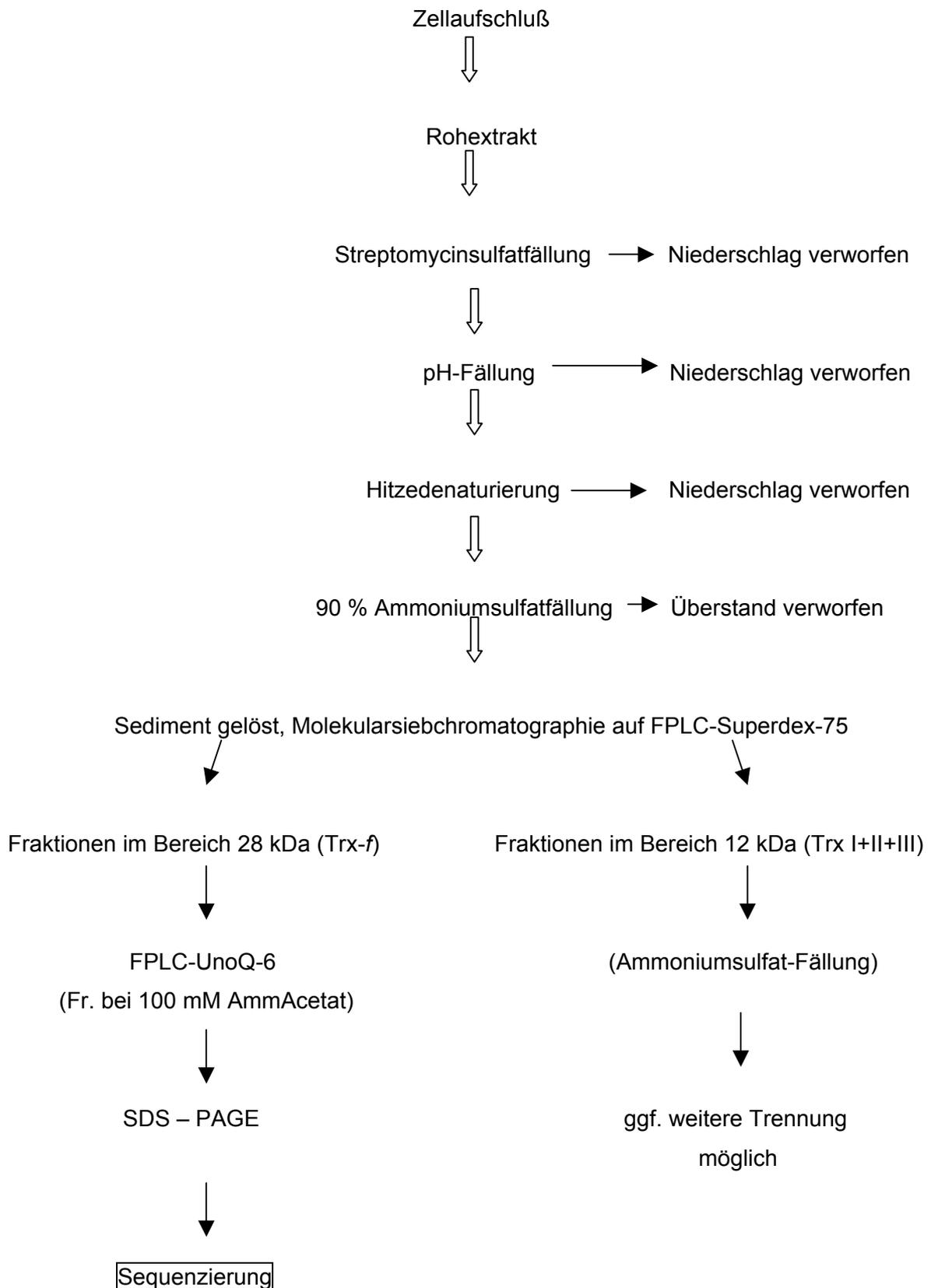
Die Proteine aus Fr. 10 wurden nach der SDS-PAGE einem elektrophoretischen Blotting auf PVDF-Membran unterzogen, die Bande im relevanten Molmassenbereich ausgeschnitten und zum Sequenzieren eingesetzt. Die deutlich getrennten Fraktionen 14 und 18 zeigten ebenfalls eine FbPase-Stimulation. Auf der SDS-PAGE beobachtet man noch schwache Proteinbanden im Molmassenbereich 28 kDa, auch sind Proteinbanden im Molmassenbereich 12 kDa zusehen. Ob es sich um eine Überlagerung der Aktivitäten des restlichen, nacheluierenden 28 kDa-Trx *f* mit den Aktivitäten der Thioredoxine der normalen Größe handelt, die auf der Superdex-75 nicht vollständig abgetrennt wurden, ist unklar. Es sind auch Proteine ganz anderer Natur beschrieben die FbPase aktivieren. Diese Fraktionen wurden nicht weiter untersucht. Die Reinigungsbilanz von 28 kDa-Trx *f*, bestimmt durch Stimulierung der redoxabhängigen Spinat-FbPase (Testbedingungen wie in Kap. 2.6.1) ist in Tabelle 3.1 dargestellt.

	Protein mg/ml	Volumen ml	mg Protein Gesamt	μmol $\text{PO}_4/\text{mg}\cdot\text{min}$	$\mu\text{mol PO}_4/\text{min}$ Gesamt
Rohextrakt	2,55	170	433	(**)	(**)
nach Streptomycin- Sulfatfällung	1,75	198	346	(**)	(**)
nach pH-Fällung	1,4	195	273	(**)	(**)
nach Hitze-Fällung	0,39	187	72,9	(**)	(**)
Superdex-75 (Fr. 72-78 ml)	0,35	6	2,1	0,66	1,39
Uno-Q-6 (Fr.10)	0,006 ^(*)	4	0,024 ^(*)	16,3	0,39

Tab. 3.1: Reinigungsbilanz von Thioredoxin *f*; Ausgangsmaterial: 15 g Algen (Feuchtwicht); (*) – Messung erfolgte optisch (E₂₈₀-E₃₁₀); (**) – Messung unmöglich, weil der FbPase-Test durch unspezifische Phosphatasen gestört wird.

Man erhält 24 μg Protein, was 0,86 nmol entspricht. Diese Stoffmenge ist ausreichend um nach der anschließenden Alkylierung der Cysteinreste im Protein und Trennung auf der SDS-PAGE Sequenzierungsarbeiten durchzuführen.

Einen Überblick über die Reinigung der Thioredoxine aus *S. obliquus* nach dem abgekürzten Reinigungsgang gibt das folgende Schema:



3.1.3 Präparation des *OEE*-Proteins (28 kDa-Trx *f*) aus *S. obliquus*

Nach der erfolgreichen Ansequenzierung des aus dem säure- und hitzebehandelten Rohhomogenat der *Scenedesmus*-Alge isolierten 28 kDa-„Trx *f*“ (Kap. 3.2), wurde ein erster Hinweis erhalten, dass es sich um ein *oxygen evolving enhancer protein* (*OEE*-Protein 1) aus dem Photosystem II handelt. Da das *OEE*-Protein aus Spinat bereits vor Jahrzehnten isoliert und charakterisiert wurde, stellte sich die Aufgabe dieses Protein aus *Scenedesmus* auf eine analoge Weise zu Isolieren um es mit dem als Trx-*f* gereinigtem Protein direkt zu vergleichen. So wurden einige Publikationen gefunden, in denen ein Reinigungsschema für das sogenannte *periferal 33-kDa protein* aus Spinat (später als *OEE* Protein1 bezeichnet) mittels Butanolextraktion des Proteins aus Thylakoidmembranen vorgeschlagen wird. Als Grundlage für eine Aufreinigung des *OEE*-Proteins aus der Alge *S. obliquus* wurde die von Yamamoto *et al.* (1986) für Spinat-*OEE* Protein entwickelte Methode verwendet.

In der vorgeschlagenen Reinigung wird allerdings von isolierten Spinat-Chloroplasten ausgegangen. Da Chloroplasten aus einzelligen Grünalgen im allgemeinen nicht isoliert werden können (mit Ausnahme der zellwandfreien *Chlamydomonas reinhardtii* Mutante CW-15, Mendiola-Morgenthaler *et al.*, 1985), musste die Methode entsprechend verändert werden. Statt der Chloroplastenpräparation wurde ein Totalaufschluß der Algenzellen vorgenommen und mit dem Rohhomogenat verfahren wie in Kap. 2.4 beschrieben. Die in der wässrigen Phase der Butanolextraktion zum Schluss erhaltene hydrophile Proteinfraction wird einer Anionenaustauschchromatographie auf Uno-Q-6 in 25 mM MES Puffer, pH 6,5, NaCl-Gradient von 0 bis 0,5 M, unterzogen. Das Elutionsprofil der UnoQ-6 Säule zeigt im FbPase Test zwischen 60 und 340 mM NaCl zwei breite Aktivitätspeaks (Abb. 3.9).

Um zu überprüfen, ob die Aktivität des auf diese Weise isolierten Proteins einer definierten Molmasse zuzuordnen ist, wurde in einer anderen Präparation die untere wässrige Phase nach der Butanolbehandlung einer 80%- Ammoniumsulfatfällung und anschließenden Molekularsiebchromatographie an Superdex-75 unterzogen. Diese wurde im 25 mM MES Puffer pH 6,5 unter Zugabe von 100 mM NaCl und 5 mM Mercaptoethanol durchgeführt. Die Proteine im gelösten Pellet der

Ammoniumsulfatfällung wurden wie zuvor vor dem Auftrag auf die Säule mit 10 mM DTT behandelt.

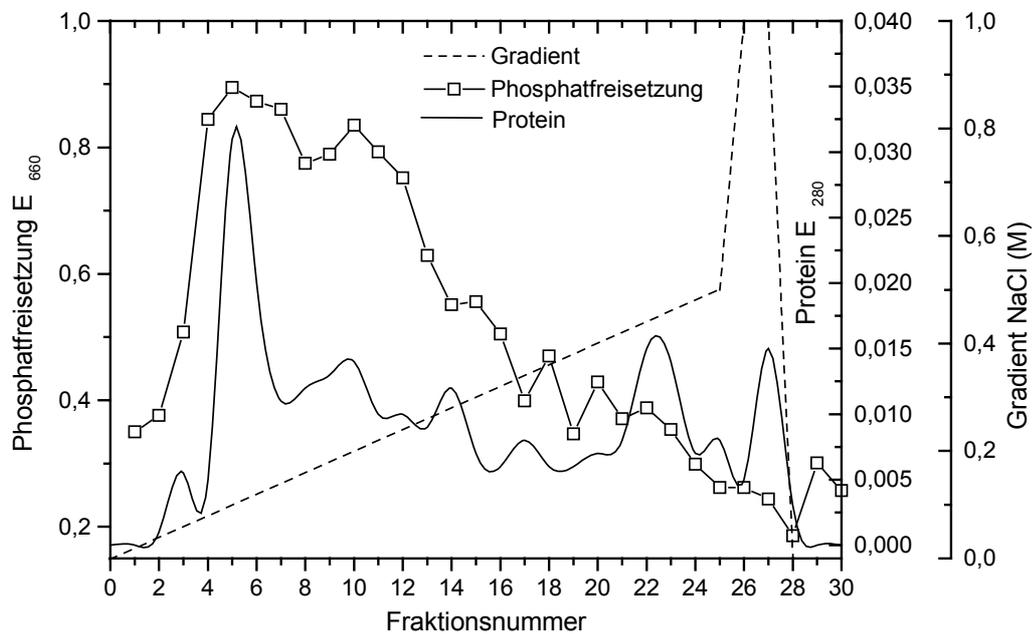


Abb. 3.9: FPLC der mit Butanol behandelten Proteine der Thylakoidmembranensuspension auf UnoQ-6 in 25 mM MES Puffer, pH 6,5; 4ml/Fraktion

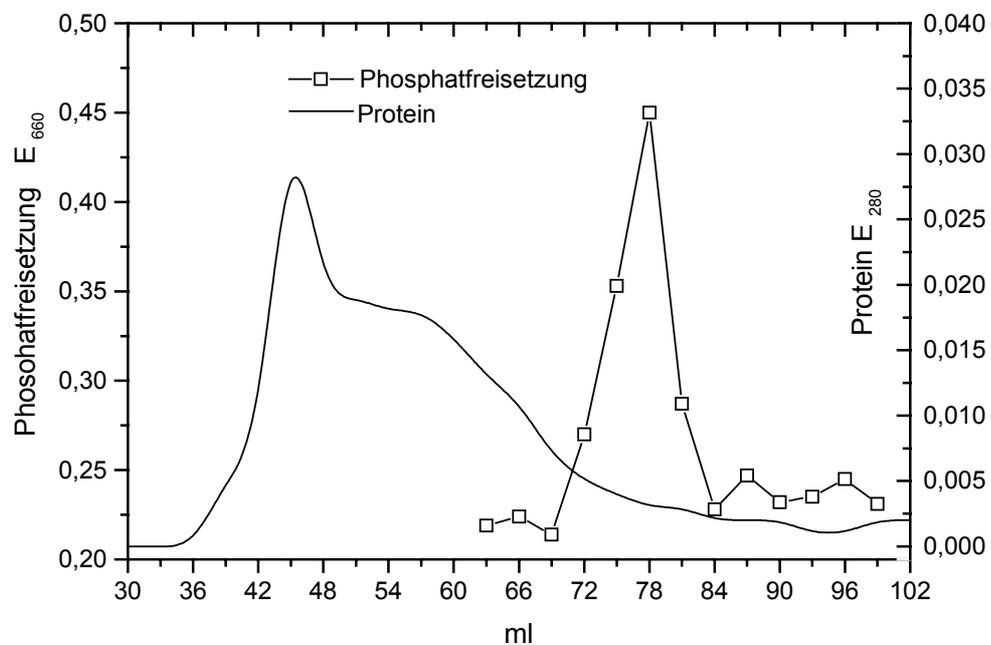


Abb. 3.10: FPLC der mit Butanol behandelten Proteine der Thylakoidmembranen-Suspension auf Superdex 75; 3ml/Fraktion

Im FbPase-Test zeigten die eluierten Fraktionen lediglich einen Aktivitätspeak, der laut Eichung der Säule (Abb. 2.3) der Molmasse um 28 kDa zuzuordnen ist (Abb. 3.10). Die unspezifischen Phosphatasen, die bei der konventionellen Reinigungsmethode für Trx-*f* im späteren Durchbruch eluierten und bei der Detektion der Trx-*f*-Aktivität störten, sowie die Thioredoxine mit regulärer Molmasse, die auch in der Lage sind das Testenzym FbPase zu stimulieren, traten bei dieser Aufreinigungsmethode nicht mehr auf, da hier nur die Thylakoidmembranfragmente weiterverarbeitet wurden. Die genannten Proteine befanden sich im Überstand und konnten somit schon bei der ersten Zentrifugation (bei 12000 g) abgetrennt werden. Durch Anwendung dieser Methode konnte also gezeigt werden, dass das ursprünglich in *S. obliquus* als 28 kDa-Trx *f* beschriebene und bei der Sequenzierung als *OEE* identifizierte Protein sowohl im Rohhomogenat, als auch im grünen Pellet der ersten Zentrifugation vorhanden ist. Die Ausbeute an dem *OEE* Protein konnte durch Extraktion mit Butanol aus den Thylakoidmembranfragmenten gesteigert werden (Tab 3.2). Als präparativer Schritt ist die Ammoniumsulfatfällung direkt nach der Butanolbehandlung jedoch nicht zu empfehlen, da sich bei der anschließenden Zentrifugation der mit Butanol und Ammoniumsulfat gesättigten Lösung in der oberen Phase eine etwa 1 bis 2 mm dicke fettartige Schicht aus restlichem Butanol und ausgefallenen Proteinen bildet, was das restlose Entfernen des Ammoniumsulfatüberstandes erschwert.

3.1.4 Vereinfachte Methode der Aufreinigung des *OEE*-Proteins aus *S. obliquus*

Aktivitätspeaks wie in Abb. 3.9 die über mehr als 10-15 Fraktionen verteilt sind, sind für die Feinreinigung eines Proteins nicht vorteilhaft, da mit Sicherheit viele andere Proteine in einem solch breiten Bereich eluieren. Deshalb wurde für eine bessere Reinigung des *OEE*-Proteins auf die konventionelle Ionenaustauschchromatographie auf UnoQ-6 im Ammoniumacetatpuffer bei pH 8,6 zurückgegriffen, aber als entscheidende Schritte die Präparation der Thylakoidmembranfragmente und deren Butanolbehandlung, die der Abtrennung des hydrophilen *OEE*-Proteins von den hydrophoben Membranproteinen der PS II Partikeln dient, übernommen. Auf die Behandlung der Suspension mit Triton X-100 sowie die Behandlung mit 1 M NaCl wurde verzichtet, was die Aufreinigung deutlich vereinfachte.

Die vereinfachte Aufreinigung des *OEE*-Proteins geschieht zunächst so wie in Kap. 2.4 beschrieben. Nach der ersten Zentrifugation bei 700 g wird der dunkelgrüne Überstand wiederholt 20 Minuten bei 35000 g zentrifugiert. Der klare aber immer noch grüne Überstand wird dekantiert und die obere dunkelgrüne Schicht des Pellets in Puffer A resuspendiert. Die Suspension wird nach 10 min Rühren in der Kälte wiederholt 20 Minuten zentrifugiert bei 35000 g. Das erneut gebildete dunkelgrüne Pellet wird statt Puffer A in 20 mM Ammoniumacetat-Puffer pH 8,6 aufgenommen, 10 min gerührt und zentrifugiert (20 Minuten bei 35000 g). Der Überstand der Zentrifugation wird vorsichtig, da das Pellet in Ammoniumacetatpuffer halbflüssig ist, abgesaugt. Das dunkelgrüne Pellet wird wieder in 50 ml desselben Puffers aufgenommen und mit 50 ml n-Butanol geschüttelt. Die untere wässrige Phase wird auf die Uno-Q-6 Säule, die vorher mit 20 mM Ammoniumacetatpuffer pH 8,6 equilibriert wurde, aufgetragen. Nach der Elution von der Säule in einem Gradienten von 20 mM bis 300 mM Ammoniumacetat pH 8,6 ergibt sich nur ein schmaler Aktivitätspeak zwischen 80 und 100 mM Ammoniumacetat (Abb. 3.11).

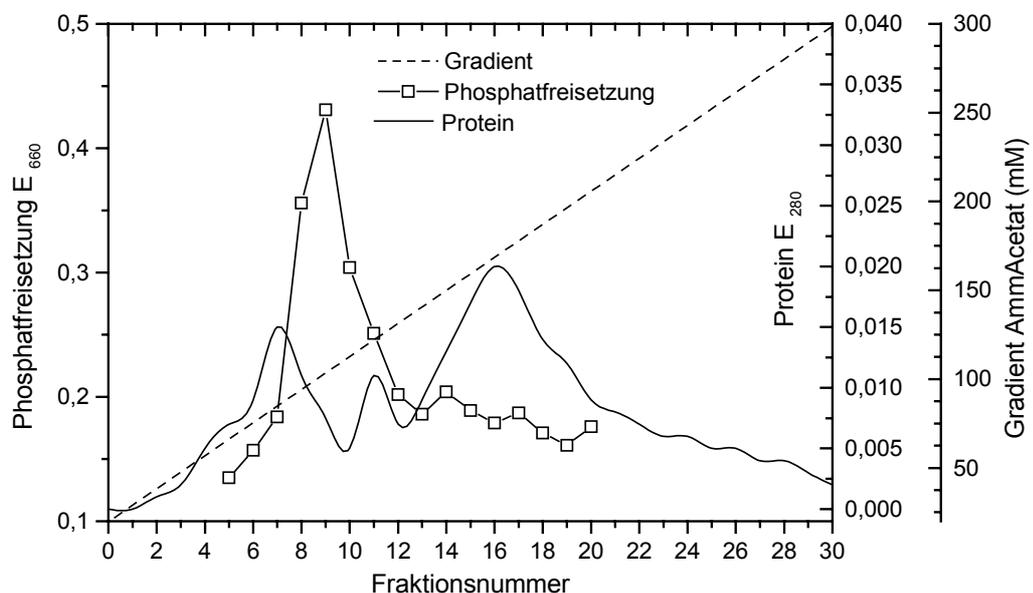


Abb. 3.11: FPLC der mit Butanol behandelten Proteine der Thylakoidmembranensuspension auf UnoQ-6 in Ammoniumacetatpuffer, pH 8,6; 4ml/Fraktion

Die Fraktion 9 mit der maximalen FbPase-Stimulation sowie Fraktion 10 zeigten auf der SDS-PAGE im Molmassenbereich von 28 kDa eine starke Proteinbande deren Reinheit auf über 90 % geschätzt wird (Abb. 3.12).

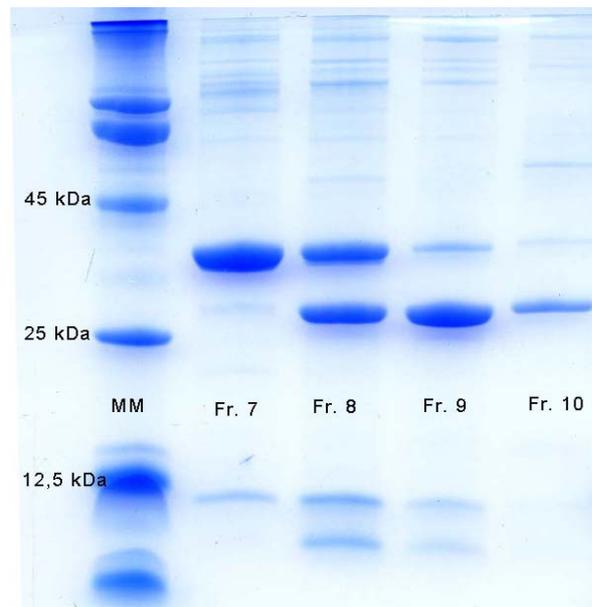


Abb. 3.12: SDS-PAGE der Fraktionen der Uno-Q-6-Chromatographie nach Butanolbehandlung; links nach rechts: Marker (BSA, Ovalbumin, Chymotrypsinogen, Cytochrom C, Aprotinin); aufgetragen Fr. 7, 8, 9, 10, jeweils 1 ml Probe.

Die Reinigungsbilanz des aus den Thylakoidmembranfragmenten isolierten *OEE*-Proteins (28 kDa-Trx *f*), ist in Tabelle 3.2 dargestellt. Durch die Kombination der Butanolextraktion des *OEE*-Proteins aus den Thylakoidmembranfragmenten mit der konventionellen Ionenaustausch-Chromatographie auf Uno-Q-6 im Ammoniumacetatpuffer bei pH 8,6 und Verzicht auf mehrere zeitaufwendige Schritte wie Ammoniumsulfatfällung, Molekularsiebchromatographie auf Superdex-75 und Dialyse, konnte eine schnelle, innerhalb eines Tages durchführbare Präparation des *OEE*-Proteins aus gefrorenen *Scenedesmus*-Algen bis zu annähernder Homogenität entwickelt werden.

Die Ausbeute an gereinigtem Protein ist fast dreimal größer als bei den Daten in Tab. 3.1.

Tab. 3.2: Reinigungsbilanz des *OEE*-Proteins (28 kDa-Trx *f*) aus *Scenedesmus* bei einer Präparation aus Thylakoidmembranfragmenten; Ausgangsmaterial: 8,5 g Algen Feuchtgewicht; (*) – Messung erfolgte optisch (E₂₈₀-E₃₁₀); (**) – Messung unmöglich, weil der FbPase-Test durch unspezifische Phosphatase gestört wird.

	Protein mg/ml	Volumen ml	mg Protein Gesamt	μmolPO ₄ / mg*min	μmolPO ₄ /min Gesamt
Rohhomogenat	1,85	122	226	(**)	(**)
Überstand (Zentrifugation bei 35000g)	1,64	114	187	(**)	(**)
1. Waschgang (Überstand)	0,133	85	11,3		
2. Waschgang (in AmmAcet- Puffer; Überstand)	0,228	52	11,8		
wässrige Phase nach Butanolbeh.	0,072	50	3,6	0,19	0,69
Uno-Q-6 (Fr.9)	0,009 ^(*)	4	0,036 ^(*)	4,74	0,17

3.2 Sequenzierung des *OEE*-Proteins (28 kDa-Trx *f*) aus *S. obliquus*

Proben von Trx-*f*, die elektrophoretisch getrennt und auf Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) geblottet worden waren, wurden direkt der Aminosäuresequenzierung durch Edman-Abbau unterworfen. So wurden Proteinmengen von etwa 200 pmol analysiert.

Als N-terminale Aminosäuresequenz wurde folgende Sequenz identifiziert: ISYDDLQGLTYLQVKGSGL.

Laut Ergebnis der Sequenz-basierten FASTA-Suche in Protein- und Gen-Datenbanken zeigte diese Sequenz 73 % und 68 % Homologie zu den *OEE*-Proteinen aus den Grünalgen *Volvox carteri* und *Chlamydomonas reinhardtii*. Damit wurde sofort, wenn auch unerwartet klar, dass das isolierte Protein nicht zur Thioredoxin-Superfamilie gehört. Allerdings war angesichts der Thioredoxinaktivität noch nicht auszuschließen, dass es sich um ein Fusionsprotein aus *OEE*-N-

Terminussequenzen und C-terminalen Thioredoxinsequenzen handeln konnte, so dass eine Sequenzierung interner Peptidsequenzen anzustreben war. Dazu wurden Proben einer tryptischen Spaltung (an Arginin- und Lysinresten) und HPLC-Trennung der Peptide unterworfen.

Deren Sequenzierung ergab folgende Aminosäuresequenzen: GGETEFVK; LTYTLDAMS; VPFLFTVK; GTLDAFGGEFVPSYR; GSAVFSVAK; VDAATGEIAGVFESIQPSDTDLGAK; ITGLWYAR und die ein Cystein enthaltende Sequenz GSGLANTCPVLESGSTNLK. Auch diese 8 identifizierten Peptide zeigten hohe Ähnlichkeit (68-100 %) zu dem *oxygen-evolving enhancer protein 1* aus Algen (Tab 3.3). Die Ähnlichkeit zu Spinat-OEE-Protein ist geringer und beträgt 52 bis 87 %, zwei Peptide zeigten gar keine Homologie zu Spinat.

Tab. 3.3: Homologie der identifizierten Peptidfragmenten zu einigen bekannten OEE-Protein-1-Sequenzen:

Peptidfragment	Anzahl Aminosäuren	Homologie zu <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	Homologie zu <i>Volvox carteri</i>	Homologie zu <i>Spinacia oleracea</i>
ISYDDLQGLTYLQVKG SGL	19	68,42% in 19 AS	73,68% in 19 AS	55,56% in 18 AS
GSGLANTCPVLESGST NLK	19	89,47% in 19 AS	77,77% in 18 AS	57,14% in 14 AS
GGETEFVK	8	100% in 8 AS	100% in 8 AS	keine
LTYTLDAMS	9	100% in 9 AS	100% in 9 AS	75% in 8 AS
VPFLFTVK	8	75% in 8 AS	75% in 8 AS	87,5% in 8 AS
GTLDAFGGEFVPSYR	16	68,75% in 16 AS	75% in 16 AS	52,25% in 16 AS
GSAVFSVAK	9	100% in 9 AS	100% in 9 AS	keine
VDAATGEIAGVFESIQP SDTDLGAK	25	92% in 25 AS	92% in 25 AS	80,95% in 21 AS
ITGLWYAR	9	75% in 8 AS	75% in 8 AS	62,5% in 8 AS

Zwei zusätzliche Sequenzen: LTLYTAGMEFTXPXY mit Homologie zu einem *hypothetical protein* PA1270 aus *Pseudomonas aeruginosa* und FGMEFTXPXY mit Homologie zu *hypothetical protein* Q09956 mit 42.2 kDa Molmasse aus *Caenorhabditis elegans*, können mit hoher Wahrscheinlichkeit als Verunreinigung betrachtet werden.

Die 9 identifizierten Peptide sind gleichmäßig über die gesamte Länge des Protein verteilt und repräsentieren die Hälfte des 28 kDa-Trx *f* aus *S. obliquus*, welches nach einer Aminosäureanalyse aus 241 Aminosäuren besteht (P. Langlotz, 1986).

Da ein Protein mit Thioredoxin-Aktivität (mindestens) 2 Cysteinreste bzw. eine Disulfidbrücke besitzen muss und die Aminosäureanalyse (Langlotz, 1986) diese auch anzeigt, wurden umfangreiche Bemühungen zur Identifizierung von Cysteinen in der Sequenz unternommen. Dazu wurden Proben mit Iodessigsäure und Iodacetamid an den vermuteten –SH-Gruppen unter verschiedenen Bedingungen zu –S-CH₂-CO-R (R=O⁻ bzw. –NH₂) carboxymethyliert. Der Nachweis von Cystein ist jedoch nur in einem Peptid gelungen: GSGLANTCPVLESGSTNLK. Dies ist eindeutig Teil einer *OEE*-Sequenz und kein Trx-Zentrum (-CGPC-). Ein zweites Cys-haltiges Peptid war nicht zu finden, obwohl das *OEE*-Protein vor und hinter dem zweiten Cysteinrest Trypsinspaltstellen besitzt. Die Modifizierung von Cysteinen kann bekanntermaßen Probleme bereiten; alternative Derivatisierungen wurden jedoch nicht angewandt, weil die verwendete Sequenzierungsanlage auf Carboxymethyl-Cystein programmiert war.

In der Tab. 3.4 werden die vollständigen Sequenzen der *OEE*-Proteine aus *Ch. reinhardtii*, *V. carteri*, *Spinacia oleracia* und *Anabaena sp.* PCC 7120 mit den identifizierten Sequenzen aus *S. obliquus* verglichen. Sequenzbereiche, die die Aminosäure Cystein enthalten, sind bei allen *OEE*-Proteinen stark konserviert.

In Tab. 3.5 wird die Aminosäurezusammensetzung der *OEE*-Proteine mit der Zusammensetzung der Thioredoxine aus Spinat und dem großen 26 kDa-Trx *f* aus *Anabena sp.* verglichen.

Obwohl die Sequenz des Trx-*f* / *OEE* nur zur Hälfte festgestellt werden konnte, kann die Identität des ursprünglich als Thioredoxin bezeichneten Chloroplastenproteins aus *S. obliquus* mit dem PSII-Protein *OEE* als bewiesen gelten. Insbesondere die Homologie von 70-100 % zu den anderen Algen-*OEE*-Proteinen (Tab. 3.3) lässt keinen Raum mehr für andere hypothetische Deutungen (etwa eine Thioredoxin-Domäne zwischen den noch nicht sequenzierten Positionen 150-190). Angesichts dieser Tatsache, und da uns die Sequenzierungskapazität der GBF Braunschweig nur begrenzt zur Verfügung stand, wurden Abbauversuche mit anderen (z.B. Aspartat-spezifischen) Endopeptidasen die zu anderen, überlappenden Fragmenten geführt hätten, nicht mehr in Angriff genommen.

Tab. 3.4: Sequenzvergleich der OEE-Proteine aus *C. reinhardtii*, *V. carteri*, *S. oleracea* und *Anabaena sp.* PCC 7120 mit den identifizierten Sequenzen aus *S. obliquus*. Aminosäuresequenzen sind ohne Chloroplasten-Transitsequenz aufgeführt, stark konservierte Bereiche sind grau hinterlegt, Cysteine gelb, *S. obliquus*-Sequenzen sind hervorgehoben. Mit XXX bezeichnete Positionen sind noch nicht analysierte Reste der *S. obliquus*-Sequenz (unter der Annahme, dass keine Insertionen oder Deletionen vorliegen).

<i>S. obliquus</i>	----- ISYDDLQGL --- TYLQVKGSLANTCPVL - E-S-GSTNLK XXXXXXXXXXXXXXXXXX	
<i>C. reinhardtii</i>	-----TFDEIQGL---TYLQVKGSGIANTCPVL-E-S-GTTNLKELKAGSYKLENF	
<i>V. carteri</i>	-----TYDELQGL---TYLQVKGGTGIANTCPVL-E--KGSTDLSELSAGTYKLENF	
<i>S. oleracea</i>	EGGKRLTYDEIQ-SK-TYLEVKGTTANQ CPTV -E---GGVDSFAFKPGKYTAKKF	
<i>Anabaena (7120)</i>	--RDILTY-E-Q-IRGTGL----- ANKCPQLTETS RGSIPLDSSKS--YVLKEL	
<i>S. obliquus</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX GGETEFVK XXXXXXXX LYTLDAMS XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX	
<i>C. reinhardtii</i>	C IEPTSFTVKEESQFKGG E TEFVKTKLMTRLTYTLDAMSGSFKVGS D GSAELKEDD	
<i>V. carteri</i>	C IEPTSFTVKEESVFKGG E TEFVKTKLMTRLTYTLDAMSGTLKVGSDGSAELKEED	
<i>S. oleracea</i>	C LEPTKFAVKAEGISKNSGPDFQNTKLMTRLTYTLDEIEGPFVSSDGT V KFEEKD	
<i>Anabaena (7120)</i>	C LEPTNFFVKEEPANKRQTAEFVAGKLLTRYTSTIDQVSGDLKFNDSSSLTFVEKD	
<i>S. obliquus</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX VPFLFTVK -----XXXX XG --- TLDAFGGEFV VPSYRXXXX	
<i>C. reinhardtii</i>	GIDYAATTVQLPGGERVAFLFTIK-----QFDGKG---TLDGIKGDFLVPSYRGSSF	
<i>V. carteri</i>	GIDYAATTVQLPGGERVAFLFTIK-----QFDGKG---TLDNIKGDVFPVPSYRGSSF	
<i>S. oleracea</i>	GIDYAAVTVQLPGGERVPFLFTIK-----QLVASG---KPESFSGDFLVPVPSYRGSSF	
<i>Anabaena (7120)</i>	GLDFQAITVQLPGGERVPFLFTIKNVAQTQ P GLSSLNTSTDFEGTFKVPVPSYRGS A F	
<i>S. obliquus</i>	XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX--XXXXXXXXXXXXXXXXXXXX GSAVFSVAKVDAATG	
<i>C. reinhardtii</i>	LDPKGRGGSTGYDNAVALPA--RADA E LLKENVK I TKALKGSAVFSVAKVDPV T G	
<i>V. carteri</i>	LDPKGRGGSTGYDNAVALPA--RADA E LLKENVK S TKALKGSAVFSVAKVNTAT G	
<i>S. oleracea</i>	LDPKGRGGSTGYDNAVALPAGGRGDE E ELQK E NNKNVASSKGTITLSVTSSK P ET G	
<i>Anabaena (7120)</i>	LDPKGRGVVSGYDNAVALPA--QADDEDL R TRTNVKRA E ILNGK I SLQ I AKVDSS S G	
<i>S. obliquus</i>	EIAGVFESIQPSD TL GAK XXXXXXXX ITGLWYAR XXX	241
<i>C. reinhardtii</i>	EIAGVFESIQPSD T DLGAKPPK D IKVTGLWYA Q LK	239
<i>V. carteri</i>	EIAGVFESIQPSD T DLGAKPPK D IKITGLWY Q LSQ	240
<i>S. oleracea</i>	EVIGVFQSLQPSD T DLGAKVPK D VKIEGVWYA Q LE Q	248
<i>Anabaena (7120)</i>	EIAGTFESEQPSD T DLGADEPK E VKIRG I FYAR V E	244

Tab 3.5: Aminosäurezusammensetzung des *OEE*-Proteins aus *S. obliquus* im Vergleich mit einigen *OEE*-Proteinen und Thioredoxinen aus Algen und Spinat.

Aminosäure	<i>OEE</i> <i>S. obl.</i> ¹	<i>OEE</i> <i>Ch. r.</i> ²	<i>OEE</i> Spinat ³	<i>OEE</i> <i>Anabaena</i> ⁴ PCC 7120	Trx <i>f</i> <i>Anabaena</i> ⁵ PCC 7119	Trx <i>f</i> Spinat ⁶	Trx <i>m</i> Spinat ⁷
Ala- A	27	18	14	16	21	11	9
Arg- R	8	5	6	12	12	2	2
Asx- D+N	25	16+5	14+7	18+9	27	6+4	6+4
Cys- C	2-3*	2	2	2	2	3	2
Glx- E+Q	27	17+7	21+11	11+18	27	10+3	11+2
Gly- G	26	27	29	19	22	6	5
His- H	2	0	0	0	5	0	0
Ile- I	6	10	8	12	16	6	9
Leu- L	19	22	17	23	22	10	7
Lys- K	20	23	23	16	14	14	11
Met- M	4	2	1	0	1	3	1
Phe- F	8	13	13	13	10	4	4
Pro- P	12	10	14	12	8	5	8
Ser- S	17	17	20	21	14	3	10
Thr- T	18	21	20	20	17	6	5
Trp- W	1**	1	1	0	3	2	3
Tyr- Y	7	7	8	6	6	3	4
Val- V	12	16	19	16	23	12	11
Insgesamt	241	239	248	244	250	113	114
davon hydrophobe	48,5%	50,6%	47,6%	46,3%	51,2%	54,9%	51,8%
berechnete Molmasse, kDa	25,6	25,6	26,7	26,7	27,4	12,6	12,7

¹ aus Langlotz, 1986; (* höchstwahrscheinlich nur zwei Cysteine statt 3 und ** 1 statt 0, wie in anderen *OEE*-Proteinen); ² aus Mayfield *et al.* 1989, ³ aus Oh-Oka *et al.*, 1986; ⁴ aus Borthakur und Haselkorn, 1989; ⁵ aus Whittaker und Gleason, 1984; ⁶ aus Kamo *et al.*, 1989; ⁷ aus Maeda *et al.*, 1986; bei der Berechnung des Anteils der hydrophoben Aminosäuren wurden Ala, Ile, Leu, Val, Phe, Met, Thr, Pro, Cys und Gly berücksichtigt.

3.3 Enzymatische Aktivitäten des *OEE*-Proteins (28 kDa-Trx *f*)

Das 28 kDa-Trx *f* sowie die anderen Thioredoxine aus *Scenedesmus obliquus* wurden bereits 1986 von P. Langlotz in typischen thioredoxin-abhängigen Reaktionen charakterisiert. In dieser Arbeit wird von bereits veröffentlichten Daten über die enzymatischen Aktivitäten des Proteins ausgegangen. Diese Daten sind in der Tab. 3.6 zusammengefasst.

Tab. 3.6: Relative Aktivität (%) des 28 kDa-Trx *f* aus *S. obliquus* in verschiedenen Enzymsystemen (aus Langlotz, 1986).

Ribonucleotidreduktase *		Fructose-1,6-bisphosphatase		NADP-Malatdehydrogenase	
<i>E. coli</i>	<i>S. obliquus</i>	Spinat	<i>S. obliquus</i>	Spinat	<i>S. obliquus</i>
40	0	100	100	10	100

* *E. coli*-Thioredoxin = 100 %

3.3.1 Sättigung der FbPase durch *S. obliquus* *OEE*-Protein (28 kDa-Trx *f*)

In diesem Versuch wurde zum Vergleich mit den älteren Daten das aus der hitze- und säurestabilen Proteinfraction der verbesserten Präparation (Kapitel 3.1.2) erhaltene *Scenedesmus*-*OEE*-Protein eingesetzt. Der Versuch hat gezeigt, dass die maximale Stimulation der Spinat-FbPase bereits durch 9 μg *Scenedesmus*-*OEE*-Protein erreicht wird (Abb. 3.13).

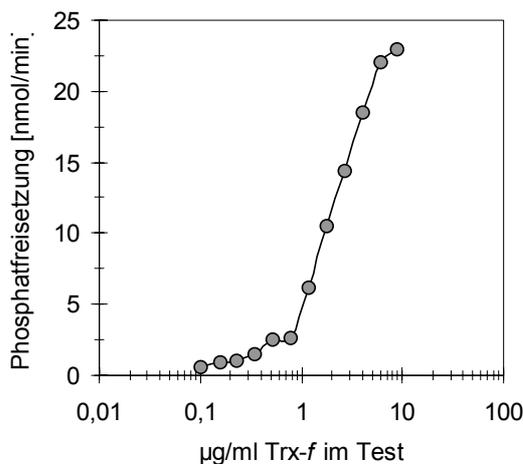


Abb. 3.13. Sättigungskinetik der Spinat-FbPase durch 28 kDa-Trx *f*; 1 mM DTT im Test

Die halbmaximale Stimulation wird durch 2,66 μg erreicht, was einer Konzentration von 95 nM im Test entspricht. Dies sind etwa 10-fach höhere spezifische Aktivitäten als früher berichtet.

3.3.2 Aktivität des OEE-Proteins (28 kDa-Trx f) gegenüber der NiFe-Hydrogenase aus *Scenedesmus obliquus*

Bakterielle NiFe-Hydrogenasen besitzen viele Cysteinreste, von denen nicht alle in die Ausbildung von FeS-Clustern und der Nickel- und Eisen enthaltenden aktiven Zentren miteinbezogen sind (Wu und Mandrand, 1993; Volbeda *et al.*, 1995). So wurde schon früher vermutet, dass Hydrogenasen einer Dithiol/Disulfid-Regulation unterliegen könnten (Spiller *et al.*, 1983). Papen *et al.* (1986) berichteten über eine Aktivierung der NiFe-Hydrogenase aus dem Cyanobakterium *Anabaena* PCC 7119 durch homologes Trx-*m*. Das gab Anlass, an der aus *S. obliquus* isolierten eukaryotischen NiFe-Hydrogenase zu überprüfen, ob auch sie einer Redoxmodulation unterliegt. Tests mit 2,5 mM reduziertem Glutathion zeigten bereits eine starke Inhibition der Hydrogenase. Dieser Effekt konnte mit *E. coli*-Trx bestätigt werden (Wünschiers, 1996). Daraufhin wurden auch Tests unter strikt anaeroben Bedingungen, wie in Kap. 2.6.3 beschrieben, mit homologen Thioredoxinen aus *S. obliquus* durchgeführt.

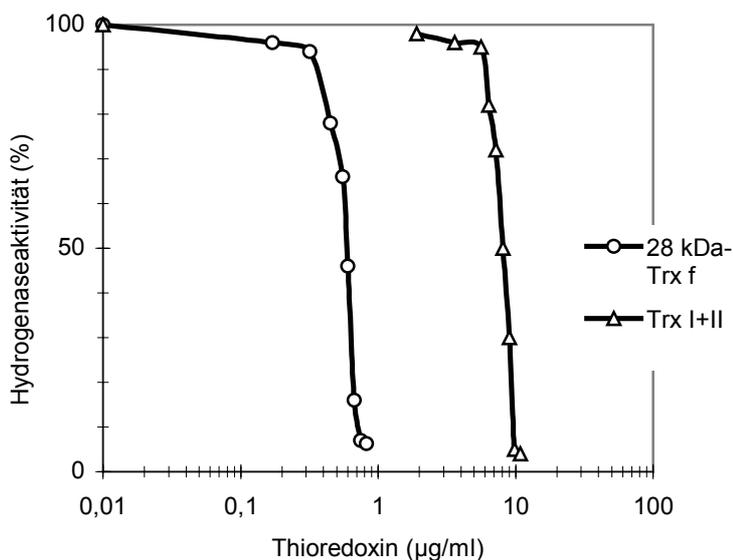


Abb. 3.14: Inhibition der NiFe-Hydrogenase aus *S. obliquus* durch homologe Thioredoxine

Die (nicht von einander getrennten) Thioredoxine I und II, sowie das *OEE*-Protein (28 kDa-Trx *f*) zeigten in beiden Fällen eine Inhibition der NiFe-Hydrogenase. Als besonders effizienter Inhibitor der Hydrogenase erwies sich das *OEE*-Protein. Es wurden I_{50} -Werte von 8 $\mu\text{g/ml}$ (667 nM) bzw. 0,6 $\mu\text{g/ml}$ (21 nM) berechnet (Wünschiers *et al.*, 1999). Die Abhängigkeit der Hydrogenase-Aktivität von der eingesetzten Thioredoxin-Konzentration zeigt Abb.3.14. Der außerordentlich niedrige Wert *in vitro* lässt vermuten, dass die Redoxmodulation auch *in vivo* relevant ist.

3.3.3 Aktivitätsvergleiche mit Spinat-*OEE*-Protein

Nach dem unerwarteten Befund, dass es sich im Fall des 28 kDa-Trx *f* aus *S. obliquus* um ein *OEE*-Protein handelt, musste mit analogen Proteinen aus anderen Organismen überprüft werden, ob diese ebenfalls eine Stimulation der chloroplastidären FbPase bewirken. Für Aktivitätsvergleiche wurde eine hochgereinigte Probe des *OEE*-Proteins aus Spinatchloroplasten verwendet, die dankenswerter Weise von Herrn Dr. A. Seidler aus der Universität Bochum zur Verfügung gestellt wurde.

Ein Teil dieser Probe wurde zuerst einer Molekularsiebchromatographie auf Superdex-75 unterworfen. Die Probe wurde zuvor mit 10 mM DTT reduziert und dem Laufpuffer wurde 5 mM Mercaptoethanol zugegeben um Aggregatbildung über Disulfidbindungen auszuschließen. Die eluierten Fraktionen wurden mit und ohne Zugabe von stimulierbarer Spinat-FbPase getestet, um sicher zu sein, dass es sich bei eventuell auftretenden Aktivitäten nicht um unspezifische Phosphatase-Aktivität handelt (Abb. 3.15). In beiden Fällen trat in Fr. 56 und 58 ml Aktivität auf, was darauf deutet, dass diese Fraktionen Reste einer unspezifischen Phosphatase enthalten. Derartige chloroplastidäre Enzyme wurden z.B. von Hast und Follmann (1996) beschrieben. Diese Fraktionen wurden verworfen. Um die Molmasse der Proteine in den Fraktionen schätzen zu können, wurde in Abb. 3.15 eine logarithmische Skala der Molmassen der Molmarker mit eingezeichnet. Das Proteinprofil zeigte einen Peak in den Fraktionen 64-66 ml, was einer Molmasse von 58 kDa entspricht, in dem keine nennenswerte FbPase-Aktivität zu beobachten war. In Fraktionen 72-74 ml mit erwarteter Aktivität und Molmasse von 33 kDa wurde kaum Protein und keine FbPase Stimulation beobachtet. Da das Spinat-*OEE*-Protein Aggregate bilden kann (Bricker und Frankel, 1998; Lydakis-Simantiris *et al.*, 1999) lag es offensichtlich in

den Fraktionen 64-66 ml in dimerer Form vor. Diese Fraktionen wurden für weitere Tests verwendet.

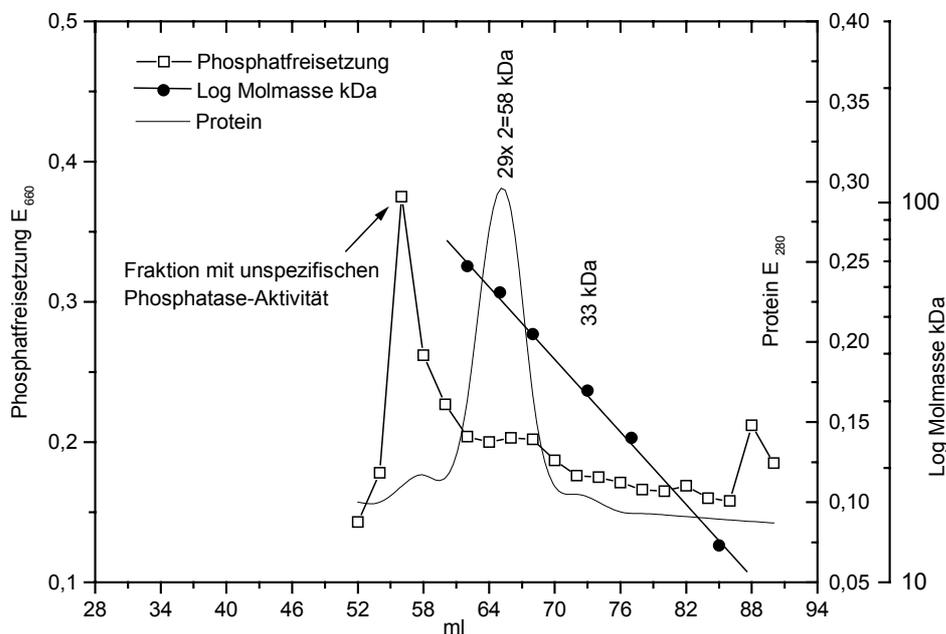


Abb. 3.15: FPLC der Spinat *OEE*-Probe auf Superdex-75; 2 ml/Fraktion. Die Molmarker sind die gleichen wie in Abb. 2.3

In Tests mit Spinat-NADP-MDH unter Zugabe von 0 bis 7,7 $\mu\text{g/ml}$ Spinat-*OEE*-Protein und unterschiedlichen DTT-Konzentrationen von 0,5 bis 2 mM im Testansatz konnte ebenfalls keine Stimulation beobachtet werden (Abb. 3.16).

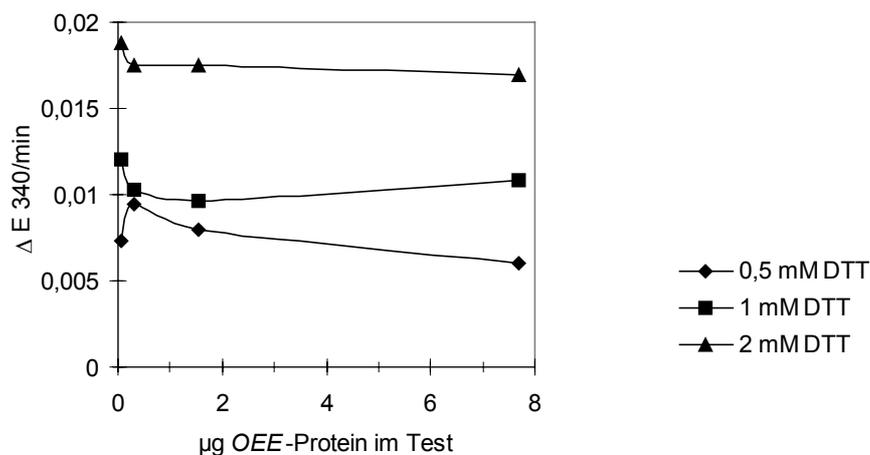


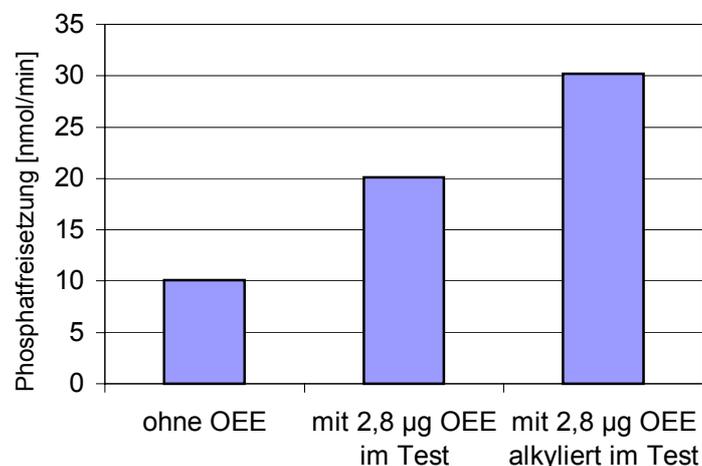
Abb. 3.16: MDH-Tests mit 0,06; 0,31; 1,55 und 7,7 μg Spinat-*OEE*-Protein

3.4 Alkylierungsversuche an den *OEE*-Proteinen

Eine Modifikation der redoxaktiven Cysteine in Thioredoxinen mit Iodacetat oder Iodacetamid führt zum Verlust der Stimulation von Zielenzymen wie Malatdehydrogenase und Fructose-1,6-bisphosphatase (Häberlein *et al.*, 1992). Dieses wurde mit dem *OEE*-Protein (28 kDa-Trx f) aus *Scenedesmus* und Spinat-*OEE*-Protein im FbPase-Test überprüft.

3.4.1 Alkylierungsversuche an *OEE*-Protein aus *Scenedesmus* und Aktivität im FbPase-Test

Für diesen Zweck wurden *OEE*-Proteinproben aus *S. obliquus* verwendet, die durch Isolierung der Thylakoidmembranfragmente, deren Butanolbehandlung und anschließende Reinigung der wässrigen Phase auf der Uno-Q-6 Säule erhalten wurden. Die Proben wurden zuerst 30 min mit 10 mM DTT reduziert und dann 30 min mit 50 mM Iodacetamid (IAM) inkubiert. Nach der IAM-Behandlung wurde die Alkylierung durch Zugabe eines Überschusses an DTT abgestoppt und gegen 50 mM Tris-Puffer pH 7,85 über Nacht dialysiert, um die Reagenzien aus der Proteinlösung zu entfernen. Parallel wurde eine Referenzprobe identisch behandelt, jedoch ohne IAM-Zugabe. Die dialysierten Proben wurden in FbPase-Tests eingesetzt. Die Alkylierung der Cysteine mit IAM hat nicht zu einem Verlust der Stimulationsfähigkeit des *OEE*-Proteins gegenüber der FbPase geführt, im Gegenteil konnte sogar ein zusätzlicher 1,5-facher Anstieg der FbPase-Aktivität beobachtet werden:



Um sicher zu sein, dass die Cysteinreste des Proteins einer Alkylierung frei zugänglich waren, wurden auch Proteinproben aus der wässrigen Phase, die durch Butanolbehandlung der Thylakoidmembransuspension erhalten wurden, mit Ammoniumsulfat gefällt, in geringem Volumen Puffer für eine anschließende Molekularsiebchromatographie aufgenommen, durch 4,5 M Guanidinhydrochlorid denaturiert, erst dann mit DTT reduziert und mit IAM behandelt. Nach 30 min Inkubation im Dunklen mit IAM wurde die Probe auf eine Superdex-75 Säule gegeben. Auch in diesem Fall führte die Modifizierung der Cysteinreste mit IAM nicht zu einem Verlust der Aktivität (Abb. 3.17). Überraschenderweise wurde Aktivität nicht nur in der Fr. bei 76 ml Elutionsvolumen beobachtet, die laut Kalibrierung des Molsiebes (Abb. 2.2) der Molmasse von 28 kDa entspricht sondern auch eine deutliche FbPase-Stimulation durch die Fraktion 52 ml, die im späteren Durchbruch eluiert. Schwache Stimulationen waren auch in Fr. 61 und 67 ml zu sehen. Fraktionen mit Aktivität wurden auf der SDS-PAGE getrennt und alle zeigen Banden im Bereich 28 kDa, allerdings auch bei höheren Molmassen (Abb. 3.18).

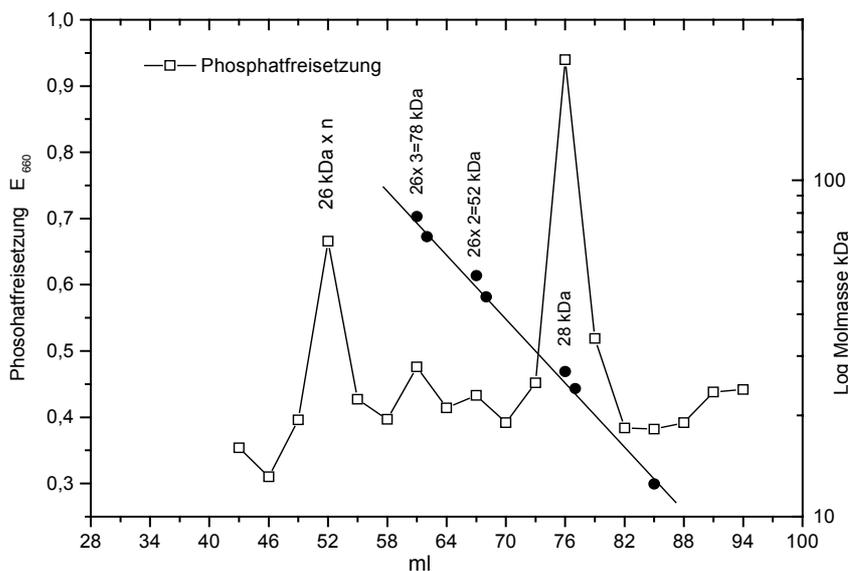


Abb. 3.17: FPLC der mit Butanol behandelten Proteine der Thylakoidmembransuspension aus *S. obliquus* auf Superdex 75; behandelt mit Guanidin und Iodacetamid; 3ml/Fraktion. Die Molmarker sind die gleichen wie in Abb. 2.3.

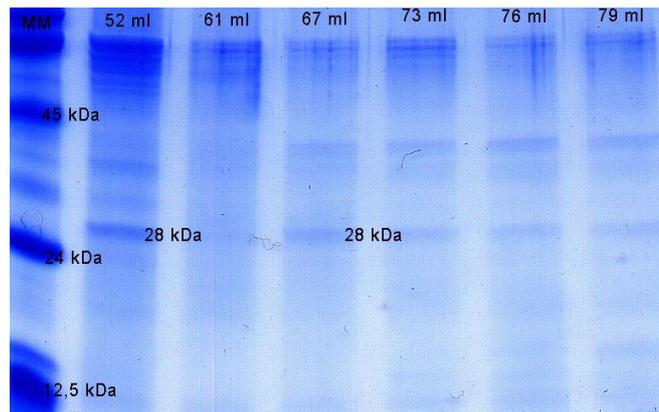


Abb. 3.18: SDS-PAGE der alkylierten Fraktionen der FPLC auf Superdex-75 (in Abb. 3.17); aufgetragen wurde jeweils 1 ml Probe, Molmarker links gezeigt.

Das Ergebnis der Alkylierung zeigt, dass die Sulfhydrylgruppen der Cysteine des *OEE*-Proteins aus *Scenedesmus* für eine Stimulation der FbPase nicht bzw. zumindest nicht allein essentiell sind. Dieses Phänomen, sowohl das Auftreten mehrerer Aktivitätspeaks bei der Molekularsiebchromatographie des alkylierten Proteins und eine zusätzliche Steigerung der Stimulation durch Alkylierung benötigt eine ausführliche Diskussion (siehe Abschnitt 4.1, 4.5).

3.4.2 Alkylierungsversuche an *OEE*-Protein aus Spinat und Aktivität im FbPase-Test

Nach der beobachteten Steigerung der Stimulationfähigkeit des alkylierten *Scenedesmus-OEE*-Proteins gegenüber FbPase wurde mit dem Spinat-*OEE*-Protein, das keine Stimulation der FbPase gezeigt hat (Kap. 3.3.3) überprüft ob hier eine Alkylierung der Cysteinreste vielleicht zu einer Stimulation führt.

Hierfür wurden Fraktionen der FPLC auf Superdex-75 mit 62-66 ml Elutionsvolumen (Kapitel 3.3.3, Abb. 3.15) verwendet. Eine Probe aus diesen Fraktionen wurden durch Guanidinhydrochlorid-Zugabe (4,5 M) denaturiert, jeweils 30 min mit 10 mM DTT und 50 mM IAM reduziert und alkyliert, danach auf Superdex-75 rechromatographiert. Die eluierten Fraktionen (Abb. 3.19) zeigten im FbPase-Test zwei schwache Aktivitätspeaks, einen, ähnlich wie beim *Scenedesmus-OEE*-Protein, bei 52 ml Elutionsvolumen im späten Durchbruch und einen neu aufgetretenen in Fraktion 73 ml, die der Molmasse 33 kDa entspricht.

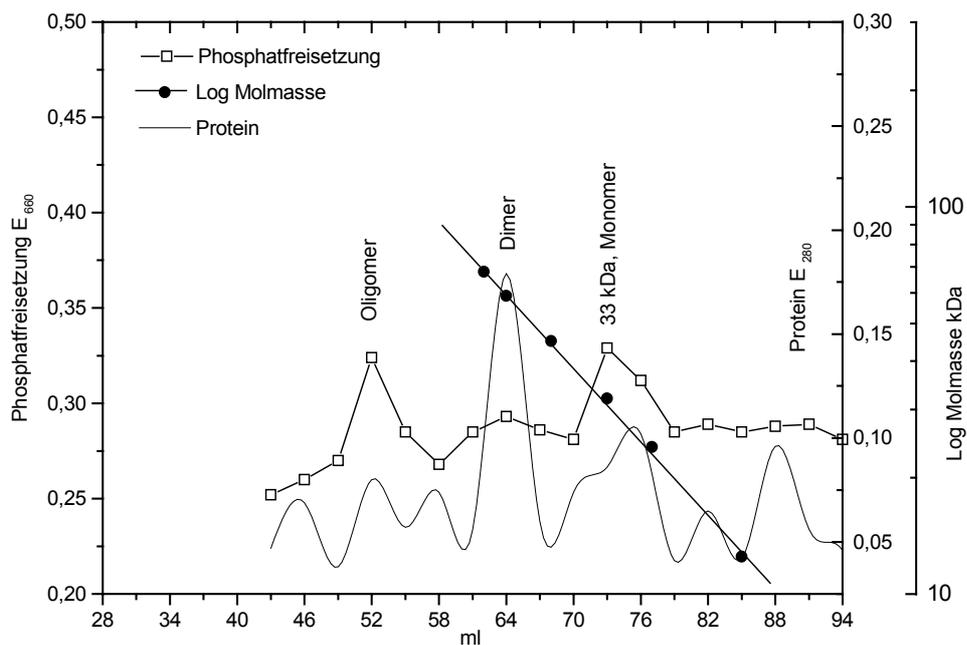


Abb. 3.19: FPLC der Spinat *OEE*-Probe auf Superdex-75, behandelt mit Guanidin und Iodacetamid; 3 ml/Fraktion. Molmarker wie in Abb. 2.3.

Im Proteinmaximum bei 64 ml wurde ebenso wie in Abb. 3.15 keine nennenswerte Stimulation beobachtet. Alle drei Fraktionen wurden auf die SDS-PAGE aufgetragen. Nur die Fraktion 64 ml mit einer Molmasse 58 kDa zeigte eine Bande auf der SDS-PAGE die im Molmassenbereich von 33 kDa liegt. In Fr. 52 und 73 ml wurden keine Banden beobachtet (Abb. 3.20).

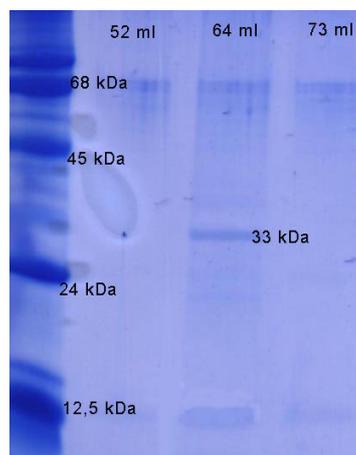


Abb. 3.20: SDS-PAGE der alkylierten Fraktionen der FPLC auf Superdex-75 (in Abb. 3.19); aufgetragen wurde jeweils 1 ml Probe, Molmarker links gezeigt

Da von allen drei Fraktionen jeweils nur 1 ml Lösung verwendet werden konnte, ist die Proteinmenge in Fraktionen 52 und 73 ml wahrscheinlich nicht ausreichend gewesen um sichtbare Banden auf der SDS-PAGE zu ergeben. Dies bedeutet andererseits, dass die schwache Stimulation der FbPase in Fr. 52 und 73 ml durch sehr geringe Proteinmengen erreicht wird.

3.5 Analoge Proteine in anderen Grünalgen

Mit den gleichen Methoden wie bei der Präparation des *OEE*-Proteins (28 kDa-Trx f) aus *Scenedesmus*, wurden Thioredoxinprofile der Grünalgen *Chlorella vulgaris* und *Chlamydomonas reinhardtii* untersucht, mit dem Ziel Proteine mit Thioredoxinaktivität und abweichenden Molmassen zu finden.

3.5.1 Proteine aus *Chlorella vulgaris* mit FbPase-Stimulation

Eine hitze- und säurestabile Proteinfraction aus *Chlorella*, erhalten wie in Kap. 3.1.1, wurde nach der Ammoniumsulfatfällung mit 10 mM DTT reduziert und einer Molekularsieb-Chromatographie auf Superdex-75 unterzogen. Das Elutionsprofil (Abb. 3.21) zeigte im FbPase-Test Aktivitätspeaks im Bereich 11-12,5 kDa (Thioredoxine der üblichen Molmasse) und besonders starke Aktivität im Bereich 22-24 kDa. Eine Untersuchung der Fraktionen auf die Aktivität endogener unspezifischer Phosphatase hat gezeigt, dass in Fraktionen bis 70 ml Elutionsvolumen eine solche unspezifische Phosphatase-Aktivität vorhanden ist, während es sich in Fr. 73-79 ml um eine echte Stimulation der Spinat-FbPase handelt. Diese Fraktion wurde daher wie in Kap. 2.3.6 beschrieben weiter durch Ionenaustauschchromatographie auf Uno-Q-6 gereinigt. Das Elutionsprofil (Abb. 3.22) zeigt zwei Peaks mit Stimulation der FbPase in Fr. 5-6 und 18-19 (bei 70 und 180 mM Ammoniumacetat). Bei der Rechromatographie dieser Peaks auf Superdex-75 zeigt der erste Peak eine Stimulation im Molmassenbereich 12 kDa, was offensichtlich nicht vollständig abgetrennte Thioredoxine normaler Größe sind, der stärkere, zweite Peak zeigt Stimulation im Molmassenbereich 23 kDa (Elutionsprofile hier nicht gezeigt). Die Fraktionen 16 bis 20 wurden auf SDS-PAGE aufgetragen. Die Elektrophorese (Abb. 3.23) zeigt eine einzige Proteinbande, deren Intensität in diesen Fraktionen zunimmt und dann wieder abnimmt im Molmassenbereich 26 kDa, was etwas größer ist als das Ergebnis der Molekularsiebchromatographie (23 kDa). Diese Fraktionen

enthalten jedoch noch viele restliche Proteine. Eine Reinigung bis zu annähernd homogenem aktivem Protein und dessen eindeutige Charakterisierung erfordert offensichtlich die Ausarbeitung eines komplett neuen Trennungsgangs.

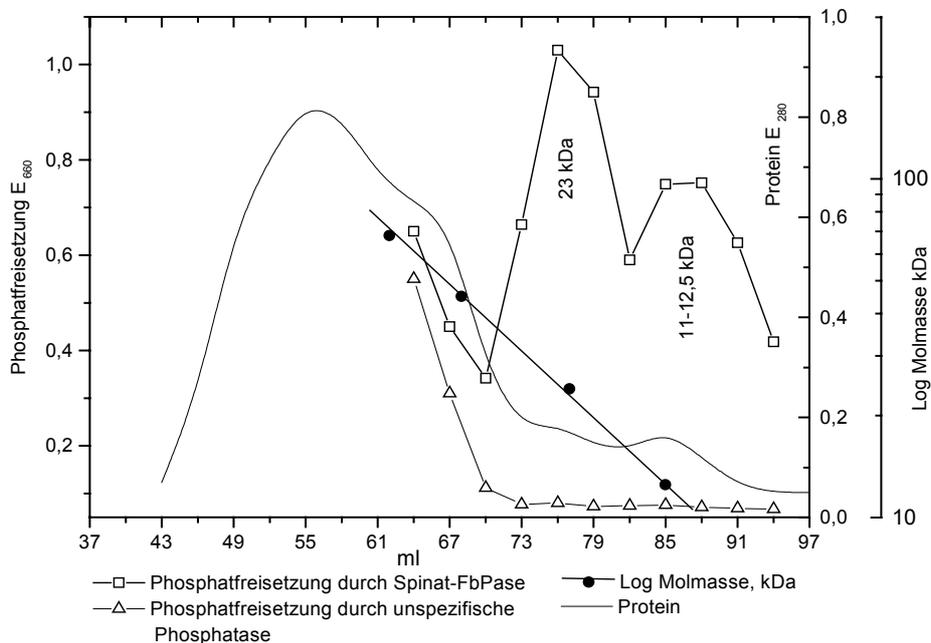


Abb. 3.21: FPLC der hitze- und säurestabilen Proteinfraction aus *Chlorella* auf Superdex-75; 3 ml/Fraktion. Molmarker wie in Abb. 2.3.

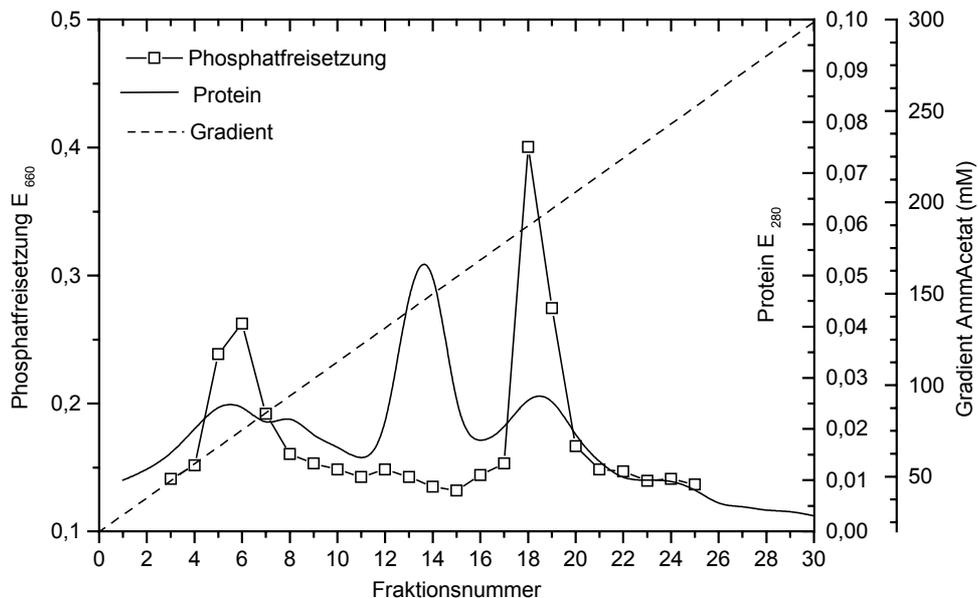


Abb. 3.22: FPLC der Fraktionen 73-79 ml von Superdex-75 (Abb. 3.21) auf UnoQ-6 in Ammoniumacetatpuffer, pH 8,6; 4ml/Fraktion

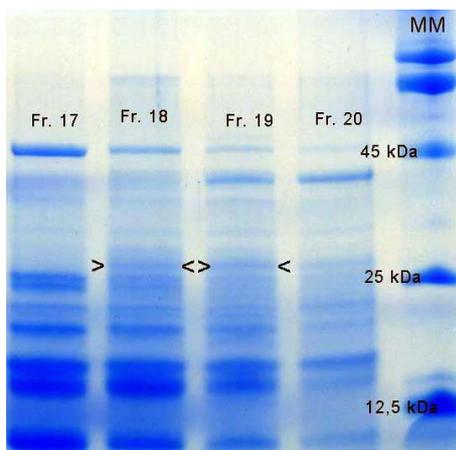


Abb. 3.23: SDS-PAGE der Fraktionen der FPLC auf Uno-Q-6 (Abb. 3.22).
Bande im Bereich 26 kDa ist mit Pfeilen markiert.

Nachdem die Versuche mit *Scenedesmus* OEE-Protein zeigten, dass eine Alkylierung der Cysteinreste nicht zum Verlust der Aktivität im FbPase-Test führt, wurde dieses auch mit dem *Chlorella*-Protein überprüft. Es wurde die gleiche hitze- und säurestabile Proteinfraction verwendet wie im Fall der FPLC auf Superdex-75 in Abb. 3.21, jedoch wurden die Proteine zuerst mit Guanidinhydrochlorid denaturiert, danach alkyliert und auf Superdex-75 chromatographiert. Das Elutionsprofil der Säule (Abb.3.24) zeigte im FbPase-Test zwei Aktivitätspeaks, einen im Durchbruch bei 46 ml und einen etwas stärkeren bei 67 ml Elutionsvolumen, der einer Molmasse von 52 kDa entspricht.

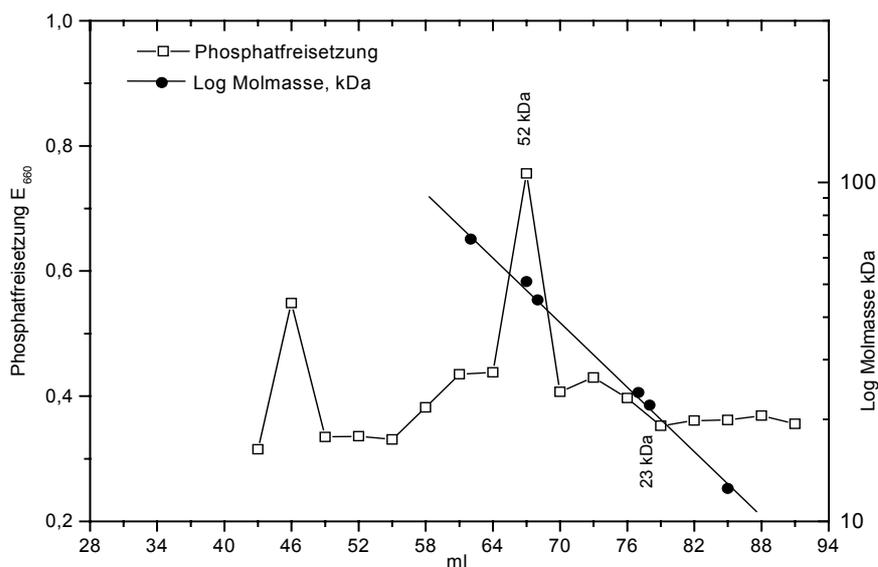


Abb. 3.24: FPLC der alkylierten *Chlorella*-Proteinprobe auf Superdex-75;
3 ml/Fraktion. Molmarker wie in Abb. 2.3.

Man kann vermuten, dass es sich in dieser Fraktion um ein *OEE*-Protein handelt das als Dimer, wie bei Spinat-*OEE* (Abb. 3.19), vorliegt. Im Bereich 23 kDa mit erwarteter FbPase-Stimulation wurde eindeutig keine Aktivität beobachtet. Tests auf endogene unspezifische Phosphataseaktivität in Fr. 46 und 67 ml haben gezeigt, dass es sich in diesen Fraktionen nicht um unspezifische Phosphatase handelt. Deren Aktivität, sowohl auch die Aktivität der Thioredoxine im Molmassenbereich 12 kDa verschwindet nach der Alkylierung der Probe (zum Vergleich Abb. 3.21; 3.24).

3.5.2 Proteine aus *Chlamydomonas reinhardtii* mit FbPase-Stimulation

In Extrakten aus *Ch. reinhardtii* wurde ebenfalls die hitze- und säurestabile Proteinfraction auf FbPase-Stimulation getestet. Die mit Ammoniumsulfat gefällten Proteine wurden mit 10 mM DTT reduziert und ohne Alkylierung einer Molekularsiebchromatographie auf Superdex-75 unterzogen. Das Elutionsprofil (ohne Abb.) zeigte im FbPase-Test einen Aktivitätspeak im Molmassenbereich 11-12,5 kDa (Thioredoxine der üblichen Molmasse). Im Bereich 22-30 kDa konnte keine Stimulation beobachtet werden. Ein Versuch mit Butanolextraktion der Proteine aus der Thylakoidmembransuspension, anschließender Molekularsiebchromatographie der zuvor alkylierten Proteinprobe auf Superdex-75 zeigte im Elutionsprofil zwar mehrere Peaks, die Aktivität war jedoch in allen sehr schwach. Im letzten Versuch eine Aktivität zu finden wurde ein Rohextrakt, erhalten aus 6 g Algen, direkt nach dem Zellaufschluss mit Butanol ausgeschüttelt und die wässrige Phase mit Ammoniumsulfat gefällt. Die Proteine des resuspendierten Pellets der Ammoniumsulfatfällung wurden alkylert und auf Superdex-75 getrennt. Das Elutionsprofil der Säule zeigte im FbPase-Test (Abb. 3.25) mehrere Aktivitätspeaks, ähnlich wie bei *Chlorella* in Fr. 46 ml (in Abb. 3.24), in Fr. 64 und 70 ml, und eine schwächere Stimulation im Molmassenbereich 23 kDa (79 ml). Tests ohne Zugabe von stimulierbarer Spinat-FbPase (unter gleichen Testbedingungen wie im FbPase-Test) zeigten, dass es sich in den Fraktionen mit Aktivität nicht um endogene unspezifische Phosphatase handelt. Die Stimulation der FbPase durch Thioredoxine der üblichen Molmasse von 12 kDa tritt als Folge der Alkylierung der Cysteinreste nicht mehr auf.

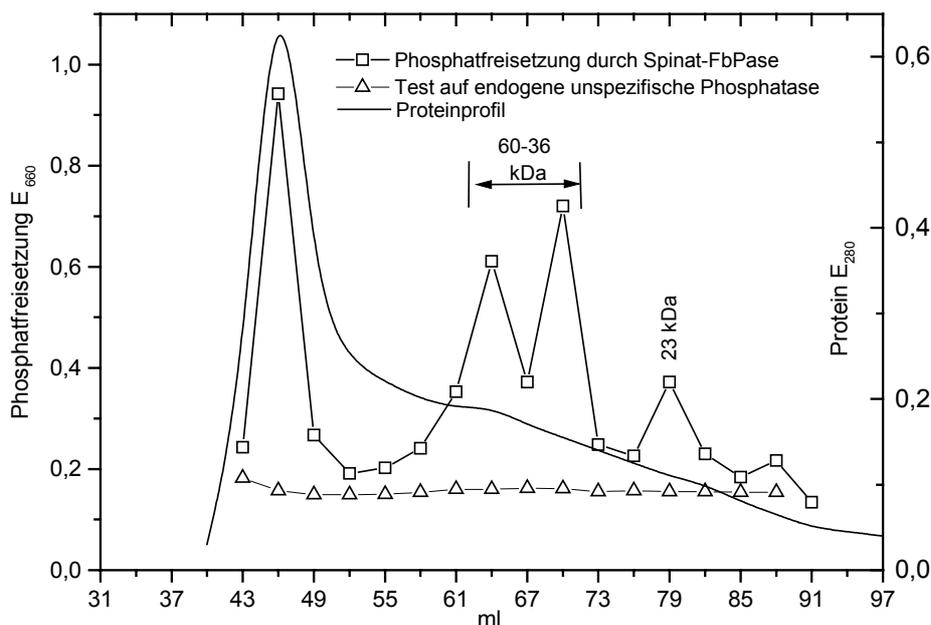


Abb. 3.25: FPLC der alkylierten Proteine aus dem Butanol-behandelten Rohextrakt in *Chlamydomonas* auf Superdex-75 im FbPase-Test

3.5.3 Immunologische Untersuchung der Algenproteine

Die Existenz und thioredoxin-ähnliche Aktivität eines Proteins von 23 kDa in Extrakten aus *Chlorella vulgaris* lassen sich weder mit dem 28 kDa-OEE-Protein aus *Scenedesmus* noch mit 12 kDa-Thioredoxinen direkt vereinbaren. Da eine Feinreinigung und Sequenzierung kurzfristig nicht zu erreichen waren, wurde ein alternativer Versuch unternommen, das 23 kDa-*Chlorella*-Protein einzuordnen. Es ist bekannt, dass polyklonale Antikörper gegen *E. coli*-Thioredoxin wegen der hochkonservierten Struktur von Thioredoxin-Domänen mit den „normalen“ Thioredoxinen aller anderen Organismen kreuzreagieren. Die fraglichen *Scenedesmus*- und *Chlorella*-Proteine wurden daher in Western blots und ELISA-Tests diesem immunologischen Vergleich unterzogen.

Eine Probe aus der hitze- und säurestabilen Proteinfraction aus *Chlorella vulgaris* wurde auf Superdex-75 gereinigt und die Fraktion mit FbPase-Stimulation im Molmassenbereich 23 kDa auf SDS-PAGE getrennt. Die auf eine PVDF-Membran geblotteten Proteine wurden einem Test auf Kreuzreaktion mit Antikörpern gegen *E. coli*-Trx unterworfen. Parallel wurden Proben des 28 kDa *Scenedesmus*-Trx *f* und als Referenz Trx aus *E. coli* verwendet. Der Western blot zeigte keine Kreuzreaktion der

Antikörper mit den Algenproteinen, was im Bezug auf das *Scenedesmus*-Protein schon von P. Langlotz (1986) festgestellt wurde. Die Referenzprobe war positiv (Abb. 3.26). Dieselben Proteine sowie BSA als Blindprobe wurden in einem ELISA analysiert. Hier war das Ergebnis für *Chlorella*-Proteine positiv. Beide Fraktionen, aus dem Molmassenbereich 23 kDa und 12 kDa, zeigten Kreuzreaktion mit Antikörpern gegen *E. coli*-Trx (Abb. 3.27). Dagegen reagierte das *Scenedesmus*-28 kDa-OEE (Trx-f) ebenso wenig wie BSA.

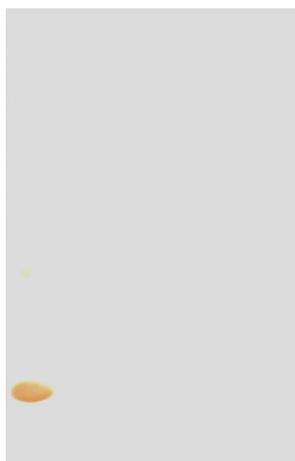


Abb.3.26: Algenproteine im Western-Blot mit Antikörpern gegen *E. coli*-Trx. Nur die Referenz ist positiv (braunes Signal unten links ist *E. coli*-Trx); *Chlorella* 23-kDa Protein (Mitte) und *Scenedesmus*-Trx-f (rechts) zeigen keine Kreuzreaktion.

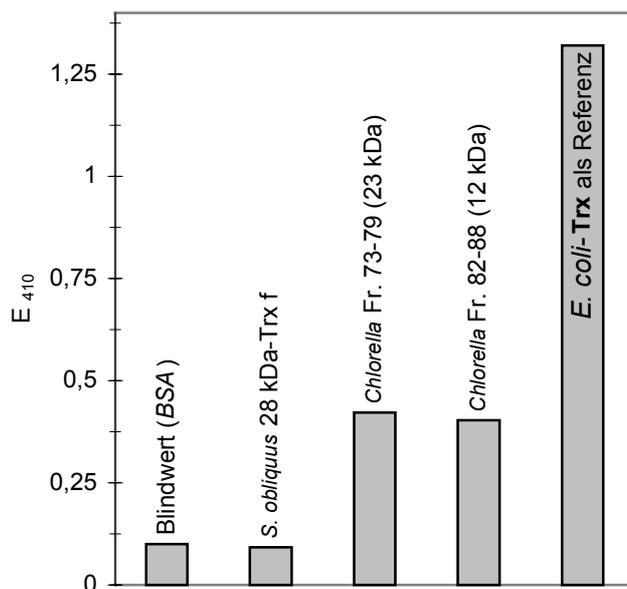


Abb. 3.27: Reaktion von Algen-Proteinen mit Antikörpern gegen *E. coli*-Trx in ELISA-Tests

Das *Chlorella* 23 kDa-Protein ist demnach ein Thioredoxin bzw. besitzt eine Thioredoxin-Domäne, und ist nicht das *OEE*-Protein dieser Grünalge.

4. Diskussion

4.1 Das 28 kDa-Thioredoxin *f* und *OEE* der Grünalge *Scenedesmus obliquus* sind identische Proteine

Das 28 kDa-Thioredoxin *f* wurde in *Scenedesmus obliquus* zeitgleich mit anderen Thioredoxinen dieser Alge beschrieben (Langlotz *et al.*, 1986a, 1986b). Es unterscheidet sich von den anderen Thioredoxinen durch die außergewöhnlich hohe Molmasse, zeigt jedoch alle Eigenschaften eines Thioredoxins *f*. Die Tatsache, dass auch im Cyanobakterium *Anabaena sp.* 7119 ein vergleichbares Protein gefunden wurde (Whittaker und Gleason, 1984), in höheren Pflanzen jedoch nicht, liess vermuten, dass es sich in Cyanobakterien und Grünalgen um funktionelle Equivalente, oder möglicherweise um Vorläufer der Thioredoxine in höheren Pflanzen handelt (Langlotz *et al.*, 1986a). Auch war nicht auszuschließen, dass dieses Protein ein Produkt der Fusion eines „normalen“ Thioredoxins mit einem Protein unbekannter Natur, oder möglicherweise ein unbekanntes Protein mit einer inserierten thioredoxintypischen Sequenz –WCGPC- ist. Die Natur dieses außergewöhnlichen Proteins zu klären wurde zum Ziel dieser Arbeit gemacht.

Das Ergebnis der N-terminalen Sequenzierung zeigte überraschend sehr hohe Ähnlichkeit zum *oxygen evolving enhancer (OEE)*-Protein aus dem Photosystem II der Grünalgen. Weil nach diesem Ergebnis eine Fusion oder Insertion noch nicht auszuschließen war, wurden weitere Sequenzierungen an tryptisch gespaltenen Peptiden vorgenommen. Auch diese Peptidsequenzen zeigten große Ähnlichkeit zu *OEE*-Proteinen. Da diese Proteine in Grünalgen und in höheren Pflanzen mehrere stark konservierte Bereiche aufweisen, in denen auch zwei Cysteine enthalten sind, wurde vor allem viel Wert auf die Identifizierung der cysteinhaltigen Peptide gelegt. Es ist gelungen, eines von beiden Cysteinen zu identifizieren. Das andere war trotz mehrerer Versuche nicht zu finden, man kann aber mit hoher Wahrscheinlichkeit das zweite Cystein, das sich in *OEE*-Proteinen von *Ch. reinhardtii*, *V. carteri* und Spinat in einem Abstand von 24 Aminosäuren befindet, vorhersagen.

Durch Sequenzierung konnten 49,2 % der gesamten Sequenz von 241 Aminosäuren abgedeckt werden. Die identifizierten Peptidfragmente sind gleichmäßig über die gesamte Länge des Proteins verteilt und umfassen sowohl den N- auch den C-Terminus, was wenig Spielraum für die Existenz eines Thioredoxin-Fragmentes in dieser Proteinsequenz lässt.

Gegen die ursprünglich vermutete Fusion oder Insertion eines Thioredoxin-Fragmentes sprechen auch die Tatsache, dass dieses Protein keine Kreuzreaktivität im Test mit Antikörpern gegen *E.coli*-Thioredoxin zeigt, sowie auch die Ergebnisse der Alkylierung der Cysteine in dem 28 kDa-Trx *f* (*OEE*-Protein). Es ist bekannt, dass die Modifizierung der Cysteine in Thioredoxinen, oder deren Austausch gegen andere Aminosäuren, zu einem Verlust der Fähigkeit Zielenzyme zu stimulieren (mit einigen Ausnahmen: Häberlein *et al.*, 1992; Stumpp *et al.*, 1999) führt. Die Aktivität dieses Proteins bleibt jedoch nach der Alkylierung unbeeinflusst, so dass man nicht nur die Existenz einer Thioredoxin-Domäne in dem Protein ausschließen kann, sondern auch der klassische Mechanismus der Thioredoxin-Zielenzym-Wechselwirkung in diesem Fall nicht mehr zutreffen kann. Somit darf man sicher sein, dass das 28 kDa-Trx *f* tatsächlich ein *OEE*-Protein ist, das sich nur geringfügig von anderen bereits bekannten *OEE*-Proteinen aus Grünalgen unterscheidet und keinerlei Thioredoxin-Fragmente enthält.

Auch dessen Lokalisierung im Chloroplasten, die von Langlotz *et al.* (1986a), eher indirekt gefunden wurde, konnte bewiesen werden. Nach der Erkenntnis, dass es sich um ein Protein aus dem Photosystem II handelt, konnte mit Hilfe einer völlig anderen Reinigungsmethode gezeigt werden, dass das *OEE*-Protein aus isolierten Thylakoidmembranfragmenten extrahiert und in aktivem Zustand, zur Stimulation der FbPase befähigt, erhalten werden kann.

Sekundärstruktur und Aggregatbildung

Die Sekundärstruktur des 33 kDa-Proteins (Spinat-*OEE*-Protein) in Lösung ist sehr variabel, was durch CD- und FTIR-Messungen belegt wird. Bricker und Frankel (1998) vermuten, dass solche Variabilität der Sekundärstruktur auf hohe Proteinkonzentrationen bei den FTIR-Messungen zurück zu führen ist. Sie haben beobachtet, dass das Spinat-*OEE*-Protein bei der Lagerung in höheren Konzentrationen Aggregate mit höherer Molmasse bildete. Diese Aggregate blieben

während der Ionenaustauschchromatographie und auf der Polyacrylamid-gelelektrophorese stabil. Die Neigung des Spinat-*OEE*-Proteins zur Dimerenbildung, die während der Molekularsiebchromatographie stabil bleiben, wurde auch in dieser Arbeit beobachtet (Abb. 3.15). In diesem Fall wurde für die Chromatographie eine hochgereinigte Proteinprobe verwendet, die bei der Elution einen Proteinpeak im Molmassenbereich von 58 kDa aufwies. Die SDS-PAGE dieser Fraktion jedoch zeigte nur eine Bande im Bereich 33 kDa. Damit konnte das beschriebene Verhalten des Spinat-Proteins in dieser Arbeit auch unter präparativen Bedingungen bestätigt werden.

Verhalten des *Scenedesmus-OEE*-Proteins bei der Molekularsiebchromatographie

Das Verhalten des *Scenedesmus-OEE*-Proteins bei der Molekularsiebchromatographie (Abb. 3.17) als auch bei der Ionenaustauschchromatographie auf der Uno-Q-6 Säule (Abb. 3.7), wo mehrere Aktivitätspeaks auftreten (obwohl dort nur die Fraktion 72-78 ml der Superdex 75-Säule aufgetragen wurde) lässt vermuten, dass auch das *OEE*-Protein aus *Scenedesmus* dazu neigt, Molekülaggregate zu bilden. Da die Cysteinreste vor der Molekularsiebchromatographie (Abb. 3.17) modifiziert wurden, muss die Ausbildung der Aggregate ohne Beteiligung der Cysteinreste geschehen. Das unterstützt die Vermutung von Bricker und Frankel (1998), dass die Aggregatbildung über hydrophobe Wechselwirkungen stattfindet. Diese Aggregate verhalten sich bei den chromatographischen Trennungen je nach Größe unterschiedlich. Das kann am Beispiel der Molekularsiebchromatographie auf der Superdex 75-Säule (Abb. 3.17) verdeutlicht werden. Das Auftreten mehrerer Peaks im Elutionsprofil der Säule lässt vermuten, dass die *OEE*-Proteinmoleküle dimere, trimere und noch größere Aggregate ausbilden. Eine solche Größe der Molekülaggregate stimmt gut mit der Eichung des Molsiebes überein. Bei der Berechnung der Molmassen der Aggregate wurde jedoch nicht mit einer Molmasse von 28 kDa, wie sich das monomere vorliegende Protein auf dem Molsieb verhält, sondern mit der tatsächlich berechneten Molmasse des Proteins von 25,8 kDa gerechnet. Es scheint berechtigt, dass man mit kleineren Molmassen multiplizieren muss, weil das Protein wahrscheinlich, wie das Spinat *OEE*-33, eine längliche Form mit variabler Oberfläche wegen der nach außen präsentierten Sequenzbereiche ohne geordnete

Sekundärstrukturen hat (Zubrzycki *et al.*, 1998; Lydakis-Simantiris *et al.*, 1999; Bricker und Frankel, 1998). Die gebildeten Molekülaggregate werden dadurch möglicherweise kompakter und nähern sich einer globulären Form an. Es wäre vorstellbar, dass diese Aggregate unterschiedlich stabil sind. Am stabilsten sollte demnach das dimere Protein sein, das in diesem Zustand kaum Aktivität zeigt (Abb. 3.17), obwohl die Proteinkonzentration in dieser Fraktion etwas höher, als bei dem monomeren 28 kDa *OEE*-Protein ist (Intensität der Banden auf der SDS-PAGE in Abb. 3.18). Das trimere Proteinaggregat ist dagegen mengenmäßig weniger vertreten, zeigt jedoch etwas höhere Aktivität, weil es vermutlich instabiler ist. Mengenmäßig liegt das *OEE*-Protein am meisten in Form von oligomeren Proteinaggregaten (Bande auf SDS-PAGE am stärksten ausgeprägt), es zeigt auch höhere Aktivität, was man durch einen höheren Anteil monomerer *OEE*-Proteinmoleküle im Gleichgewicht mit aggregierten Proteinmolekülen erklären könnte.

Auch bei der Ionenaustauschchromatographie ist die Auftrennung des *OEE*-Proteins in mehrere Aggregate vorstellbar. Alle Fraktionen mit FbPase-Stimulation zeigen dagegen (Abb.3.7) auf der denaturierenden SDS-PAGE Proteinbanden im Molmassenbereich 28 kDa.

Vergleich der Reinigungsbilanzen

Aus dem Vergleich der Reinigungsbilanzen des *Scenedesmus-OEE*-Proteins nach zwei verschiedenen Reinigungsmethoden (Tab. 3.1 und Tab. 3.2) ergibt sich, dass die Ausbeute an Protein pro Gramm aufgearbeitete Algen nach der zweiten Methode für Membranproteine (Butanolfraktionierung) um einen Faktor 2,6 höher ist. Ein Vergleich der Gesamtaktivität der aktiven Fraktionen zeigt jedoch, dass sie bei der Verwendung der zweiten Methode nicht erhöht wird, sondern sie ist sogar um den Faktor 1,4 niedriger. Worauf das zurück zu führen ist, könnte mehrere Gründe haben. Man könnte davon ausgehen, dass die butanolbehandelten *OEE*-Proteine stärker zur einer Aggregatbildung neigen und die Proteine in aggregiertem Zustand nicht in der Lage sind die FbPase zu stimulieren. Nur ein Anteil monomerer Proteinmoleküle, die mit den Aggregaten im Gleichgewicht vorliegen sind dazu fähig. Eine erhöhte Neigung des Proteins zur Aggregatbildung könnte jedoch nicht nur eine Folge der Butanolbehandlung sein, sondern auch an dem Ursprung des isolierten

Proteins liegen. Es ist möglich, dass bei der konventionellen Reinigungsmethode beim Zellaufbruch vorwiegend aus dem Stroma oder den Thylakoiden der Chloroplasten prozessierte und lösliche Vorstufen des *OEE*-Proteins im Rohhomogenat erhalten und weitergereinigt werden, die noch nicht mit dem PSII assoziiert waren. Diese Vermutung wird durch Berichte verstärkt, dass die extrinsische 33 (*OEE*), 24 und 18-kDa Proteine in beiden Formen vorliegen, mit PS II assoziiert und in freier Form. Ettinger und Theg (1991) beobachteten in Spinat große Pools dieser Untereinheiten im Thylakodlumen in löslicher Form. Bei der Butanolextraktion aus der Thylakoidmembransuspension wird demnach vorwiegend das mit dem PSII assoziierte *OEE*-Protein isoliert, das etwas andere Eigenschaften besitzt, wodurch es geringere Aktivität im FbPase-Test zeigt. Diese Vermutung wird durch Publikationen bekräftigt, wo berichtet wird, dass das *OEE*-Protein erst durch Bindung an das PSII seine endgültige Konformation erfährt. Nach Hutchison *et al.*, 1998, Enami *et al.*, 1998, erfährt das Spinat-*OEE*-Protein beim Andocken an das PSII Konformationsänderungen, deren Folge eine Zunahme des hydrophoben β -Faltblattanteils, sowie eine Abnahme der ungeordneten Sequenzbereichen ist, wodurch das Proteinmolekül kompakter wird. Es wäre vorstellbar, dass auch in *Scenedesmus* das von PSII-Partikeln abgelöste *OEE*-Protein eine etwas andere Konformation besitzt, deren Folge entweder eine stärkere Neigung zur Aggregatbildung ist, oder selbst das monomere, vom PS II abgelöste Protein geringere Aktivität im FbPase-Test hat.

Bedenkt man, dass in der bisher üblichen ersten Reinigungsmethode eine Hitzefällung verwendet wird (das *OEE*-Protein ist wie Thioredoxine hitze- und säurestabil) und im Fall der Butanolbehandlung nicht, wäre es auch möglich, dass die Hitzebehandlung des Proteins eine höhere Aktivität zur Folge hat. Dieses wurde mit butanolbehandelten, 10 min bei 60, 70 und 95 °C inkubierten Proben überprüft, doch zeigte sich bei keiner Temperatur ein signifikanter Einfluss der Vorbehandlung auf die Aktivität des Proteins.

Zum Mechanismus der Stimulation

Trx-f/*OEE*-Protein aus *Scenedesmus* zeigt gegenüber mindestens fünf Enzymsystemen eine Thioredoxinen vergleichbare Aktivierung oder Hemmung (vgl. Kap. 3.3):

1. Fructosebisphosphatase
2. NADP-Malatdehydrogenase
3. Ribonucleotidreduktase
4. Protochlorophyllidreduktase
5. Hydrogenase

Da die Thioredoxinwirkung über Disulfid-Dithiol-Wechsel in diesen Enzymen bewiesen ist (1.-3.) bzw. nach der Enzymstruktur nahe liegt (4.,5.) würde man auch für die Wirkungsweise des *OEE* einen Redoxwechsel der konservierten Cysteine 28 und 51 (vgl. Tab. 3.4, Nummerierung für Spinat-*OEE*) erwarten. Die Ergebnisse der Alkylierung zeigen aber, dass die Sulfhydrylgruppen der Cysteine des *OEE*-Proteins für eine DTT-abhängige Stimulation der FbPase *nicht* essentiell sind. Für eine zusätzliche Erhöhung der Stimulation der FbPase durch alkylierte *OEE*-Proteine (Kap. 3.4.1), ist vielleicht eine plausible Erklärung, dass durch die Alkylierung der SH-Gruppen die Proteinmolekülaggregate destabilisiert werden und der Anteil der getrennt vorliegenden monomeren Proteinmoleküle im Gleichgewicht höher und als Folge die Aktivität erhöht wird. Es ist auch nicht ausgeschlossen, dass bei der Alkylierung mit Iodacetamid nicht nur Cysteine alkyliert werden, sondern auch andere Aminosäuren, wie Lysin, Histidin und Methionin (Gurd, 1972), was zusätzlich zur Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung monomere Proteinmoleküle führen könnte.

Der Erhalt der Aktivität nach Alkylierung wirft die Frage eines möglichen Mechanismus der Reaktion zwischen dem *OEE*-Protein und der FbPase auf. Wie Häberlein *et al.* (1992) und Stumpp *et al.* (1999) an den Chloroplastenenzymen FbPase, NADP-MDH und CF₁-ATP-Synthase γ -Untereinheit beobachteten, kann eine Aktivierung dieser typisch thioredoxin-modulierten Zielenzyme auch durch redox-inaktive Thioredoxin-Derivate bzw. Cys-Ser-Mutanten hervorgerufen werden. Auch eine Phagen-DNA-Polymerase wird durch Thioredoxin *ohne* Redoxwechsel aktiviert (Huber *et al.*, 1986). Es wurde von den Autoren postuliert, dass das Thioredoxin in diesem Fall bei der Ausbildung des Thioredoxin-Zielenzym-Komplexes nicht die Rolle eines Reduktionsmittel erfüllt, sondern im Zielenzym Konformationsänderungen induziert, als deren Folge eine leichtere Reduzierbarkeit der Disulfidbrücke im Zielenzym durch das niedermolekulare Reduktionsmittel DTT bereits in 1 mM Konzentration resultiert.

Bei dem *Scenedesmus-OEE*-Protein könnte man sich eine ähnliche Situation vorstellen, in der das *OEE*-Protein mit seiner variablen Sekundärstruktur und mehreren ungeordneten Sequenzabschnitten an der Oberfläche, das dazu prädestiniert ist, spezifische Wechselwirkungen mit anderen Proteinen einzugehen, die Konformation von Thioredoxin-Zielenzymen so verändert, dass ihre regulatorischen Disulfidbrücken durch andere Redoxpartner leichter zugänglich und spaltbar werden.

Da aber als natürlicher Reaktionspartner der Thioredoxine in Chloroplasten das Enzym Ferredoxin:Thioredoxin-Reduktase (FTR) gilt, von dem Thioredoxine *m* und *f* die Reduktionsequivalente übernehmen und auf Zielenzyme übertragen, sind Tests in einem komplett rekonstituiertem System mit FTR oder anderen natürlichen Reduktionsmitteln der Chloroplasten notwendig um konkrete Aussagen über die Funktion des *OEE*-Proteins bei der Stimulation der FbPase, NADP-MDH, der Protochlorophyllidreduktase und Hemmung der NiFe-Hydrogenase *in vivo* machen zu können.

4.2 Andere Fälle von Trx-„Simulation“

Unerwartete Fälle, in denen an sich funktionell eigenständige Proteine, wie *OEE*, redoxabhängige Enzyme in ihrer Aktivität beeinflussen sind kein Einzelfall.

Die Tatsache, dass neben *OEE* auch andere Chloroplastenproteine, wie die kleine Untereinheit der Rubisco (Jacquot *et al.*, 1983) oder CP12 (Wedel *et al.*, 1997; Popitz, Dissertation, 2002), die strukturell nichts mit der Thioredoxin-Familie gemeinsam haben, die gleichen Eigenschaften wie Hitze- und Säurestabilität und *in vitro* eine typisch thioredoxin-artige Redox-Modulation der Aktivität von Chloroplasten-Enzymen zeigen, lässt ältere Beobachtungen von L.E. Anderson und Mitarbeiter heute in neuem Licht erscheinen. Diese Autoren haben praktisch zeitgleich mit der Entdeckung der löslichen Thioredoxine *m* und *f* durch Buchanan *et al.* die Lichtregulation von Thioredoxin-Zielenzymen durch thylakoidmembran-assoziierte Proteinfractionen beschrieben, die als *LEMs*, (*light effect mediator*) und *protein-modulating factor* (Proteinmodulase) bezeichnet wurden (Anderson und Avron, 1976, Anderson *et al.* 1978, Ashton *et al.* 1980, Ashton und Anderson, 1981). Die Zusammensetzung dieser Fraktionen, die bei Gelfiltration in mehrere Proteine von ≤ 50 kDa trennbar waren, hing offenbar von der Art der Membranpräparation

und verschiedenen Salzkonzentrationen ab. Das System wurde später als ein Komplex aus Ferredoxin, FTR und Thioredoxin angesehen (Ford *et al.* 1987), was jedoch nicht alle darin enthaltenen Proteine erklärt. Eine endgültige Analyse unterblieb. Auch wenn in den *LEMs* ein Thioredoxin-System enthalten war, ist keineswegs ausgeschlossen, dass von Thylakoidmembranen abgelöste weitere Proteine wie z.B. *OEE* an der enzymmodulierenden Aktivität der Präparation beteiligt waren. Das *OEE*-Protein ist seinerzeit nicht in die Überlegungen einbezogen worden. Die Inaktivität des Spinat-*OEE*-Proteins *in vitro* in unseren Untersuchungen (Kap. 3.3.3) spricht nicht gegen eine Beteiligung, da es sich bei diesem Material um das reine rekombinante Protein handelte und nicht um ein aus Membranen präpariertes wie im Fall des *Scenedesmus-OEE*-Proteins, welches in der Lage ist sowohl die Spinat-FbPase wie die homologe *Scenedesmus*-FbPase zu stimulieren. Da die Tests von Anderson *et al.* unter Belichtung der Thylakoidmembransuspension und ohne Verwendung von künstlichen Reduktionsmitteln wie DTT durchgeführt wurden, wäre unter der Annahme, dass es sich an Stelle der Proteinmodulase um ein *OEE*-Protein handeln könnte gut vorstellbar, dass das *OEE*-Protein *in vivo* die Rolle des Modulators von Enzymen im Chloroplasten übernimmt.

Über die kleine Untereinheit der Rubisco (der Molmasse von 18 kDa) wurde berichtet, dass dieses Protein in der Lage ist die NADP- Malatdehydrogenase, nicht aber die FbPase, DTT-abhängig zu stimulieren (Jacquot *et al.*, 1983). Interessant ist, dass die kleine Untereinheit der Rubisco auch als Interaktionspartner mit immobilisiertem Trx *m* gezeigt werden konnte (Motohashi *et al.*, 2001). Damit stellt die kleine Untereinheit der Rubisco ein interessantes Protein dar, das mit dem Thioredoxin selbst sowohl auch mit dem Zielenzym eines Thioredoxins reagiert. Anhand der bekannten Aminosäuresequenz der kleinen Untereinheit der Rubisco kann man die 3D-Struktur des Proteins mit Hilfe des Rechenprogramms des *SWISS-MODEL Protein modelling Server* (<http://www.expasy.ch/swissmod/SWISS-MODEL.html>) errechnen lassen. Auf dem errechneten 3D-Modell befinden sich die vier Cysteinseitenketten in Abständen von mindestens 9,9 Å. Im Vergleich zu den Abständen zwischen den Cysteinen in Thioredoxinen (3,8 Å in der Dithiolform) wären diese in der kleinen Untereinheit allerdings nicht nahe genug zu einander um eine Intramolekulare Disulfidbrücke ausbilden zu können.

Daher könnte auch die Stimulation der MDH durch die kleine Untereinheit der Rubisco vielleicht nicht auf dem klassischen Mechanismus der Übertragung der

Reduktionsequivalente von dem Thioredoxin zum Zielenzym beruhen, sondern, wie oben beschrieben, ebenfalls auf spezifischen Oberflächen- und Konformationsänderungen im Zielenzym. Die Bindung der kleinen Untereinheit der Rubisco an ein modifiziertes und immobilisiertes Trx *m* (Motohashi *et al.* (2001) bleibt jedoch auch unter diesem Aspekt unerklärbar.

An dieser Stelle ist es notwendig, auch die von Whittaker und Gleason (1984) beschriebene Trx *f*-Aktivität eines 26 kDa Proteins (bestimmt mittels SDS-PAGE) aus *Anabaena* sp. PCC 7119 in die Diskussion einzubeziehen. Dieses Protein wurde als Thioredoxin *f* beschrieben, weil es effizient die Spinat-FbPase und nur schwach die Spinat-MDH stimuliert. Mit den homologen Ribonucleotidreductase und FbPase zeigte das *Anabaena*-Trx-*f* jedoch keine Aktivität. Auf Grund der Eigenschaften und der Aminosäurezusammensetzung des Proteins, waren die Autoren der Meinung, dass es sich um ein Protein mit unbekannten Funktionen handelt, das mit den klassischen Thioredoxinen keine strukturelle und evolutionäre Verwandtschaft hat.

Nachdem das *Scenedesmus* 28 kDa-Trx *f* als ein *OEE*-Protein identifiziert wurde, hat sich die Frage gestellt, ob es sich im Fall des *Anabaena* Proteins möglicherweise auch um ein *OEE*-Protein handeln könnte. Die Aminosäuresequenz des *OEE*-Proteins in *Anabaena* sp. PCC 7119 ist nicht bekannt, dafür in *Anabaena* sp. PCC 7120. Die vorhandene Aminosäuresequenz des *OEE*-Proteins aus *Anabaena* sp. PCC 7120, die bekannte Aminosäurezusammensetzung des 26 kDa-Trx *f* aus *Anabaena* PCC 7119 und deren Ähnlichkeit in beiden Stämmen ermöglichen einige Spekulationen zur Verwandtschaft dieser Proteine. Zum Vergleich wurden diese aus *Anabaena*, *Scenedesmus* und Spinat in Tab. 3.4 und 3.5 zusammengefasst. Einige Merkmale, wie die vergleichbare Molmasse, gleiche Anzahl der Cysteine und die Abnahme der Fluoreszenzmaxima bei 342 nm nach der Reduktion der Cysteine (Langlotz, 1986; Whittaker und Gleason, 1984) in beiden Trx *f* aus *Scenedesmus* und *Anabaena* (im Gegensatz zu normalen Thioredoxinen, wo sie zunimmt, wie bei dem Trx aus *E. coli*, oder unverändert bleibt, wie bei *Scenedesmus*-Thioredoxinen I, II, und III) sprechen dafür, dass diese Proteine verwandt sind. Nimmt man an, dass das *Anabaena*-Trx *f* ein *OEE*-Protein ist, dann wäre auch eine FbPase-Stimulation durch das *OEE*-Protein im Stamm 7120 zu erwarten, da die Stämme nahe verwandt sind. Diese Erwartung wird jedoch nicht erfüllt, da das Thioredoxin-Profil im Stamm 7120 von F. K. Gleason (1992) bereits beschrieben wurde und in dem Thioredoxinprofil kein 26 kDa Protein mit Trx *f*-Aktivität enthalten ist. Aber bei einer

Analyse der dortigen Reinigungsmethoden sieht man, dass die Fraktionen nach den chromatographischen Trennungen nicht mit FbPase getestet wurden, was bedeutet, dass eine Trx *f*-Aktivität des *OEE*-Proteins in diesem Stamm nicht auszuschließen ist. Die vermutete Identität des Trx *f* im Stamm 7119 mit dem *OEE*-Protein lässt sich jedoch nur durch Sequenzierung belegen.

4.3 Untersuchungen an anderen Grünalgen

Untersuchungen an anderen Grünalgen (*Chlorella* und *Chlamydomonas*) haben gezeigt, dass ähnlich wie in *Scenedesmus* Proteinfractionen im Molmassenbereich ≥ 23 kDa auftreten, die FbPase stimulieren können. Diese Stimulation bleibt nach der Alkylierung der Proteinproben erhalten (Abb. 3.24 und 3.25), wodurch ausgeschlossen werden kann, dass es sich in diesen Fraktionen um dimer vorliegende, über Disulfidbrücken verknüpfte „normale“ Thioredoxine handelt. Auch Tests auf Artefakte durch unspezifische Phosphataseaktivität waren in diesen Fraktionen negativ. Die Verteilung der Aktivität bei der Molekularsiebchromatographie nach der Alkylierung (Abb. 3.24 und 3.25) in Fraktionen mit unterschiedlichen Molmassen, ähnlich wie bei der Chromatographie der *Scenedesmus*-Proteinextrakte (Abb. 3.17), spricht dafür, dass es sich in diesen Fällen auch um *OEE*-Proteine handelt. In den beiden Algenextrakten waren jedoch gewisse Unterschiede zu beobachten. Die hitze- und säurebehandelte und nicht alkylierte Proteinfraktion aus *Chlamydomonas* zeigte nach der Molekularsiebchromatographie keine FbPase-Stimulation im Molmassenbereich 23-33 kDa. Diese war jedoch sehr deutlich zu beobachten in den gleich behandelten Fraktionen im Molmassenbereich 23 kDa aus *Chlorella*. Nach Alkylierung verschwand die Aktivität in diesem Molmassenbereich beim *Chlorella*-Protein, im *Chlamydomonas*-Proteinextrakt trat dagegen eine schwache Aktivität im Molmassenbereich 23 kDa auf. Gleichzeitig waren Aktivitäten auch in anderen Molmassenbereichen zu beobachten (Abb. 3.24 und 3.25). Dieses Verschwinden und Auftreten von Aktivitätspeaks im Elutionsprofil könnte man durch die bereits beschriebene Aggregatbildung erklären, die ein kompliziertes Verhalten bei der Molekularsiebchromatographie herbeiführt. Jedoch kann man im Fall der fraglichen *Chlorella*-Proteine auch die Existenz eines Fusionsproduktes oder inserierten Thioredoxinfragmentes mit einem anderen Protein (auch *OEE*) nicht ausschließen.

Dafür spricht das Ergebnis der ELISA-Tests, wobei das *Chlorella*-Protein eine Kreuzreaktivität mit Antikörpern gegen *E. coli*-Thioredoxin zeigte. Aktive Fraktionen des *Chlorella*-Proteins zeigten auf der SDS-PAGE Proteinbanden im Molmassenbereich 26 kDa. Immunologische Untersuchungen im Western-Blot zeigten andererseits in diesem Molmassenbereich keine Kreuzreaktion mit Antikörpern gegen Thioredoxin aus *E. coli*. Dieses zweideutige Ergebnis der immunologischen Untersuchung an dem *Chlorella*-Protein ermöglicht keine eindeutige Aussage über die Identität des Proteins mit *OEE*, obwohl die dafür sprechende Tatsachen im Übergewicht sind. Die Situation könnte offenbar endgültig nur durch eine Reinigung zur Homogenität und Sequenzierung des Proteins geklärt werden. Das gleiche gilt auch für das hier angesprochene *Chlamydomonas*-Protein. Ferner sollte man versuchen, die „wahre“ *OEE*-Aktivität der isolierten Proteinfractionen mit „Trx *f*-Aktivität“ durch Wiederherstellung der Sauerstoffentwicklung bei der Rekombinierung dieser Fraktionen mit zuvor von *OEE*-Protein befreiten PS II-Partikeln zu messen.

4.4 Physiologische Bedeutung der Thioredoxinaktivität des *OEE*-Proteins

Nach der in dieser Arbeit beschriebenen vergleichenden Suche nach Thioredoxin-Aktivitäten von *OEE* in Grünalgen und Spinat könnte es sein, dass die Doppelfunktion auf Chloroplasten der Algengattung *Scenedesmus* oder gar der Species *S. obliquus* beschränkt ist. Auch ohne mögliche Gründe für diese Sonderstellung zu diskutieren, ist dann noch kritisch zu fragen ob *S. obliquus* überhaupt chloroplastidäre „normale“ (12 kDa, *f*- und/oder *m*-Typ) Thioredoxine besitzt. In allen früheren Arbeiten (Langlotz, 1986; Langlotz *et al.*, 1986a; 1986b; Langlotz und Follmann, 1987; Wagner und Follmann, 1977; Wagner, 1978; Wagner *et al.*, 1978) wurden *keine* Proteine derartiger Natur neben dem 28 kDa-Trx *f* / *OEE* gefunden.

Da die Isoproteine I und II hohe H-Donor-Aktivität gegenüber der Algen-Ribonucleotidreduktase besitzen und dieses essentielle Enzym cytoplasmatisch lokalisiert ist, dürften Trx I und II ausscheiden. Gegen Trx III als Chloroplasten-Thioredoxin spricht die geringe Menge und Aktivität, doch ist seine Identität als mitochondriales Protein nicht bewiesen. Es ist auch vorstellbar, dass inaktive, defekte Trx-Proteine (Pseudogene) in der Alge vorhanden sind, deren Ausfall im

Chloroplasten durch eine Doppelfunktion von *OEE* kompensiert wird. Die fehlende Kenntnis von Genomsequenzen für Grünalgen macht eine Beantwortung solcher Fragen derzeit noch nicht möglich.

Dass das *Scenedesmus* *OEE*-Protein, das typische Eigenschaften eines Trx *f* aufweist, *in vivo* das fehlende „normale“ Trx-*f* ersetzt, oder zumindest eine regulatorische Funktion im Stoffwechsel ausübt wäre durchaus denkbar. Dafür spricht nicht nur die Tatsache, dass es *in vitro* mindestens vier chloroplastidäre Enzyme in ihrer Aktivität beeinflusst, sondern auch dass das Protein in hohen Mengen in gelöster Form vorliegt, allerdings im Thylakoidlumen (Ettinger und Theg, 1991) und nicht im Stroma, wo es die Enzyme in ihrer Aktivität beeinflussen könnte. Das Vorliegen eines Teils des Proteins in löslicher Form ist durch zusätzliche Funktionen, die diesem Protein in letzter Zeit zugeschrieben werden, erklärbar. Außer der Stabilisierung des Mn-Clusters im PS II wird neuerdings vermutet, dass es die Funktion eines *chaperons* übernimmt (Yamamoto, 2001), in der es erstens das zentrale D1-Protein, in dessen Nähe es am PS II angelagert ist, vor Hitze- und Lichtstress schützt, zweitens am *turnover* des lichtgeschädigten D1-Proteins teilnimmt. Das *OEE* bleibt mit dem D1 nach dem Verlassen des PS II so lange assoziiert, bis das D1 durch vermutlich stromale oder stromaseitig membran-assoziierte Proteasen (Ishikawa *et al.*, 1999; Ferjani *et al.*, 2001; Haussuhl *et al.*, 2001) abgebaut wird und verhindert so die weitere unspezifische Anlagerung des geschädigten Proteins an das PS II. Nach dieser Kenntnislage wäre es vorstellbar, dass unter Lichtstress nach dem Abbau des D1-Proteins das in löslicher Form in das Stroma freigesetzte *OEE*-Protein das Schlüsselenzym FbPase stimuliert und damit den Calvin-Cyclus beschleunigt. Das würde einen ungehinderten Elektronenfluss durch die Photosysteme ermöglichen und diese gleichzeitig bei Überbelichtung vor Schädigung bewahren. Damit wären beide Prozesse, in denen das gleiche *OEE*-Protein verwickelt ist, synchronisiert und widersprechen sich nicht. Problematisch bleibt bei dieser Vorstellung, ob die Proteine tatsächlich ins Stroma frei werden und dort die Enzyme des Calvin-Cyclus beeinflussen. Zumindest sprechen dafür die Tatsachen, dass bis jetzt kein Hinweis auf lumenale D1-abbauende Proteasen gefunden wurde (Yamamoto, 2001), und dass die PSII-Komplexe mit geschädigtem D1 aus den Grana in stromaexponierte Regionen der Thylakoidmembranen migrieren (Hundal *et al.*, 1990; Baena-Gonzalez *et al.*, 1999), was die Notwendigkeit

eines Kontaktes zum Stroma für die Reparatur des lichtgeschädigten PSII unterstreicht.

Welche Rolle in dieser Situation die Hemmung der Ni-Fe-Hydrogenase spielen könnte, benötigt weitere Überlegungen. Dieses Enzym ist vermutlich ein Relikt, das den Vorfahren dieser Grünalge molekularen Wasserstoff als Quelle für Reduktionäquivalente bei der Photoreduktion von CO_2 zu nutzen ermöglichte und somit die Überlebenschancen in anaerober Atmosphäre erhöhte. In der heutigen oxidierenden Atmosphäre gibt es kaum noch Biotope, wo Wasserstoff in höheren Konzentrationen vorkommt und diese Funktion verliert an Bedeutung. Jedoch wird diesem Enzym eine andere sehr nützliche Funktion zugeschrieben. Es wurde postuliert, dass unter anaeroben Bedingungen, die in stehenden Gewässern durchaus vorkommen können, das Enzym in die „umgekehrte Richtung“ arbeitet. Insbesondere bei Dunkel-Licht-Wechsel, wenn der NADPH-Pool vollständig reduziert vorliegt, aber die Enzyme des Calvin-Cyclus noch nicht ausreichend aktiviert wurden, dient die Wasserstoffbildung der *S. obliquus*-Alge als Ersatz für die O_2 -abhängige Mehler-Reaktion (Wünschiers *et al.*, 1999, 2001). Hierbei überträgt die Hydrogenase Elektronen von dem Ferredoxinpool auf Protonen unter H_2 -Bildung. Wenn der Calvin-Cyclus anläuft und das NADPH allmählich verbraucht wird, ist es sinnvoll, dass dieser „Überdruckventil“ durch das ins Stroma freigesetzte *OEE*-Protein abgeschaltet wird.

Nach dem Befund, dass *OEE* wahrscheinlich nicht über Cystein-Redoxwechsel wirkt, wird einerseits klar, warum die Hydrogenase, wie früher beobachtet, auch nicht auf das typische Reduktionsmittel DTT reagiert; andererseits ist auch unverständlich, warum reduzierte normale Thioredoxine (aus *E. coli* und cytoplasmatische aus *S. obliquus*) ebenfalls *in vitro* die Hydrogenase zu hemmen vermögen. Unklar ist auch, wie die Enzymaktivität in *beiden* Richtungen des Wasserstoffmetabolismus reguliert wird. Die Messung der Thioredoxin- bzw. der *OEE*-Effekte wurde aus methodischen Gründen nur in der Richtung des H_2 uptake (Photoreduktion von CO_2) unter hohem Wasserstoffpartialdruck gemessen; deren physiologische Bedeutung ist fraglich, und *OEE* kann unter diesen Bedingungen seine eigentliche Funktion (Beteiligung an der Sauerstoffentwicklung) gar nicht wahrnehmen. Es dürfte also ungeschädigt am PSII verbleiben und wird nicht frei zur Wechselwirkung mit Hydrogenase kommen.

Die hohe Aktivität und Spezifität der Wechselwirkung zwischen *OEE*-Protein und Hydrogenase aus *S. obliquus in vitro* lassen nichtsdestoweniger einen

physiologischen Zusammenhang beider Proteine im Chloroplasten erwarten. Aktivitätsmessungen mit *OEE* in Richtung der Photoproduktion von Wasserstoff, die experimentell schwierig sind und noch ausstehen, sollten mehr Aufschluss darüber geben.

4.5 *OEE*-Proteine und Thioredoxine: weitere Experimente und Überlegungen

Die Tatsache, dass aus Proteinextrakten einer Grünalge neben „klassischen“ Thioredoxinen *OEE* als ein bekanntes Protein des Photosystems II mit ebenfalls hoher Aktivität gegenüber typisch thioredoxin-modulierten Chloroplastenenzymen (und auch heterologen Proteinen) isoliert wird, wirft grundsätzliche Fragen über physiologische Aktivitäten und Spezifitäten der Enzymregulation in Chloroplasten auf. Während die in dieser Arbeit begründete überraschende Identität des zuerst als „28 kDa-Thioredoxin *f*“ bezeichneten Proteins mit *OEE* aufgrund der Aminosäuresequenzen feststeht, bleiben viele mechanistische Details offen, die nur in komplexen und aufwendigen Untersuchungen zu analysieren sind und hier nicht mehr begonnen werden können. Einige offene Fragen und Lösungsmöglichkeiten seien im Folgenden aufgezeigt.

Wirken chloroplastidäre Thioredoxine auf PS II bzw. OEE auf das chloroplastidäre Ferredoxin-Thioredoxin-System?

Die physiologischen Aktivitäten so komplexer Multiproteinpigmentaggregate wie PS II und des Fd:FTR:Trx-Systems sowie ihrer isolierten und getrennten Komponenten sind *in vitro*, und insbesondere kinetisch, nur sehr begrenzt zu verifizieren. So ist ein rekonstituiertes Ferredoxin:Thioredoxinreduktase(FTR)-Enzymssystem, in dem beispielsweise *OEE* auf Redoxwechsel analysiert werden könnte, nur sehr schwierig, wenn überhaupt in nativer Form zu etablieren und unterliegt vielen Störeinflüssen (Hast, 1994).

Lassen sich definierte aggregierte Molekülformen von OEE präparieren und mit Aktivitäten korrelieren?

Zur Beurteilung dieser Frage wäre eine eingehende Analyse der Kinetik der Aggregations/Dissoziationsgleichgewichte zwischen den bei der Gelfiltration

beobachteten Proteinfractionen erforderlich, die nach ihren Molmassen Monomere, Dimere und oligomere *OEE*-Spezies darstellen.

Welchen Einfluss haben Membranlipide auf OEE ?

Membranproteine, insbesondere membranständige Enzyme, die in wässrigem Milieu *in vitro* noch aktiv sind, benötigen oft zugesetzte Lipide, um „physiologische Bedingungen“ zu simulieren und *in vitro* maximale Aktivität zu entfalten. Die mitochondriale Cytochromoxidase und ihr Cardiolipin-Bedarf sind ein bekanntes Beispiel. Es wäre sinnvoll, die Thioredoxin-ähnliche Enzymaktivierung von *OEE* gegenüber Chloroplastenenzymen in Gegenwart von natürlichen und synthetischen Lipiden und Detergentien systematisch zu messen um mögliche Spezifitäten und kinetische Unterschiede zur Reaktion „normaler“ Thioredoxine aufzudecken.

Was bedeutet die Aktivität carboxymethylierter OEE-Proteine?

Die Carboxymethylierung essentieller Cysteine blockiert in aller Regel deren Funktionen. Im Fall der dennoch aktiven *OEE*-Proben (Kap. 3.4.1) steht eine quantitative Analyse des Carboxymethylierungsgrades (1 oder 2 Cysteine) des chemisch modifizierten Proteins aus, denn eine quantitative Alkylierung erfordert selbst bei „normalen“ Thioredoxinen optimierte Reaktionsbedingungen (Kallis *et al.*, 1980). Eine Quantifizierung wäre mit radioaktiv markierten Reagenzien wie [¹⁴C]-Iodessigsäure bzw. -Iodacetamid möglich. Blicke als Folge einer unvollständigen Alkylierung der Cysteinreste etwas (wenn auch wenig) *nicht* modifiziertes Protein in den Proben, so könnte deren Aktivität ähnlich wie von Häberlein *et al.* (1992) beschrieben auf eine Mischung von Redox- *plus* Protein-Protein-Wechselwirkung zurückgehen. Eine unvollständige Carboxymethylierung von Cystein-51 könnte auch den Misserfolg der Sequenzierung erklären, das fehlende zweite cysteinhaltige Peptid zu identifizieren.

5. Zusammenfassung

- Durch die in dieser Arbeit durchgeführte Sequenzierung an dem als 28 kDa Trx-*f* beschriebenen Protein aus der Grünalge *Scenedesmus obliquus* wurde festgestellt, dass dieses Protein mit dem als *OEE* bekanntem Protein 1 (auch Manganstabilisierendes Protein, *MSP*, oder 33 kDa Protein und *OEC* 33 genannt) aus dem Photosystem II identisch ist. Die früher postulierte Möglichkeit einer Fusion eines Thioredoxins mit einem Protein unbekannter Natur oder Insertion eines Thioredoxinfragments mit der typischen –WCGPC-Sequenz in ein solches Protein hat sich nicht bestätigt. Es wurden Aminosäuresequenzen von insgesamt 9 Peptiden, die durch tryptische Spaltung des Proteins erhalten wurden, identifiziert. Diese stellen 50 % der gesamten Proteinsequenz dar und sind gleichmäßig innerhalb dieser verteilt, so dass für Spekulationen über mögliche Fusionen oder Insertionen kein Spielraum mehr bleibt.
- Durch Anwendung einer anderen, auf das 33 kDa *OEE*-Protein ausgerichteten Präparationsmethode, die speziell für die Grünalge *Scenedesmus obliquus* angepasst wurde, konnte gezeigt werden, dass das „28 kDa-Trx *f*“ tatsächlich in den Thylakoidmembranen lokalisiert ist. Durch die Anwendung dieser neuen Präparationsmethode kann das Protein schnell (innerhalb eines Tages) und in hoher Reinheit aus den Thylakoidmembranfragmenten eines Algenrohhomogenats isoliert werden. Dabei bleibt die Fähigkeit des *OEE*-Proteins, das chloroplastidäre Enzym Fructosebisphosphatase zu stimulieren erhalten. Fraktionen mit FbPase-Stimulation, die nach zwei unterschiedlichen Methoden präpariert wurden, zeigen auf der SDS-PAGE identische Proteinbanden. Das ist eine zusätzliche Unterstützung für den Befund, dass das als 28 kDa-Trx *f* beschriebene Protein und das *OEE*-Protein 1 identische Proteine sind.
- Bei Thioredoxinen führt die S-Alkylierung der Cysteinreste im aktiven Zentrum normalerweise zu totalem Verlust der Fähigkeit Zielenzyme zu stimulieren. Versuche mit Alkylierung der Cysteine in *OEE*-Proteinfraktionen mit FbPase-Stimulation unter den gleichen Reaktionsbedingungen haben gezeigt, dass die Stimulationsfähigkeit des Proteins trotz Alkylierung erhalten bleibt. Das widerspricht dem klassischen Mechanismus der Stimulation durch Übertragung von Reduktionsäquivalenten von normalen Thioredoxinen auf Zielenzyme. Ob die Stimulation der FbPase auf einem

anderen Reaktionsmechanismus beruht (z.B. durch Veränderung der Konformation des Zielenzyms über Protein-Protein-Wechselwirkung), kann noch nicht beantwortet werden, da nicht analysiert wurde ob die Alkylierung der Cysteine im *OEE*-Protein unter diesen Bedingungen vollständig war.

- Es wurden auch die Grünalgen *Chlorella vulgaris* und *Chlamydomonas reinhardtii* auf außergewöhnliche Proteine mit Trx-*f* Aktivität untersucht. Insbesondere in *Chlorella vulgaris* findet sich eine ähnliche Situation wie in *Scenedesmus*, indem in der hitze- und säurestabilen Proteinfraction ein Protein mit vergleichbarer Molmasse (26 kDa, bestimmt durch SDS-PAGE) eine Stimulation der chloroplastidären Fructosebisphosphatase zeigt. In dem hitze- und säurestabilen Proteinextrakt aus *Chlamydomonas reinhardtii* wird solche Aktivität nicht beobachtet. Jedoch zeigen Proteinfractionen mit hohen Molmassen ≥ 23 kDa (bestimmt durch Molekularsiebchromatographie), die durch Butanolbehandlung des Rohhomogenates erhalten wurden, solche Aktivität. Alkylierungsversuche der Cysteine in Proteinfractionen mit FbPase-Stimulation beider Algen zeigen, dass diese ebenfalls wie in *Scenedesmus* erhalten bleibt, was auf eine Verwandtschaft dieser Proteine mit *OEE* hindeutet. Obwohl vieles dafür spricht, ist eine konkrete Aussage über die Verwandtschaft dieser Proteine in *Chlorella* und *Chlamydomonas* mit dem *OEE*-Protein nicht möglich, da diese Proteine noch nicht in ausreichenden Reinheit für eine Sequenzierung isoliert werden können.
- Eine Probe des rekombinanten, homogenen *OEE*-Proteins aus Spinat wurde auf Stimulation der chloroplastidären FbPase und NADPH-abhängigen MDH untersucht. Das Spinat *OEE*-Protein zeigt jedoch mit diesen Enzymen keine Aktivität.
- Da das *OEE*-Protein in *Scenedesmus* starke FbPase-Stimulation und nur schwache MDH-Stimulation zeigt, die anderen *Scenedesmus*-Thioredoxine mit normalen Molmassen (Trx I und II) jedoch starke MDH-Stimulation und hohe Aktivität mit Ribonucleotidreduktase zeigen, wird postuliert, dass das *OEE*-Protein die Funktion des Trx-*f in vivo* ersetzt. Angesichts der Tatsache, dass in dem Cyanobakterium *Anabaena sp.* PCC 7119 ebenfalls ein 26 kDa-Protein mit Trx *f*-Aktivität beschrieben wurde, das mit dem *Scenedesmus*-*OEE*-Protein identische Eigenschaften zeigt (z.B. ähnliche Aminosäurezusammensetzung, Abnahme der Tryptophanfluoreszenz bei der Reduktion der Cysteine) wird vermutet, dass es sich dort ebenfalls um ein *OEE*-Protein handelt.

6. Literaturstellen

- Adams, M.W. (1990) FEMS Microbiol. Rev. **75**, 219-238.
- Ädelroth, P., Lindberg, K., Andréasson, L.-E. (1995), Biochemistry **34**, 9021-9027.
- Akabori, K., Imaoka, A., Toyoshima, Y. (1984), FEBS Lett. **173**, 36-40.
- Anderson, L. E., Avron, M. (1976) Plant Physiol. **57**, 209-213.
- Anderson, L. E., Nehrlich, S. C., Champigny, M. L. (1978) Plant Physiol. **61**, 601-605.
- Andersson B, Åkerlund H.E. (1987), In: Topics in Photosynthesis, The Light Reactions, ed. J. Barber, **8**, 379-420, Elsevier, Amsterdam.
- Appel, L. und R. Schulz (1998) J. Photochem. Photobiol. B: Biology **47**, 1-11.
- Arnon D.I. (1949) Plant Physiol. **24**, 1-15.
- Ashton, A. R., Anderson, L. E. (1981) Biochim. Biophys. Acta **638**, 242-249.
- Ashton, A. R., Brennan, T., Anderson, L. E. (1980) Plant Physiol. **66**, 605-608.
- Baena-Gonzalez, E., Barbato, R., Aro, E.-M. (1999) Planta **208**, 196-204.
- Balmer, Y., Schürmann, P. (2001), FEBS Lett. **492**, 58-61.
- Balmer, Y., Stritt-Etter, A.L., Hirasawa, M., Jaquot, J.P., Keryer, E., Knaff, D.B., Schürmann, P. (2001) Biochemistry **40**, 15444-15450.
- Banze, M. (1995) Diplomarbeit, Universität Kassel.
- Banze, M. (1999) Dissertation, Universität Kassel.
- Banze, M., Follmann, H. (2000) J. Plant Physiol. **156**, 126-129.
- Barber, J., (1998), Biochim. Biophys. Acta, **1365**, 269-277.
- Barber, J., Andersson, B. (1992) Trends Biochem. Sci. **7**, 61-66.
- Ben-Amotz, A. (1979) In: Encyclopedia of Plant Physiology. Vol. **6**, Hrsg.: M. Gibbs und E. Latzko, Springer-Verlag, Berlin, 497-506.
- Ben-Amotz, A., Erbes, D.L., Riderer-Henderson, M.A., Peavey, D.G. und Gibbs, M. (1975) Plant Physiol. **56**, 72-77.
- Benemann, L.R. und N.M. Weare (1974a) Science **184**, 174-175.
- Benemann, L.R. und N.M. Weare (1974b) Arch. Microbiol. **101**, 401-408.
- Berstermann, A., K. Vogt, H. Follmann (1983) Eur. J. Biochem. **131**. 339-344.
- Betts, S.D., Lydakis-Simantiris, N., Ross, J.R., Yocum, C.F. (1998), Biochemistry **37**, 14230-14236.
- Betts, S.D., Ross, J.R., Hall, K.U., Pichersky, E., Yocum, C.F. (1996), Biochim. Biophys. Acta, **1274**, 135-142.
- Bhat, G., K. Iwase, B.W.C. Hummel. P.G. Walfisch (1989) Biochem. J. **258**. 785-792.

- Bishop, N.I. (1966) *Annu. Rev. Plant Physiol.* **17**, 185- 208.
- Bishop, N.I. und Gaffron H. (1962) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **8**, 471-476.
- Bishop, N.I. und Senger, H. (1971) *Meth. Enzymol.* **23**, 53-66.
- Bishop, N.I. und Wong, J. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* **234**, 433-455.
- Bishop, N.I., Frick, M. und Jones L.W. (1977) In: *Biological Solar Energy Conversion*. Hrsg.: A. Mitsui, S., A. San Pietro und S. Tamura, Academic Press, New York, 3-22.
- Bodenstein, J., Follmann, H. (1991) *Z. Naturforsch.* **46c**. 270-279.
- Boichenko, V.A., Hoffmann, P. (1994) *Photosynthetica* **30**, 527-552.
- Borthakur, D., Haselkorn, R. (1989) *Plant Mol. Biol.* **13**, 427-39.
- Bradford, M.M. (1976) *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Brandes, H.K, Larimer, F.W., Geck, M.K., Stringer, C.D., Schürmann, P., Hartman, F.C. (1993) *J. Biol. Chem.* **268**, 18411-18414.
- Breazeale, V.D., B.B. Buchanan, R.A. Wolosiuk (1978) *Z. Naturforsch.* **33c**, 521-528.
- Bricker, T.M., Frankel, L.K. (1998) *Photosynth. Res.* **56**, 157-173.
- Bricker, T.M., Odom, W.R., Queirolo, C.B. (1988), *FEBS Lett.*, **231**, 111-117.
- Britt, R.D. (1996) In *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*. Eds. DR Ort, CF Yocum, pp. 137-59. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- Buchanan, B., (1991) *Arch. Biochem. Biophys.* **288**, 1-9.
- Buchanan, B.B. (1980) *Annu. Rev. Plant Physiol.* **31**, 341-372.
- Buchanan, B.B., R.A. Wolosiuk, P. Schürmann (1979) *Trends Biochem. Sci.* **4**, 93.
- Buchheim, M.A., Chapman, R.L. 1991, *Biosystems* **25**, 85-100.
- Bunik, V., A. Shubnikowa, S. Loeffelhardt, H. Bisswanger, H.Q. Borbe, H. Follmann (1995) *FEBS Lett.* **371**, 167-170.
- Bunik, V., H. Follmann (1993) *FEBS Lett.* **336**, 197-200.
- Burnap, R.L., Sherman, L.A. (1991) *Biochemistry* **30**, 440-446.
- Cammack, R. (1995) *Nature* **373**, 556-557.
- Capitani,G., Markovic-Housley,Z., del Val,G., Morris,M., Jansonius,J.N. and Schürmann,P. (2000) *J. Mol. Biol.* **302**, 135-154.
- Chapman, R.L., Buchheim, M.A. (1992), *Biosystems* **28**, 127-137.
- Coleman, A.W. (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. US* **96**, 13892-13897.
- Dann, M.S., R.E. McCarty, (1992) *Plant Physiol.* **99**. 153-160.
- Decottignies, P., J.-M. Schmitter, S. Dutka, J.-P. Jacquot und M. Miginiac-Maslow (1991) *Eur. J. Biochem.* **198**, 505-512.
- Decottignies, P., J.-M. Schmitter, J.-P. Jacquot, S. Dutka, A. Picaud und P. Gadal (1990) *Arch. Bioch. Biophys.* **280**, 112-121.

- Deiss, L.P., A. Kimchi (1991) *Science* **252**, 117-120.
- Dyson, H.J., A. Holmgren, P.E. Wright (1988) *FEBS Lett.* **228**, 254-258.
- Dyson, H.J., A. Holmgren, P.E. Wright (1989) *Biochemistry* **28**, 7074-7087.
- Dyson, H.J., G.P. Gippert, D.A. Case, A. Holmgren, P.E. Wright (1990) *Biochemistry* **29**, 4129-4136.
- Edwards, G. E., Nakamoto, H., Burnell, J. N., Hatch, M. D. (1985) *Annu. Rev. Plant Physiol.* **36**, 255.
- Eklund, H., C. Cambillau, B.M. Sjöberg, A. Holmgren, H. Jornvall, J.-O. Höög, C.-I. Bränden (1984) *EMBO J.* **3**, 1410-1417.
- Eklund, H., F.K. Gleason, A. Holmgren (1991) *Proteins* **11**, 13-28.
- Enami, I., Kamo, M., Ohta, H., Takahashi, S., Miura, T., Kusayanagi, M., Tanabe, S., Kamei, A., Motoki, A., Hirano, M., Tomo, T., Satoh, K. J. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 4629-4634.
- Enami, I., Ohta, S., Mitsunashi, S., Takahashi, S., Ikeuchi, M., Katoh, S. (1992), *Plant Cell Physiol.* **33**, 291-297.
- Enami, I., Yoshihara, S., Tohri, A., Okumura, A., Ohta, H., Shen, J.R. (2000) *Plant Cell Physiol.* **41**, 1354-1364.
- Ettinger, W.F., Theg, S.M. (1991) *J. Cell Biol.* **115**, 321-328
- Ferjani, A., Abe, S., Ishikawa, Y., Henmi, T., Tomokawa, Y., Nishi, Y., Tamura, N., Yamamoto, Y. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1503**, 385-395.
- Fernandez, V.M., E.C. Hatchikian und R. Cammack (1985) *Biochem. Biophys. Acta* **832**, 69-79.
- Florencio, F.J., B.C. Yee, T.C. Johnson, B.B. Buchanan, (1988) *Arch. Biochem. Biophys.* **266**. 496-507.
- Follmann, H., (2000) In: *The Redox State and Circadian Rhythms*, Ed.: T. Vanden Driessche, Kluwer Academic Publishers, 59-83.
- Follmann, H., I.Häberlein (1996) *BioFactors* **5**, 147-156.
- Fontecilla-Camps, J.C. (1996) *J. Bioinorg. Chem.* **1**, 91-98.
- Ford, D. M., Jablonski, P. P., Mohamed, A. H., Anderson, L. E. (1987) *Plant Physiol.* **83**, 628-632.
- Forman-Kay, J.D., G.M. Clore, P.T. Wingfield, A.M. Gronenborn (1991) *Biochemistry* **30**, 2685-2698.
- Francis, K. (1989) *Photosynthetica* **23**, 43-48.
- Francis, K. und Senger, H. (1985a) *Plant Cell Physiol.* **26**, 1195-1198.
- Francis, K. und Senger, H. (1985b) *Physiol. Plant* **65**, 167-170.
- Gaffron, H. (1939) *Biol. Zentralblatt* **59**, 302-312.
- Gaffron, H. (1940) *Am. J. Bot.* **27**, 273-283.

- Gaffron, H. (1944) *Biol. Rev.* **19**, 1-20.
- Gaffron, H. und Rubin, J. (1942) *J. Gen. Physiol.* **26**, 219-240.
- Geck, M.K., Larimer, F.W., Hartman, F.C. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 24736-24740.
- Ghanotakis, D.F., Yocum, C.F. (1985) *Photosynth. Res.* **7**, 97-114.
- Gleason, F. K. (1992) *J. Bacteriol.* **174**, 2592-2598.
- Gleiter, H.M., Haag, E., Shen, J.R., Eaton-Rye, J.J., Inoue, Y., Vermaas, W., Renger, G. (1994) *Biochemistry* **33**, 12063-12071.
- Graf, E.-G. und Thauer, R.K. (1981) *FEBS Lett.* **136**, 165-169.
- Gurd, F. R. N. (1972) In: *Methods in Enzymology*; Ed. by Hirs, C. H. W. and Timasheff, S. N., **25**, 424-438.
- Häberlein, I., B. Vogeler (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1253**, 169-174.
- Häberlein, I., M. Wolf, L. Mohr, H. Follmann (1995) *J. Plant Physiol.* **146**, 385-392.
- Häberlein, I., Würfel, M., Follmann, H. (1992) *Biochim. Biophys. Acta* **1121**, 293-296.
- Hahn, D. und Kück, U. (1994) *Proc. Biochem.* **29**, 633-644.
- Hammel, K.E., B.B. Buchanan (1981) *FEBS Lett.* **130**, 88-92.
- Happe, T. und Naber, J.D. (1993) *Eur. J. Biochem.* **214**, 475-481.
- Happe, T., Mosler, B. und Naber, J.D. (1994) *Eur. J. Biochem.* **222**, 769-774.
- Harden, A. (1901) *J. Chem. Soc.* **79**, 610-628.
- Hast, T. (1994) Dissertation, Universität Kassel.
- Hast, T., Follmann, H. (1996) *J. Photoch. Photobiol. B.* **36**, 313-319.
- Haussuhl, K., Andersson, B., Adamska, I. (2001) *EMBO J.* **20**, 713-22.
- Healey, F.P. (1970) *Plant Physiol.* **45**, 153-159.
- Hiraoki, T., S.B. Brown, K.I. Stevenson. H.J. Vogel (1988) *Biochemistry* **27**, 5000-5008.
- Hofmann, R., W. Feller, M. Pries, H. Follmann (1985) *Biochim. Biophys. Acta* **832**, 98-112.
- Holmgren, A., (1972) *J. Biol. Chem.* **247**, 1992-1998.
- Holmgren, A., (1977) *J. Biol. Chem.* **252**, 4600-4606.
- Holmgren, A., (1985) *Annu. Rev. Biochem.* **54**, 237-271.
- Holmgren, A., (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 13963-13966.
- Holmgren, A., (1995) *Structure* **15**, 239-243.
- Houchins, J.P. (1984) *Biochim. Biophys. Acta* **768**, 227-255.
- Houchins, J.P. und R.H. Burris (1981) *J. Bacteriol.* **146**, 215-221.
- Hovemann, B., H. Follmann (1979) *Biochim. Biophys. Acta* **561**, 42-52.
- Huber, H.E., Russel, M., Model, P., Richardson, C.C. (1986) *J. Biol. Chem.* **261**, 15006-15012

- Hundal, T., Virgin, I., Styring, S., Andersson, B. (1990) *Bioch. Biophys. Acta* **1017**, 232-241.
- Huppe, C., F. Lamotte-Guery, J.-P. Jacquot und B.B. Buchanan (1990) *Planta* **180**, 341-351.
- Hutchison, R.S., Betts, S.D., Yocum, C.F., Barry, B.A. (1998), *Biochemistry*, **37**, 5643-5653.
- Inglis, A.S. (1983) In: *Methods in Enzymology*; Ed. by Hirs, C. H. W. and Timasheff, S. N., **91**, 26-36.
- Ishikawa, Y., Nakatani, E., Henmi, T., Ferjani, A., Harada, Y., Tamura, N., Yamamoto, Y. (1999) *Biochim. Biophys. Acta* **1413**, 147-158.
- Issakidis, E., Saarinen, M., Decottignies, P., Jacquot, J.P., Crétin, C., Gadal, P., Miginiac-Maslow, M. (1994) *J. Biol. Chem.* **269**, 3511-3517.
- Jacquot, J.P., Joly, C., Gadal, P. (1983) *Biochim. Biophys. Acta* **745**, 97-101.
- Jacquot, J.-P., P. Gadal, A.N. Nishizawa, B.C.Yee, N.A.Crawford, B.B. Buchanan (1984) *Arch. Biochem. Biophys.* **228**, 170-178.
- Jacquot, J.-P., Vidal, S., Gadal, P., Schürmann, P. (1978) *FEBS Lett.* **96**, 243-246.
- Jacquot, J-P., Lancelin, J-M., and Meyer Y. (1997) *New Phytol.* **136**, 543-570.
- Jansen, T., Rother, C., Steppuhn, J., Reinke, H., Beyreuther, K., Jansson, C., Andersson, B., Herrmann, R.G. (1987), *FEBS Lett.* **216**, 234-240.
- Jeng, M.-F., A. Holmgren, H.J. Dyson (1995) *Biochemistry* **34**, 10101-10105.
- Jeng, M.F., Campbell, A.P., Begley, T., Holmgren, A., Case, D.A., Wright, P.E., Dyson, H.J. (1994) *Structure* **15**, 853-868.
- Johnson, P.L., D'Oliveira, C.E., Gorell, T.E. und Muller, M. (1990) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**, 6097-6101.
- Johnson, T.C., K. Wada, B.B. Buchanan, A. Holmgren (1987) *Plant Physiol.* **85**, 446-451.
- Johnson, T.C., R.Q. Cao, J.E. Kung, B.B. Buchanan (1987) *Planta* **171**, 321-331.
- Kallis, G.B., A. Holmgren (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 10261-10265.
- Katti, S.K., D.M. LeMaster, H. Eklund (1990) *J. Mol. Biol.* **212**, 167-184.
- Kentemich, T., Haverkamp, G. und Bothe, H. (1990) *Naturwissenschaften* **77**, 12-18.
- Kessler, E. (1974) In: *Algal physiology and biochemistry*. Hrsg.: W.D.P. Stewart, Blackwell Scientific, Oxford, 456-473.
- Kessler, E., Arthur, W. und Brugger, J.E. (1957) *Arch. Biochem. Biophys.* **71**, 326-335.
- Konrad, A., (1993) *Dissertation, Universität Kassel.*
- Konrad, A., Banze, M., Follmann, H. (1996) *J. Plant. Physiol.* **149**, 317-321.
- Kotzabasis, K., Senger, H., Langlotz, P., Follmann, H. (1989) *J. Photochem. Photobiol.* **3**, 333-339.
- Kuwabara, T., Murata, T., Miyao, M., Murata, N. (1986), *Biochim. Biophys. Acta* **850**, 146-155.

- Kuwabara, T., Reddy, K.J., Sherman, L.A. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. **84**, 8230-8234.
- Lammers, M., Follmann, H. (1983) Structure and Bonding **54**, 27-91.
- Lämmli, U.K. (1970) Nature **227**, 680-685.
- Langlotz, P. (1986) Dissertation, Universität Marburg.
- Langlotz, P. und H. Follmann (1987) Z.Naturforsch. **42 c**, 1364-1366.
- Langlotz, P., Wagner, W. und Follmann, H. (1986a) Z. Naturforsch. **41c**, 275-283.
- Langlotz, P., Wagner, W. und Follmann, H. (1986b) Z. Naturforsch. **41c**, 979-987.
- Laurent, T.C., E.C. Moore, P. Reichard (1964) J. Biol. Chem. **239**. 3436-3444.
- Lennon, A.M. (1992) Eur. J. Biochem. **210**, 79-85.
- Li, D., Stevens, F.J., Schiffer, M., Anderson, L.E. (1994) Biophys. J. **67**, 29-35.
- Lichter, A. und I. Häberlein (1998) J. Plant Physiol. **153**, 83-90.
- Lien, S. und San Pietro, A. (1981) Biochem. Biophys. Res. Commun. **103**, 139-147.
- Lindmark D.G. und Muller, M. (1973) J. Biol. Chem. **248**, 7724-7728.
- Lindmark. D.G. und Muller, M. (1975) J. Protozool. **63**, 552-554.
- Lydakis-Simantiris, N., Hutchison, R.S., Betts, S.D., Barry, B.A., Yocum, C.F. (1999), Biochemistry **38**, 404-414.
- Marcus, F., S.H. Chamberlain, C. Chu, F.R. Masiarz. S. Shin, B.C. Yee, B.B. Buchanan (1991) Arch. Biochem. Biophys. **287**, 195-198.
- Marvin-Sikkema, F.D., Kraak, M.N., Vennhuis, M., Gottschal, J.C. und Prins, R.A.(1993) Eur. J. Cell Biol. **61**, 86-91.
- Mayes, S.R., Cook, K.M., Self, S.J., Zhang, Z., Barber, J. (1991), Biochim. Biophys. Acta **1060**, 1-12.
- Mayfield, S.P., Bennoun, P., Rochaix, J.D. (1987) EMBO J. **6**, 313-318.
- Mayfield, S.P., Schirmer-Rahire, G., Frank, H., Zuber, H., Rochaix, J.-D., (1989) Plant Mol. Biol. **12**, 683-688.
- Meissner, M., Stark, K., Cresnar, B., Kirk, D.L., Schmitt, R., (1999) Curr. Genet. **36**, 363-370.
- Mendiola-Morgenthaler, L., Leu, S., Boshetti, A. (1985) Plant Sci. **38**, 33-39.
- Mittard, V., Blackledge, M.J., Stein, M., Jacquot, J.P., Marion, D., Lancelin, J.M. (1997) Eur. J. Biochem. **243**, 374-383.
- Miyao, M., Murata, N. (1984), FEBS Lett. **170**, 350-354.
- Mora-Garcia, S., Ballicora, M.A., Wolosiuk, R.A. (1996) FEBS Lett. **380**, 123-126.
- Mora-Garcia, S., Rodriguez-Suarez, R., Wolosiuk, R.A. (1998) J. Biol. Chem. **273**, 16273-16280.
- Morell, S., H. Follmann, I.Häberlein (1995) FEBS Lett. **369**, 149-152.

- Motohashi, K., Kondoh, A., Stumpp, M.T., Hisabori, H. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 11224-11229.
- Murata, N. (1984), *FEBS Lett.*, **168**, 118-120.
- Murata, N., Miyao, M. (1985), *Trends Biochem. Sci.*, **10**, 122-124.
- Nield, J. (1997) <http://www.bc.ic.ac.uk/research/vanheel/group/research/ps2.html>.
- Nixon, P.J., Diner, B.A. (1992), *Biochemistry* **31**,942-948.
- Odom, W.R., Bricker, T.M. (1992), *Biochemistry* **31**, 5616-5620.
- Oh-Oka, H., Tanaka, S., Wada, K., Kuwabara, J., Murata, N. (1986). *FEBS Lett.* **197**, 63-66.
- Orr, M.D., E. Vitols (1966) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **25**, 109-115.
- Papen, H., Kentemich, T., Schmülling, T. und Bothe, H. (1986) *Biochimie* **68**, 121-132.
- Payne, M.J., Chapman, A. und Cammack, R. (1993) *FEBS Lett.* **317**, 101-104.
- Peterson, R. B. und Burris, R. H. (1978) *Arch. Microbiol.* **116**, 125-132.
- Philbrick, J.B., Diner, B.A., Zilinskas, B.A. (1991) *J. Biol. Chem.* **266**, 13370-13376.
- Popitz, H. (1997), Diplomarbeit, Universität Kassel.
- Putnam-Evans, C., Burnap, R., Wu, J., Whitmarsh, J., Bricker, T.M. (1996) *Biochemistry* **35**, 4046-4053.
- Putnam-Evans, C., Wu, J., Bricker, T.M. (1996) *Plant Mol. Biol.* **32**, 1191-1195.
- Qin, J., Clore, G.M., Groneborn, A.M. (1994) *Structure* **15**, 503-522.
- Rault, M., P. Gontero, J. Richard (1991) *Eur. J. Biochem.* **197**, 791-797.
- Rippka, R. und Waterbury, J.B. (1977) *FEMS Microbiol. Lett.* **2**, 83-86.
- Rivera-Madrid, R., Mestres, D., Marinho, P., Jacquot, J.P., Decottignies, P., Miginiac-Maslow, M. und Meyer, Y. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 5620-5624.
- Rother, T., Acker, G., Scheibe, R. (1988) *Bot. Acta* **101**, 311-320.
- Salamon, Z., Tollin, G., Hirasawa, M., Gardet-Salvi, L., Stritt-Etter, AL., Knaff, D.B., Schürmann, P. (1995) *Biochim. Biophys. Acta* **1230**, 114-118.
- Scheibe, R. (1981) *FEBS Lett.* **133**, 301-304.
- Scheibe, R. (1987) *Physiol. Plant.* **71**, 393.
- Scheibe, R. (1991) *Plant Physiol.* **96**, 1-3.
- Scheibe, R. (1994) *Naturwissenschaften* **81**, 443-448.
- Scheibe, R. (1996) *Biologie in unserer Zeit* **26**, 27-34.
- Scheibe, R., L.E. Anderson (1981) *Biochim. Biophys. Acta* **636**, 58-64.
- Schlegel, H.G. und Schneider, K. (1978) In: *Hydrogenases: their catalytic activity, structure and function*. Hrsg.: H.G. Schlegel, H.G. und Schneider, Erich Goltze KG, Gottingen, 15-44.
- Schmidt, A. (1981), *Z. Naturforsch.* **36c** 396-399.

- Schmidt, A., U. Christen (1978) *Planta* **140**, 239-244.
- Schnackenberg, J., Schulz, R. und Senger, H. (1993) *FEBS Lett.* **327**, 21-24.
- Schulz, R. (1996) *J. Mar. Biotechnol.* **4**, 16-22.
- Schwarz, O., Schürmann, P., Strothmann, H. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 16924-16927.
- Schwebke, C. (1997) Diplomarbeit, Universität Kassel.
- Schwenn, J.D., U. Schrieck (1984) *FEBS Lett.* **170**, 76-80.
- Schwenn, J.D., U. Schrieck (1987) *Z.Naturforsch.* **42c**, 93-102.
- Seidler, A. (1996), *Biochim. Biophys. Acta* **1277**, 35-60.
- Seidler, A. (1996), *Eur. J. Biochem.* **242**, 485-490.
- Senger, H. (1970) *Planta* **90**, 243-266.
- Senger, H. und Bishop, N.I. (1972) *Plant Cell Physiol.* **13**, 633-649.
- Senger, H. und Bishop, N.I. (1979) *Planta* **145**, 53-62.
- Senger, H. und Mell, V. (1977) In: *Methods in Cell Biology*. Hrsg.: D.M. Prescott, Academic Press, New York, 201-219.
- Shen, J.R., Burnap, R., Inoue, Y. (1995), *Biochemistry* **34**, 12661-12668.
- Siedler, F., Rudolph-Böhner, S., Doi, M., Musiol, H.-J., Moroder, L. (1993) *Biochemistry* **32**, 7488-7495.
- Sodamo, P., K.V.R. Chavry, A. Holmgren, B. Kren, J. A. Fuchs, K. Wüthrich (1991) *Eur. J. Biochem.* **200**, 369-377.
- Spiller, H., Bookjans, S., Shanmugam, K.T. (1983) *J. Bacteriol.* **155**, 129-137.
- Starck, H. (2001) Diplomarbeit, Universität Kassel.
- Stein, M., J.-P. Jacquot, E. Jeanette, P. Decottignies, M. Hodges, J.-M. Lancelin, V. Mittard, J.-M. Schmitter und M. Miginiac-Maslow (1995) *Plant Mol. Biol.* **28**, 487-503.
- Strecker, U. (1984) Dissertation, Universität Marburg.
- Strecker, U. und Senger, H. (1981) In: Hrsg.: G. Akoyunoglou, Balaban International Science Service, Philadelphia, 681-688.
- Stumpp, M.T., Motohashi, K., Hisabori, T. (1999) *J. Biochem.* **341** 157-163.
- Su, Q., Schumann, P., Schild, C., Boschetti, A. (1999) *Biochem. J.* **344**, 391-395.
- Suske, G., W. Wagner, H. Follmann (1979) *Z. Naturforsch.* **34c**, 214-221.
- Tanaka, S., Wada, K. (1988), *Photosynth. Res.* **17**, 255-266.
- Thelander, L., P. Reichard (1979) *Annu. Rev. Biochem.* **48**, 133-156.
- Tsang, M.L-S. (1981), *Plant Physiol.*, **68**, 1098-1104.
- Urbig, T., Schulz, R. und Senger, H. (1993) *Z. Naturforsch.* **48c**, 41-45.
- Van Langendonck, A., Vanden Driessche, T. (1992), *Arch. Biochem. Biophys.*, **292**, 156-164.

- Volbeda, A., Charon, M.-H., Piras, C., Hatchikian, E.C., Frey, M. und Fontecilla-Camps, J.C. (1995) *Nature* **373**, 580-587.
- Voordouw, G. (1992) *Adv. Inorg. Chem.* **38**, 397-422.
- Wagner, W. (1978) Dissertation, Universität Marburg.
- Wagner, W., Follmann, H. und Schmidt, A. (1978) *Z. Naturforsch.* **33c**, 517-520.
- Wagner, W., H. Follmann (1977) *Bioch. Biophys. Res. Comm.* **77**, 1044-1051.
- Wales, R., Newman, B.J., Rose, S.A., Pappin, D., Gray, J.C. (1989), *Plant Mol. Biol.* **13**, 573-582.
- Wangensteen, O.S., Chueca, A., Hirasawa, M., Sahrawy, M., Knaff, D.B., Lopez-Gorge, J. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1547**, 156-166.
- Ward, M.A. (1970a) *Phytochemistry* **9**, 259-266.
- Ward, M.A. (1970b) *Phytochemistry* **9**, 267-274.
- Wedel, N., Soll, J., Paap, B. K. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 10479-10484.
- Wenderoth, I., Scheibe, R., von Schwaen, A. (1997) *J. Biol. Chem.* **272**, 26985-26990.
- Whittaker, M.M. and Gleason, F.K. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 14088-14093.
- Wiegand, M., H.B. Ofenloch, K. Eisele (1989) *J. Steroid Biochem.* **32**, 53-58.
- Wolosiuk, R.A., B.B. Buchanan (1977) *Nature* **266**, 565-567.
- Wolosiuk, R.A., B.B. Buchanan (1978) *Plant Physiol.* **61**, 669-671.
- Wu, L.-F. und Mandrand, M.A. (1993) *FEMS Microbiol. Rev.* **104**, 243-270.
- Wünschiers, R. (1996) Diplomarbeit, Universität Marburg.
- Wünschiers, R. und R. Schulz (1998) *Biol. in unserer Zeit* **3**, 130-136.
- Wünschiers, R., Heide, H., Follmann, H., Senger, H., Schulz, R. (1999), *FEBS Lett.* **455**, 162-164.
- Wünschiers, R., Senger, H., Schulz, R. (2001) *Biochim. Biophys. Acta* **1503**, 271-278.
- Xu, Q., Nelson, J., Bricker, T.M. (1994) *Biochim. Biophys. Acta* **1188**, 427-431.
- Yamamoto, Y. (2001) *Plant Cell Physiol.* **42**, 121-128.
- Yamamoto, Y., Hermodson, M.A., Krogmann, D.W. (1986), *FEBS Lett.* **195**, 155-158.
- Yarlett, N., Orpin, C.G., Munn, E.E., Yarlet, N.C. und Greenwood, C.A. (1986) *Biochem. J.* **236**, 729-739.
- Zinn, T. (1994) Dissertation, Universität Marburg.
- Zinn, T., Schnackenberg, J., Haak, D., Römer, S., Schulz, R. und Senger, H. (1994) *Z. Naturforsch.* **49c**, 33-38.
- Zirngibl, C., Hedderich, R. und Thauer, R.K. (1990) *FEBS Lett.* **261**, 112-116.
- Zirngibl, C., van Dongen, W., Schwörer, B., von Büнау, R., Richter, M., Klein A. und Thauer, R.K. (1992) *Eur. J. Biochem.* **208**, 511-520.

Zouni, A., Witt, H.-T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., Orth, P. (2001) *Nature* **409**, 739-743.

Zubrzycki, I.Z., Frankel, L.K., Russo, P.S., Bricker, T.M. (1998) *Biochemistry* **37**, 13553-13558.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. H. Follmann für die interessante Aufgabenstellung, die freundliche Unterstützung und stete Gesprächsbereitschaft während dieser Arbeit.

Dem Fachgebiet Pflanzenphysiologie der Philipps-Universität Marburg, insbesondere Herrn Prof. Dr. R. Schulz und Dr. R. Wüschiers danke ich für die Bereitstellung der anaeroben Apparatur, des Enzyms Hydrogenase und freundliche Zusammenarbeit.

Der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, insbesondere Herrn Dr. Henryk Kalisz, gilt mein besonderer Dank für die Durchführung der Sequenzierung der Proteine.

Irmtraut Witzel danke ich für die Unterstützung bei der Anzucht der Algen und Erhaltung der Algenstämme.

Angelika Wattrodt, Dr. Dirk Stallmann, Holger Popitz und Holger Starck, Dr. Martina Banze, Thomas Brodegger, Frauke Tönsmann, Alexandra Shoubnikowa, Sabine Kögler, Frank Böttger und Dr. Jürgen Oberstraß danke ich für die angenehme Arbeitsatmosphäre und Hilfsbereitschaft.

Insbesondere danke ich meiner Ehefrau Helene für die Unterstützung während der Vorbereitung dieser Arbeit.