
Regulationsmechanismen des Kohlenhydratmetabolismus in Diatomeen

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
des Doktors der Naturwissenschaften
– Dr. rer. nat. –
an der Universität Konstanz

Dem Fachbereich der Biologie
vorgelegt von

Till Weber

Tag der mündlichen Prüfung: 07. Juli 2008

Referentin: Professor Dr. Iwona Adamska
Referent: Professor Dr. Peter G. Kroth

Inhaltsverzeichnis

Einleitung

1. <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	1
2. Endosymbionten Theorie	2
3. Chloroplasten der Chromalveolaten	5
4. Zielsetzung dieser Arbeit	8

Kapitel 1 **Calvin Zyklus Modell der Diatomeen *Phaeodactylum tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana***

1. Einleitung	9
1.1 Calvin Zyklus	10
1.2 Ferredoxin/Thioredoxin-System	12
1.3 Glutathion	14
1.4 Peroxiredoxine	16
1.5 Glutaredoxine	18
1.6 CP12	19
2. Ergebnisse	21
2.1 Genomanalyse	21
2.1.1 Calvin Zyklus Modell in <i>Phaeodactylum tricornutum</i> und <i>Thalassiosira pseudonana</i>	21
2.1.2 Regulationsproteine	27
2.2 Lokalisationsexperimente	29
2.3 Phylogenetische Analysen und Vergleich der Aminosäuresequenzen	36
2.3.1 Calvin Zyklus Enzyme	36
2.3.2 Ferredoxin/Thioredoxin-System	42
2.3.3 Peroxiredoxine	46
3. Diskussion	51
3.1 Calvin Zyklus	51
3.2 Regulationsfaktoren des Calvin Zyklus	53

Kapitel 2 Identifizierung von möglichen Zielproteinen von Thioredoxin F in *Phaeodactylum tricornutum*

1. Einleitung	56
2. Ergebnisse	60
2.1 Aufreinigung von Thioredoxin Typ F und Thioredoxin Typ M	60
2.2 <i>In vitro</i> Reduktionstest	62
2.3 Affinitätschromatographie	64
2.4 Identifizierung der eluierten Proteine	65
3. Diskussion	77
3.1 <i>In vitro</i> Reduktionstest	77
3.2 Sequenzanalyse der Zielproteine	77

Kapitel 3 Regulation der Calvin Zyklus Enzyme über Transkriptionslevel und Aktivitäten der Fruktose-1,6-Bisphosphatasen von *Phaeodactylum tricornutum*

1. Einleitung	81
2. Ergebnisse	83
2.1 Überexpression von FBPC3	83
2.2 <i>In vitro</i> Reduktion	85
2.3 Enzymassay von Gesamtzellextrakt aus <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	85
2.4 Gentranskription Analyse der Calvin Zyklus Enzyme mit der Real-Time PCR	91
3. Diskussion	98
3.1 Enzymassay	98
3.2 Transkriptionsraten der Enzyme von RPP und OPP und der Thioredoxine	101

Diskussion	103
-------------------	------------

Zusammenfassung	108
Summary	109
Material und Methoden	
1. Sequenzanalyse und Genannotierung	110
2. Standard PCR	111
3. Mutagenese PCR	112
4. Plasmidkonstrukte	113
5. Vektortransformation	115
6. Mikroskopie	115
7. Phylogenie- und Sequenzanalyse	116
8. Bakterienstämme	118
9. Plasmide	119
10. Antikörper	119
11. Proteine	119
12. Kulturbedingungen von <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	119
13. Überexpression von Thioredoxine Typ F	120
14. Aufreinigung von überexprimierten Proteinen aus <i>E. coli</i>	120
15. Auftrennung von Thioredoxin Typ F mit hydrophobischer Interaktionschromatographie (HIC)	121
16. Bindung des Thioredoxine F (C2S) an CNBr-aktivierte Sephrose 4B und Sammeln von Zielenzymen aus <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	122
17. Proteinfällung	122
18. Proteinsequenzierung	123
19. <i>In vitro</i> Reduktionstest	123
20. Überexpression von Fructose-1,6-bisphosphatase C3	123
21. Aufreinigung von überexprimierten FBPC3 aus <i>E. coli</i> -Zellen	124
22. Entsalzung von FBPC3	124
23. Konzentrationsmessung von Proteinen	125
24. Enzymatische Assay der FBPC3	125
25. Western Blot	127

26. RNA Extraktion	128
27. Real-Time PCR	129
Anhang: Tabellen	133
Literaturverzeichnis	139
Veröffentlichung	161
Danksagung	162
Erklärung	163

Einleitung

1. *Phaeodactylum tricornutum*

Die einzellige, eukaryotische, photoautotrophe Diatomee (Kieselalge; Abteilung Stramenopiles, Klasse Bacillariophyta) (van den Hoek *et al.* 1993) *Phaeodactylum tricornutum* ist eine maritim ubiquitär vorkommende Alge. Sie ist ein Mikroorganismus mit oxygener Photosynthese; die Photosynthese in den Plastiden geht auf die aufgenommenen Cyanobakterien zurück (Sato 2001, Stoebe und Maier 2002). Diatomeen kommen entweder solitär schwebend in offenen Weltmeeren, in den intertidalen Wattsedimenten oder sogar im Süßwasser vor oder aggregieren zu Zellketten, Zellhaufen oder Zellverbänden auf Oberflächen zu Biofilmen zusammen (Mann 1999). Diatomeen und Cyanobakterien gehören zu den am meisten vorkommenden Spezies im Phytoplankton. Sie produzieren jährlich 20% der Nettoprimärproduktion weltweit, was in etwa der Masse des Regenwaldes entspricht (van den Hoek *et al.* 1997; Field *et al.* 1998), bzw. wird bis zu 40% der CO₂-Fixierung in den Weltmeeren durch Diatomeen durchgeführt (Falkowski *et al.* 1998) und sind dadurch ein wichtiger Faktor in der Speicherung von CO₂ (Smetacek 1999). Die Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* hat eine ungefähre Größe von nur 20 µm und kann eine dreihörnige (*tricornutum*), eine fusiforme Form (siehe Abbildung 1) oder eine ovale Form besitzen.

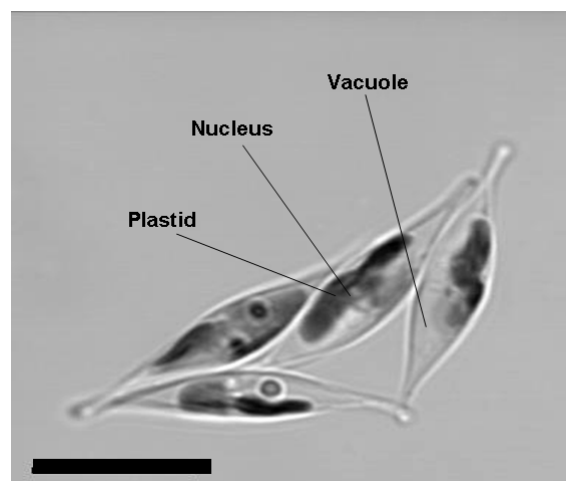


Abb. 1: Lichtmikroskopische Aufnahme der pennaten Diatomee *Phaeodactylum tricornutum* in fusiformer Wachstumsform. Der Balken entspricht einer Größe von 10 µm.

Diatomeen bilden intrazellulär das Silikat, welches außen zu Silikathüllen (Frustules) aus Silikat, Polysacchariden und Proteinen zusammengesetzt wird (Vrieling *et al.* 1999), welche die Zelle anschließend umgibt. Bei Zellteilung werden die aus zwei Hälften bestehenden Silikathüllen an die Tochterzellen weitergegeben. Die obere, größere Silikathüllenhälfte wird Epitheka, die untere kleinere Silikathüllenhälfte wird Hypotheka genannt. Die Zelllinien, welche die Hypotheka erhalten, werden immer kleiner. Die Verkleinerung der Tochterzelllinie wird erst durch sexuelle Vermehrung unterbrochen. Diese Silikathüllen sind so präzise geformt, daß danach diese Algengruppe taxonomisch eingeteilt werden kann (Round *et al.* 1990). Die Diatomeen, darunter *P. tricornutum*, gehören in die Algengruppe der Heterokonten (Stramenopiles). Diatomeen werden in zentrische und pennate Gruppen eingeteilt. Zentrische Diatomeen haben eine Radial-Symmetrie ihrer Kieselschalen, während die pennaten Diatomeen bilateral symmetrisch sind (Round *et al.* 1990; Kooistra *et al.* 2003).

2. Endosymbionten Theorie

Die Algen sind in ihrer molekularen, physiologischen und strukturellen Anordnung ein Produkt der Endosymbiose. Die „Endosymbiontentheorie“ besagt, daß photoautotrophe, eukaryotische Organismen durch eine Aufnahme eines photosynthetisch aktiven Cyanobakteriums durch eine heterotrophe Wirtszelle entstanden sind (Delwiche 1999, Keeling *et al.* 2004, Kroth 2002, Turner *et al.* 1999) (siehe Abbildung 2).

Dieses Ereignis wird auch „primäre Endosymbiose“ genannt. Das aufgenommene Cyanobakterium verlor sein Genom, indem fast alle Gene in das Genom der Wirtszelle transferiert wurden (siehe Abbildung 3). Warum dieser Gentransfer stattfand, wird noch heftig diskutiert (Keeling 2004). Für das „Wie“ gibt es verschiedene Möglichkeiten, unter anderem etwa durch Fragmentierung von DNA und anschließende willkürliche Einfügung der cyanobakteriellen genomischen DNA in das Genom der neuen Wirtszelle ohne Benötigung von Enzymen, ähnlich wie es mit der Transformation von eukaryotischen Zellen im Labor geschieht (Daniell 1997). Dass diese neue Gene von dem Genom der Wirtszelle beibehalten und nicht entfernt worden sind, kann verschiedene Gründe haben. Die kernkodierte plastidäre Proteine werden mit einem N-terminalen Transitpeptid in den Chloroplasten über TIC und TOC Transporter transportiert (Keeling 2004, Kroth 2002, McFadden 1999). Aus

dieser ersten Endosymbiose entstanden die Grün- und Rotalgen, sowie die Glaucophyten (siehe Abbildung 2).

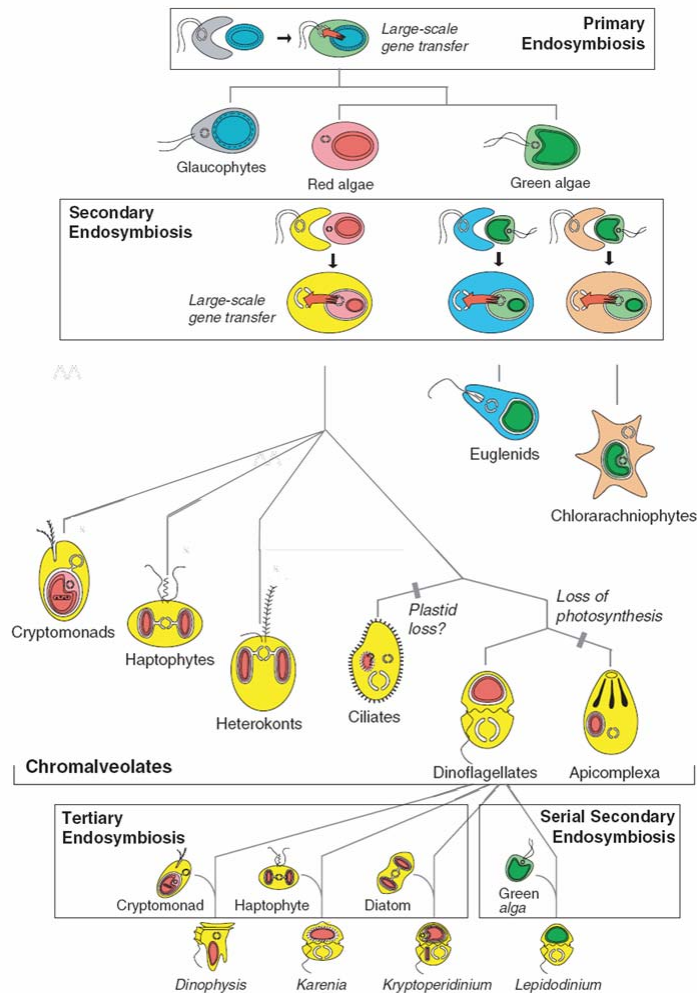


Abb. 2: Algenevolution in der „Endosymbiontentheorie“. Oben ist die erste Endosymbiose (primary Endosymbiosis) dargestellt, bei der ein Cyanobakterium durch eine eukaryotische Wirtszelle aufgenommen wurde. Das Genom des Endosymbionten (Cyanobakterium) wurde reduziert, die Gene in das neue Wirtsgenom transferiert (roter Pfeil), bzw. wurde der Endosymbiont zum neuen Organell (Plastid) reduziert. Von diesem ersten endosymbiotischen Prozess stammen so die Glaucophyten, Rotalgen und Grünalgen und die anderen Algen ab (davon abgeleitet die Landpflanzen, nicht eingezeichnet). Diese primären Rot- und Grünalgen wurden bei der zweiten Endosymbiose (in der Mitte) wieder durch eine Wirtszelle aufgenommen, die Organellen reduziert und das erste Wirtsgenom wieder in das zweite, neue Wirtsgenom transferiert. Die Grünalgen wurden in zwei unabhängigen Prozessen aufgenommen, wodurch die Euglenophyta (türkis) und die Chlorarachniophyten (orange) entstanden. Eine aufgenommene Rotalge ist Ausgangspunkt für die artenreiche Gruppe der Chromalveolaten (gelb). In dieser Gruppe wurden teilweise die Plastiden (Ciliaten, evtl. auch in anderen Arten), bzw. die Möglichkeit zur Photosynthese (Apicomplexa) sekundär wieder verloren. Es ist möglich, daß die Dinoflagellaten ihre Plastiden mehrmals ausgewechselt haben. Es gibt noch eine dritte Endosymbiose (unten), durch die Aufnahme von verschiedenen Chromalveolaten (Cryptomonade, Haptophyte und einer Diatomee (Heterokont)) durch eine Dinoflagellate, oder eine serielle sekundäre Endosymbiose einer Grünalge durch eine eukaryotische Dinoflagellate (unten). Modifiziert nach Keeling *et al.* (2004).

Die Glaucophyten besitzen die ursprünglichsten Plastiden (Keeling 2004). Aus den Grünalgen (Chlorophyta) entstanden weiter auch die Landpflanzen (Delwiche 1999). Die Grünalge wurde bei zwei unabhängigen Endosymbiosen wieder durch eine heterotrophe Wirtszelle aufgenommen (sekundäre Endocytobiose) (Keeling *et al.* 2004), wodurch die Euglenophyten und die Chlorarachniophyten entstanden. Rotalgen wurden ebenfalls durch eine heterotrophe Wirtszelle aufgenommen und bis auf die Plastiden reduziert. Das komplette Rotalgen- und nur teilweise das Plastidengenom wurden in das neue Genom transferiert (siehe Abbildung 3). Es entwickelten sich so die Cryptomonade, die Haptophyten, die Heterokonten (hierzu gehören auch die Diatomeen *P. tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana*) (Andersen 2004), die Ciliaten, die Dinoflagellaten und die Apicomplexa (Cavalier-Smith 1999).

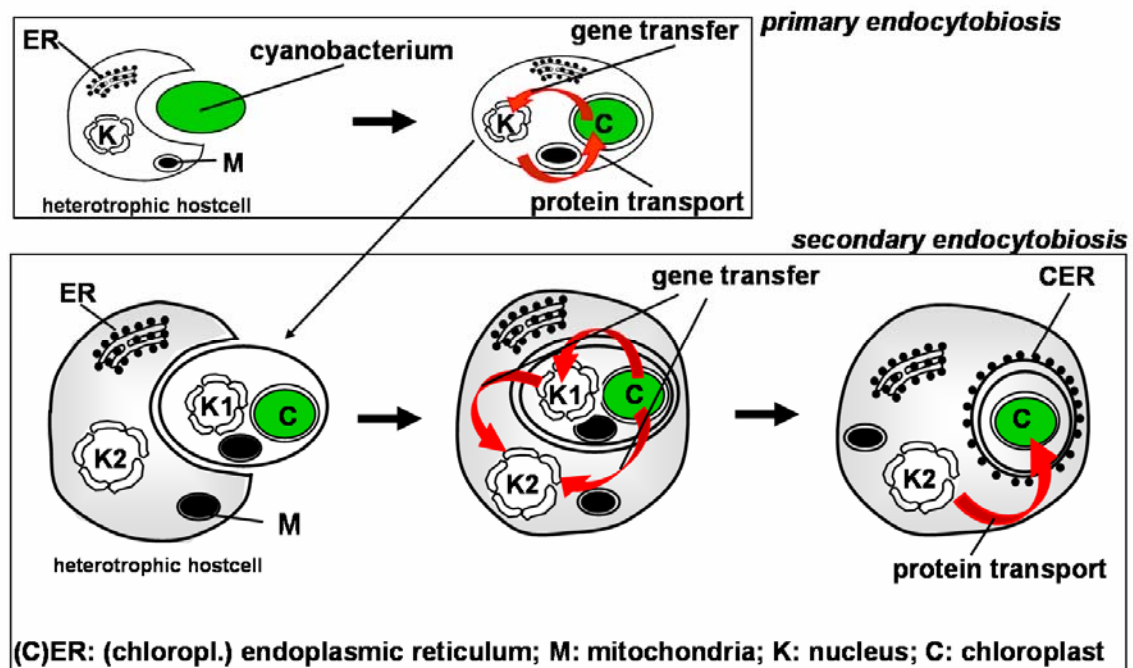


Abb. 3: Mögliche Ereignisse zur Entstehung des Plastids während der ersten und zweiten Endocytobiose. Nach der Aufnahme eines Cyanobakterium in eine heterotrophe Wirtszelle (heterotrophic hostcell) fand ein Gentransfer (roter Pfeil) von der aufgenommenen Zelle in den Kern (K) der Wirtszelle statt (oberer Kasten). Um benötigte Proteine vom Wirtszellen-Kern im Chloroplasten (C) zu bekommen, wurden spezielle Proteintransportmechanismen aus dem Cytosol in den Chloroplasten entwickelt (siehe Text). Bei der zweiten Endocytobiose (unterer Kasten) wurde der photosynthetische Eukaryot durch eine weitere heterotrophe Wirtszelle aufgenommen (hier ein Heterokont). Während der Umstrukturierung der Endosymbionten wurden wieder viele Gene aus dem Kern (K1) der ersten Wirtszelle in das Genom (K2) der zweiten Wirtszelle transferiert (rote Pfeile), bzw. vom Kern des Chloroplasten (C) direkt in den Wirtsgenom (K2). Die cytosolischen Organellen des Eukaryoten wurden alle reduziert, abgesehen von den Chloroplasten. Kernkodierte plastidäre Proteine werden durch vier Membranen mittels eines Signal- und Transitpeptides transportiert. In Heterokonten ist die äußere Membran mit Ribosomen assoziiert und wird deswegen chloroplastidäres Endoplasmatisches Retikulum (CER) genannt. M: Mitochondrium, ER: Endoplasmatisches Retikulum, C: Chloroplast, K: Kern. Modifiziert nach Kroth (2002).

Diese Algenarten werden in der Gruppe der Chromalveolaten zusammengefasst. Durch den Gentransfer aus dem Kern der aufgenommenen Zelle in das Genom der neuen Wirtszelle, sind bei den Cryptomonade, Haptophyten und den Heterokonten einige Proteine der Rotalge durch Proteine der Wirtszelle ersetzt worden (Gross *et al.* 1999, Keeling 2004, Martin und Schnarrenberger 1997). So wurde die plastidären für den Calvin Zyklus benötigten Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und die Fruktose-1,6-Bisphosphat Aldolase (FBA) durch wirtseigene gleiche Proteine ersetzt, neben den schon vorhandenen cytosolischen Proteinen für die Glykolyse (Fagan *et al.* 1998, Fast *et al.* 2001, Liaud *et al.* 2000). Teilweise erfolgte dies auch schon in den Rotalgen (Rogers und Keeling 2003). Damit diese kernkodierte Proteine in den Chloroplasten gelangen, besitzen sie N-terminal eine Signal- und eine Transitpeptidsequenz (Gruber *et al.* 2007, McFadden 1999, Keeling 2004, Kilian und Kroth 2005). Der Proteintransport durch die vier verschiedenen Membranen ist teilweise noch nicht ganz geklärt (Sulli *et al.* 1999, Nassoury *et al.* 2003, Kilian und Kroth 2005, Gruber *et al.* 2007).

Die Ciliaten haben sekundär möglicherweise ihre Plastiden wieder abgestoßen (Keeling *et al.* 2004, Keeling 2004), bzw. konnte keine plastidären Gene im sequenzierten Genom der Ciliate *Tetrahymena thermophila* gefunden werden (Eisen *et al.* 2006), die Apicomplexa haben die Möglichkeit zur Photosynthese verloren, obwohl sie noch ein reduziertes Plastid und Plastidengenom besitzen (Foth und McFadden 2003). Einige Dinoflagellaten haben offenbar ihren Plastiden gegen neue Endosymbionten eingetauscht (Saldarriaga *et al.* 2001). Dies geschah durch die Aufnahme einer primären Grünalge (Serielle sekundäre Endosymbiose) oder durch die Aufnahme eines anderen Chromalveolaten (dritte Endosymbiose), wie etwa eines Cryptomonade, einer Haptophyte oder einer Diatomee (Heterokont) (siehe Abbildung 2).

3. Chloroplasten

Die Chloroplasten sind von Grünalgen abgeleitet (Keeling *et al.* 2004, Keeling 2004, Kroth 2002). Sie besitzen zwei Membranen, welche noch von den aufgenommenen gram-negativen Cyanobakterien abstammen (Jarvis und Soll 2001). Beim Cyanobakterium ist zwischen den zwei Membranen zusätzlich Peptidoglycan vorhanden. Dieses prokaryotische Peptidoglycan ist nur noch bei den Plastiden der Glaucophyten vorhanden (Kroth 2002, Keeling 2004) (siehe Abbildung 4).

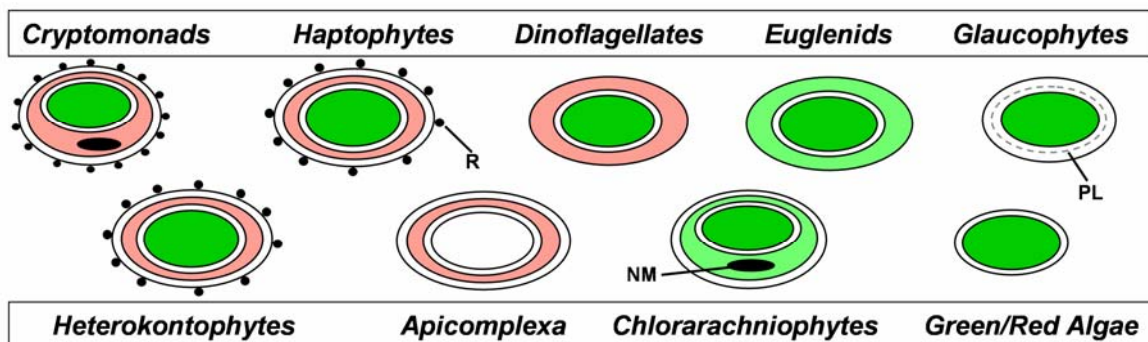


Abb. 4: Schema der Plastidenstruktur der verschiedenen Algengruppen. Die Primärchloroplasten (dunkel grün) der Grün- und Rotalgen, sowie der Glaucophyten weisen nur zwei Membranen auf. Die Glaucophyten besitzen noch zusätzlich die cyanobakterielle Peptidoglycanschicht (PL, peptidoglycan layer). Die Euglenophyta und Chlorarachniophyten haben die aufgenommene Grünalge zu Plastiden reduziert. Die Plastiden der Euglenophyta haben nur noch drei Membranen, die der Chlorarachniophyten vier mit einem stark reduziertem Nucleomorph (NM). Das übriggebliebene Nucleomorph ist das stark reduzierte Genom der aufgenommenen Alge. Der Zwischenraum zwischen der zweiten und dritten Membran (periplastidärer Raum) ist das ursprüngliche Cytosol der Grünalge (grünlich). Die Chromalveolaten Cryptomonaden, Haptophyten, Dinoflagellaten, Heterokontophyten und Apicomplexa haben die aufgenommene Rotalge zum Plastiden reduziert. Dinoflagellaten haben viele verschiedene Formen von Plastiden, die hier dargestellte Form kommt am meisten vor. Der Zwischenraum (periplastidärer Raum) zwischen der zweiten und dritten Membran ist das ursprüngliche Cytosol der Rotalge (rötlich). Nur die Cryptomonaden haben noch einen sehr stark reduzierten Nucleomorph vorhanden. Die Haptophyten und Heterokontophyten haben an der äußersten Membran noch Ribosomen (R) anhängen. Die Apicomplexa hat die Möglichkeit zur Photosynthese verloren (weiß). Modifiziert nach Kroth (2002).

Die Grün- und Rotalgen haben, wie die Glaucophyten zwei Membranen um die Plastiden, aber ohne Peptidoglycanschicht (siehe Abbildung 4). Bei allen Plastiden ist ein stark reduziertes Genom noch vorhanden. Auf diesen ist unter anderem die kleine (Boczar *et al.* 1998, Hwang und Tabita 1991) und große Untereinheit (Du *et al.* 2000, Hwang und Tabita 1991) der Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RUBISCO) kodiert, bei Grünalgen ist u.a. das Gen *rbcS* für die kleine Untereinheit der RUBISCO kerncodiert (Du *et al.* 2000). Die Wirtszelle hat die Plastiden, bzw. Endosymbionten aller Wahrscheinlichkeit nach phagozytotisch aufgenommen. Die phagozytotische Membran der ersten Wirtszelle ist bei den Plastiden der Grün- und Rotalgen vermutlich nicht mehr vorhanden, bei den Glaucophyten hat sie die äußere der beiden Membranen ersetzt (Keeling 2004,

Steiner und Löffelhardt 2002). Die Plastiden der Glaucophyten sind die ursprünglichste Form, gegenüber den Plastiden der Grün- und Rotalgen.

Die Plastiden der Chromalveolaten sind das Ergebnis der zweiten Endocytobiose. Durch die phagozytotische Aufnahme einer Rotalge durch eine zweite heterotrophische Wirtszelle, umgeben nun den Plastiden drei bis vier Membranen. Die inneren ersten beiden Membranen stammen von den Plastiden der Rotalge, bzw. von den prokaryotischen Cyanobakterien. Die dritte Membran, von innen gezählt, ist die cytoplasmatische, ehemals äußerste, Membran der Rotalge. Die vierte und äußerste Membran der Plastiden stammt von der Aufnahme in einer phagozytotischen Vakuole der zweiten Wirtszelle ab (Archibald und Keeling 2002). Der Raum zwischen der zweiten und dritten Membran ist das ehemalige Cytosol der Rotalge (siehe Abbildung 4, rötlich) und wird als periplastidärer Raum (pps, periplastidic space) bezeichnet (Gillot und Gibbs 1980, Hansmann *et al.* 1987, Ludwig und Gibbs 1989, Keeling 2004). Bei den Plastiden der Heterokontophyten und Haptophyten sind an der äußeren Membran Ribosomen (R) assoziiert (siehe Abbildung 4). Weil diese äußere Membran auch mit dem Endoplasmatischen Retikulum (ER) verbunden sein kann (Ishida *et al.* 2000), wird die plastidäre äußere Membran auch als chloroplastidäres ER (CER) bezeichnet (Bouck 1965, Gibbs 1981). Die Peridinin-haltigen Plastiden von Dinoflagellaten sind nur durch drei Membranen umgeben (Keeling 2004). Sie haben eine dritte Endosymbiose mit anderen Chromalveolaten durchgeführt und eine serielle zweite Endosymbiose mit Grünalgen eingegangen (Hackett *et al.* 2004) (siehe Abbildung 2).

Durch den häufig stattgefundenen Transfer der plastidär kodierten Gene, bzw. der kernkodierten Gene der Rotalge in das Genom der zweiten Wirtszelle, sind sehr viele im Plastiden benötigten Proteine umstrukturiert oder durch die proteinkodierenden Gene der Wirtszelle ersetzt worden (Kroth 2002). Die Nucleomorphe in den Cryptomonaden und den Chlorarachniophyten sind wohl noch ein Relikt des sich noch im Prozess befindenden Gentransfer (Kroth 2002).

4. Zielsetzung dieser Arbeit

Bisher konnte gezeigt werden, daß sich der Calvin Zyklus in Diatomeen-Plastiden prinzipiell wie in Plastiden höherer Pflanzen erfolgt, es aber einige wichtige Unterschiede gibt (Michels *et al.* 2005). Der Calvin Zyklus kann in zwei Bereiche gegliedert werden: den reduktiven Pentose Phosphatweg (RPP, reductive pentose phosphate pathway) und den oxidativen Pentose Phosphatweg (OPP). Bei der Diatomee *Odontella sinensis* konnte bisher in den Plastiden nur der RPP experimentell lokalisiert werden. Durch die Genomsequenzierung und vorhandene EST-Datenbanken (Expressed Sequences Tag) der Diatomeen *Phaeodactylum tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana* ist es möglich die Gene der RPP und OPP zu identifizieren und durch GFP-Fusionsproteine (Kilian und Kroth 2005) experimentell die Lokalisation zu ermitteln. Bisherige Untersuchungen von Phosphoribulokinase (PRK), Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) und Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase (RUBISCO) zeigten, daß diese Proteine mit bisher bekannten Regulationsmechanismen nicht lichtabhängig reguliert werden können.

Ziel dieser Arbeit war es, die Gene des OPP und RPP in den Diatomeen *P. tricornutum* und *T. pseudonana* im jeweiligen Genom zu finden, die Lokalisation der Proteine des plastidären RPP und der OPP zu ermitteln. Außerdem wurde die Regulation des Calvin Zyklus untersucht durch Thiothionin-Affinitätschromatographie und durch die Real-Time PCR. Des weiteren sollte die Fruktose-1,6-Bisphosphatase (FBPase) als offenbar einziges Thiothionin-reguliertes Protein genauer untersucht werden.

Kapitel 1 Calvin Zyklus Modell der Diatomeen *Phaeodactylum tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana*

1. Einleitung

Alle photoautotrophe Organismen, unter anderem Pflanzen, Grün- und Rotalgen und auch Diatomeen, fixieren CO_2 zur Kohlenhydratsynthese. Dieser Kohlenstoff wird in Form von CO_2 oder Bicarbonat HCO_3^- aus dem umgebenen Milieu aufgenommen und an einen schon vorhandenen Zucker gebunden. Das Enzym, welches das CO_2 fixiert, ist die Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase (RUBISCO). Die Fixierung des CO_2 an Ribulose-1,5-Bisphosphat (Carboxylierung) zum Produkt 3-Phosphoglycerat findet in einem hoch regulierten Stoffwechselzyklus statt, dem Calvin Zyklus (Calvin und Benson 1948, Calvin 1956). Im Laufe der Zeit wurden mehrere Regulationsfaktoren für die einzelnen Enzyme des Calvin Zyklus in Plastiden höherer Pflanzen gefunden, wie zum Beispiel zweiwertige Ionen als Cofaktoren oder Substrataktivierung und Produktinhibierung der jeweiligen Enzyme. Aber auch Proteine können regulierend in diesen Zyklus eingreifen, wie zum Beispiel das Thioredoxin (Trx), welches einzelne Proteine im Calvin Zyklus reduziert. Neben dem Trx sind auch andere Proteine wie Peroxiredoxine (Prx) zur Regulation nötig. Diese dienen vor allem als Antioxidantien zum Abfangen freier Sauerstoffradikale (O_2^-) in der Zelle und können so die Enzyme des Calvin Zyklus vor Oxidation oder dauerhafte Zerstörung bewahren. Die Peroxiredoxine werden entweder durch die Thioredoxine oder durch Glutaredoxine oder auch Glutathion reduziert und aktiviert. Glutathion wiederum wird u. a. durch Trx reduziert, Trx wiederum kann durch Glutathionierung deaktiviert werden. Eine andere Möglichkeit Enzyme aus dem Calvin Zyklus zu deaktivieren, ist die Komplexbildung der Enzyme Phosphoribulokinase (PRK) und Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) mittels eines kleinen Proteins namens CP12 (Chloroplastidäres Protein Nr. 12, Pohlmeier *et al.* 1996).

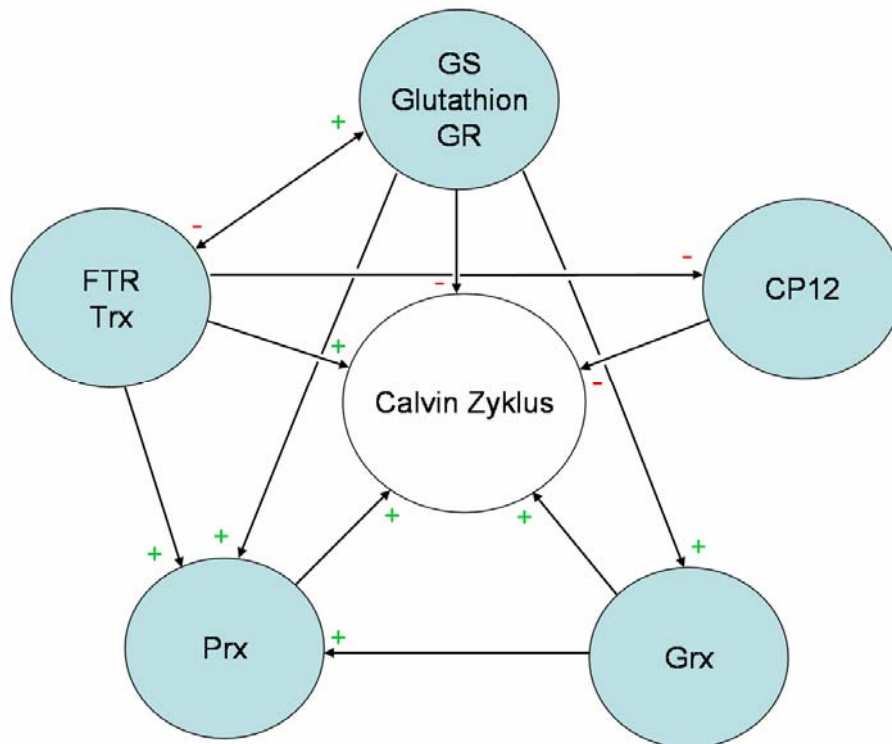


Abb.: 1: Schematische Darstellung aller regulatorischen Faktoren, die auf den Calvin Zyklus Einfluss nehmen können durch Reduzierung und Oxidation oder durch Proteinkomplexierung .

Einige Enzyme des Calvin Zyklus werden durch das Ferredoxin (FTR) / Thioredoxin (Trx)-System lichtabhängig aktiviert durch Reduktion (+). Die Peroxiredoxine (Prx), teilweise durch Trx reguliert, bewahren (+) mitunter die Proteine des Calvin Zyklus gegen ROS (reactive oxygen species). Trx kann teilweise durch Glutathion glutathionyliert und deaktiviert (-) werden. Das Glutathion wird durch die Glutathion Synthase (GS) synthetisiert, bzw. wird durch die Glutathion Reduktase (GR) reduziert (+) und reduziert seinerseits (+) wiederum das Glutaredoxin (Grx). Aufgrund der Thiolreduktion ist dieses Protein ein Äquivalent zum Trx. Das Glutaredoxin kann einige Enzyme des Calvin Zyklus deglutathionylieren (+) und damit aktivieren. Das CP12 Protein deaktiviert (-) im Calvin Zyklus die PRK und die GAPDH durch Komplexbildung. Das PRK/GAPDH/CP12-Komplex kann durch das Trx am Tage wieder dekomplexiert und aktiviert (+) werden. Die Pfeile zeigen symbolisch die gegenseitige Einflussnahme der regulativen Komponenten.

1.1 Calvin Zyklus

Der Calvin Zyklus ist eine Möglichkeit für photoautotrophe Pflanzen CO_2 zu assimilieren. Im Zyklus wird die Fixierung von CO_2 durch die RUBISCO (Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase) katalysiert ($\text{Ribulose-1,5-Bisphosphat} + \text{CO}_2 \rightarrow 2 \times \text{3-Phosphoglycerat}$). Die RUBISCO ist das am häufigsten vorkommende Enzym in Chloroplasten mit einem Verhältnis von 30-50% zu anderen löslichen Proteinen (Orellana und Perry 1992, 1995). Die Reaktion der Carboxylase ist stark exergon und daher irreversibel. Eigentlich wird die RUBISCO korrekt Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase genannt, denn sie kann auch eine unvermeidliche Nebenreaktion katalysieren, die Fixierung von O_2 ($\text{Ribulose-1,5-Bisphosphat} + \text{O}_2 \rightarrow \text{3-Phosphoglycerat} + \text{2-Phosphoglycolat}$) (Gutteridge und Gatenby 1995). Die

RUBISCO in *Phaeodactylum tricornutum* (GenBank AY819643) und *Thalassiosira pseudonana*, mit ihrer kleinen und großen Untereinheit, ist das einzige Enzym des Calvin Zyklus im Plastid, dessen Untereinheiten auf dem Plastidengenom kodiert ist (Martin und Schnarrenberger 1997). Alle anderen Enzyme in den Diatomeen sind kernkodiert und werden nach der Transkription und Translation in die Plastiden transportiert (Kroth *et al.* 2007). Die RUBISCO besteht aus acht kleinen und acht großen Untereinheiten und hat eine Gesamtgröße von 560 kDa (Kilo Dalton) (Martin und Schnarrenberger 1997). Die RUBISCO-Aktivase aktiviert die RUBISCO durch Entfernen des inhibierenden Zuckerphosphats Ribulose-Bisphosphat (RuBP) (Portis 2003), bzw. die RUBISCO wird durch Mg^{2+} in der Konformation stabilisiert. Die RUBISCO-Aktivase wiederum wird durch Thioredoxin Typ F (TrxF) reduziert, bzw. aktiviert (Lemaire *et al.* 2007, Zhang und Portis 1999) in Abhängigkeit der Lichtintensität (Zhang *et al.* 2002).

Die meisten Enzyme des Calvin Zyklus in Landpflanzen und auch in Diatomeen sind eine Mischung von Genen cyanobakteriellen und proteobakteriellen Ursprungs (Kroth *et al.* 2007, Martin und Schnarrenberger 1997). Der Calvin Zyklus ist die einzige Möglichkeit für photoautotrophe Organismen aus 6 fixierten CO_2 Molekülen 2 Triosephosphate (3-Phosphoglycerat (3-PGA) und Dihydroxyaceton-Phosphat (DHAP)) zu synthetisieren und diese aus den Plastiden in das Cytosol für die Glykolyse und Glukoneogenese auszuschleusen. Der Calvin Zyklus in Landpflanzen ist in den Chloroplasten streng reguliert: durch Substrat- und Produkthemmung, durch Ionen wie Mg^{2+} z.B. bei FBPasen oder durch lichtabhängige redox-regulierende Proteine über das Ferredoxin/Thioredoxin-System (Buchanan und Luan 2005, Buchanan und Balmer 2005, Hisabori *et al.* 2005). In Landpflanzen sind reduktiver und oxidativer Pentosephosphatweg (reductive/oxidativ pentose phosphate pathway, RPP und OPP) vollständig in den Chloroplasten lokalisiert. Der RPP (Calvin Zyklus) fixiert ein Molekül CO_2 unter Verbrauch von 2 Molekülen NADPH und 3 ATP. Der OPP setzt ein Molekül CO_2 frei, aber reduziert gleichzeitig 2 $NADP^+$ zu NADPH, dabei wird für die Nukleotidbiosynthese benötigtes Ribose-5-Phosphat synthetisiert. Wenn beide Wege (RPP und OPP) gleichzeitig ablaufen würden, würde netto kein CO_2 fixiert, wohl aber 3 ATP verbraucht. Ein solcher Energie verbrauchender Prozess wird auch „futile cycle“ genannt.

In den Diatomeen *Phaeodactylum tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana*, konnte anhand von vergleichenden Genomsequenzanalysen, bzw. durch

experimentellen Nachweis (Michels *et al.* 2005) gezeigt werden, dass der OPP im Cytosol und der RPP in den Plastiden lokalisiert sind (Kroth *et al.* 2007). Durch diese Aufteilung ist der „futile cycle“ allein durch räumliche Auftrennung unterbunden, theoretisch könnten aber Metabolite auch durch die Membranen transportiert werden.

1.2 Ferredoxin/Thioredoxin-System

Thioredoxine (Trx) sind kleine monomere Disulfid-Oxidoreduktasen mit einer Größe von ungefähr 12 kDa. Diese Proteine besitzen eine Disulfidbrücke, welche von den Cysteinen im konservierten Motiv (WCGPCK) gebildet werden kann. Wird diese Brücke reduziert, liegen die beiden Schwefel in Form von SH-Gruppen vor, die je nach Redoxpotential in der Zelle wiederum Disulfidbrücken anderer Proteine reduzieren können und so selbst in die oxidierte Form zurückfallen. Reduziert werden die plastidären Trx durch zwei Ferredoxine, welche die Elektronen vom Photosystem I erhalten. Das Ferredoxin hat einen Eisen-Schwefel Komplex und gibt die Elektronen an das Ferredoxin/Thioredoxin Reduktase (FTR, Wolosiuk und Buchanan 1977) weiter. Die FTR wiederum reduziert die plastidären Thioredoxine (siehe Abbildung 2). Im Cytosol werden die Thioredoxine Typ H über die NADPH abhängige Thioredoxin Reduktase (NTR) reduziert und aktiviert (Moore *et al.* 1964, Jacquot *et al.* 1994), in den Mitochondrien wird das Thioredoxin Typ O über eine mitochondriale NTR reduziert (Laloi *et al.* 2002). Falls es in den Diatomeen zu einem Eisenmangel kommt, kann zur Aufrechterhaltung der Fe-Konzentration in der Zelle das Ferredoxin durch Flavodoxin ersetzt werden (siehe Abbildung 2) (La Roche *et al.* 1996, Wilhem *et al.* 2006). Die Thioredoxine werden historisch in verschiedenen Gruppen klassifiziert. Der F-Typ reduziert die Fruktose-1,6-Bisphosphatase (Jacquot *et al.* 1997), während der M-Typ die NADP abhängige Malat Dehydrogenase (NADP-MDH) (Miginiac-Maslow und Lancelin 2002) reguliert.

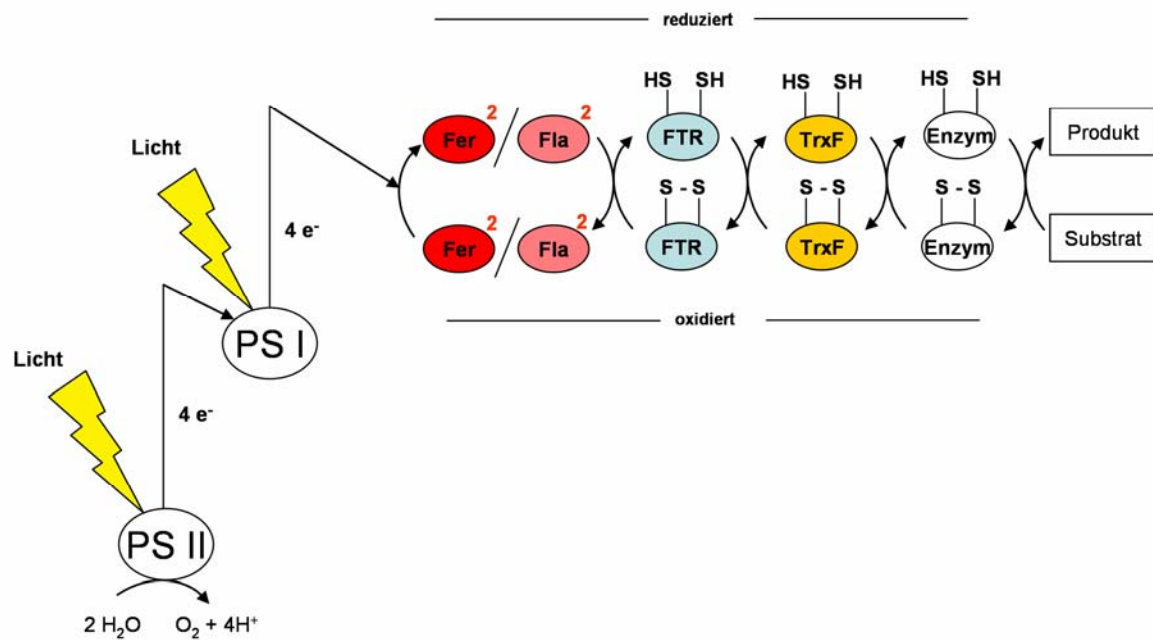


Abb. 2: Das plastidäre Ferredoxin/Thioredoxin-System. Die aufgenommenen Elektronen aus der Spaltung von H_2O werden durch die Chlorophylle im Photosystem I (PSI) und II (PSII) auf das Ferredoxin (Fer) oder Flavodoxin (Fla) übertragen. Die hochgestellte Zahl an Fer oder Fla bedeutet die Anzahl der benötigten Fer, um eine Ferredoxin/Thioredoxin Reduktase (FTR) zu reduzieren. Bei Eisenmangel können die Diatomeen das Ferredoxin durch Flavodoxin ersetzen. Die Disulfidbrücken der FTR werden so zu SH Gruppen reduziert. Die FTR reduziert wieder das Thioredoxin F (TrxF), welches dann die Zielenzyme reduziert.

Thioredoxine von Typ Y, H (H für heterotroph, Florencio *et al.* 1988, Johnsen *et al.* 1987, Laurent *et al.* 1964) und Typ X reduzieren Peroxiredoxine (Dietz *et al.* 2006a und 2006b, Lemaire *et al.* 2007) und Glutathion (Michelet *et al.* 2005). Nur das Thioredoxin Typ F (TrxF) kann an einem konserviertem Cystein (C60) eine Glutathionylisierung eingehen (del Val *et al.* 1999, Michelet *et al.* 2005). Dadurch wird das TrxF erheblich daran gehindert andere Proteine zu reduzieren (Michelet *et al.* 2005). Alternativ kann neben der NTR auch Glutaredoxin als Hydrogendonor fungieren (Holmgren 1976). Die Anzahl der bisher bekannten Zielenzyme für Trx sind durch Affinitätschromatographien mit mutierten Thioredoxine rasant gestiegen (Buchanan und Balmer 2005, Hisabori *et al.* 2005, Hosoya-Matsuda *et al.* 2005, Michelet *et al.* 2006). So werden offenbar nicht nur Enzyme des RPP und OPP (Kohlenstoff Metabolismus) reguliert, sondern auch Enzyme der Stickstoffassimilierung, Translation, Proteinfaltung und Degradation oder

Aminosäure- und Fettsäurebiosynthese und Antioxidantien oder selbst Regulationsproteine (Lemaire *et al.* 2007), wie das CP12 (Marchand *et al.* 2004).

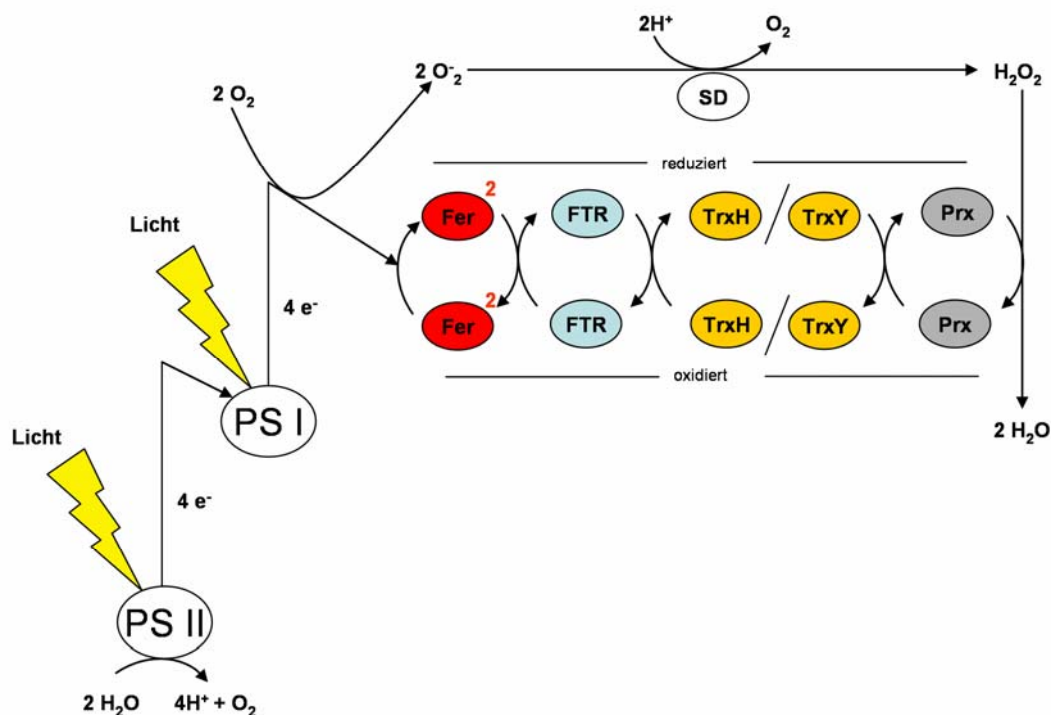


Abb. 3: Das plastidäre Antioxidations-System als Schutz gegen Reactive Oxygen Species (ROS). Das Ferredoxin (Fer) bekommt die nötigen Elektronen zur Reduzierung durch die Photosysteme I und II (PSI und PSII). Die hochgestellte Zahl an Fer bedeutet die Anzahl der benötigten Fer, um eine Ferredoxin/Thioredoxin Reduktase (FTR) zu reduzieren. Das Fer wiederum reduziert das Thioredoxin (Trx) Typ H oder Y. Das Trx reduziert das Peroxiredoxin (Prx). Durch das reduzierte Prx können im Stroma anfallende H_2O_2 zu Wasser detoxifiziert werden. Durch überschüssige Energie kann aus Sauerstoff (O_2) Superoxid Anion Radikal entstehen (Mehler Reaktion). Durch die Superoxid Dismutase (SD) wird aus dem Superoxid Anion Radikal das H_2O_2 .

1.3 Glutathion

Glutathion ist ein Tripeptid und ubiquitär in Pflanzenzellen zu finden. Die Glutathionsynthese verläuft in zwei enzymatischen Abschnitten. Im ersten Schritt wird durch die γ -Glutamyl-Cystein-Synthetase unter ATP-Verbrauch zwischen der γ -Carboxylgruppe von Glutamat (Glu) mit der Aminogruppe von Cystein (Cys) eine Amidbindung hergestellt. Der zweite Schritt wird durch die Glutathion-Synthetase unter ATP-Verbrauch durch eine Peptidbindung zwischen der Carboxylgruppe des Cys und der Aminogruppe eines Glycins (Gly) durchgeführt. Glutathion (γ -L-glutamyl-L-cysteinyl-glycine) wird in der reduzierten Form GSH und in der oxidierten Form GSSG abgekürzt (Lemaire *et al.* 2007). In der Zelle dient Glutathion als Schwefelreserve und kann dann durch enzymatischen Abbau als Cystein-Quelle dienen. GSSG wird primär durch die Glutathionreduktase (GR) unter gleichzeitigem

Verbrauch von NADPH reduziert, so daß ein GSSG zu zwei reduzierten GSH zerfällt. In der Pappel (*Populus trichocarpa*) und in *Arabidopsis thaliana* wurden im Cytosol und in den Plastiden GR lokalisiert (Rouhier *et al.* 2006). Bei der Pappel sind die Gene der GR mit vielen und großen Introns versehen (Rouhier *et al.* 2006). Die GR kann in zwei Klassen unterteilt werden. Die erste Klasse GR1 enthält die kleinen cytosolischen Proteine, die zweite Klasse GR2 Proteine mit einer ungefähren Größe von 500 Aminosäuren (aa, amino acid) in den Organellen (Rouhier *et al.* 2006). Im stark konservierten aktiven Zentrum sind die zwei Cysteine (Cys) durch bis zu vier Aminosäuren getrennt: GGTCV[I/L]RGCVPKK[I/L].

Glutathion (GSH) hat vielfältige Funktionen in der Zelle, sie reichen von der Detoxifizierung von Reactive Oxygen Species (ROS), Xenobiotika (von der Pflanze selbst gebildete oder aufgenommene giftige Substanzen) und Schwermetallen bis hin zur Pathogenabwehr (Foyer und Noctor 2005, Meyer und Hell 2005, Ogawa 2005). In Mammalia, aber auch in Pflanzen kann das Glutathion post-translationale Modifikationen an Proteinen durchführen, sogenannte Glutathionylierung. Diese Glutathionylierung besteht aus Disulfidbrücken zwischen dem Protein und Glutathion (Fratelli *et al.* 2004, Ghezzi *et al.* 2005, Shackelford *et al.* 2005, Michelet *et al.* 2006). Die Glutathionylierung schützt die Proteine vor irreversible Oxidation der Cysteine, kann aber auch die Enzymaktivität beeinflussen. Dies geschieht hauptsächlich bei oxidativen Stress. So wird eine GAPDH aus Hefe durch H_2O_2 inaktiviert, unabhängig davon ob GSH anwesend ist oder nicht, aber die oxidative Hemmung ist nur mit GSH reversibel (Cotgreave *et al.* 2003, Grant *et al.* 1999). Der genaue Ablauf der Glutathionylierung ist noch weitgehend unklar. Die glutathionylierte Proteine können durch Glutaredoxin (Grx) wieder deglutathionyliert (Michelet *et al.* 2006) werden. In Pflanzen konnte gezeigt werden, daß die cytosolische Triose-Phosphat Isomerase (TPI) durch die Glutathionylierung reguliert wird (Ito *et al.* 2003). Meistens sind es cytosolische Proteine, die eine Glutathionylierung eingehen. In den Plastiden, während der Photosynthese ROS gebildet werden, kann Glutathion eine Redoxregulation eingehen. So wurde eine putative Aldolase (AL) des Calvin Zyklus in den Plastiden aus der *Arabidopsis thaliana* entdeckt, welche eine Glutathionylierung eingeht (Ito *et al.* 2003). Es ist schon länger bekannt, daß die AL aus Muskeln von Mammalia eine Glutathionylierung eingehen kann (Zhang *et al.* 1995). Die Biosynthese des GSH ist mit der Photosynthese gekoppelt (Hatano-Iwasaki *et al.* 2002, Ogawa *et al.* 2002) und unterstützt die Aktivierung der Calvin

Zyklus Enzyme durch die Thioredoxine. Die A₄-GAPDH aus *Arabidopsis thaliana* konnte auch mit GSH eine reversible Glutathionylierung eingehen (Zaffagnini *et al.* 2007). Es wäre also möglich, dass fast alle Zielenzyme des Trx auch eine Glutathionylierung eingehen könnten (Lemaire *et al.* 2007). Dadurch dass die Calvin Zyklus Enzyme durch eine Glutathionylierung in der Aktivität reduziert werden, kann der Calvin Zyklus bei Bildung von ROS bei der Photosynthese herunterreguliert werden. Diese Inhibition des Calvin Zyklus könnte eine physiologische Bedeutung haben, indem durch die Einsparung des NADPH, die im RPP verbraucht werden, mehr NADPH im Stroma vorhanden wäre. Mehr NADPH könnte somit für ROS detoxifizierende Enzyme zur Verfügung stehen, z.B. Glutathionreduktase oder Monodehydroascorbat Reduktase (Lemaire *et al.* 2007).

1.4 Peroxiredoxine

Peroxiredoxine (Prx) dienen der Inaktivierung von ROS (Reactive Oxygen Species), die bei der Photosynthese im PSI entstehen. Neben der Detoxifizierung sind aber auch der Schutz der DNA *in vivo* (Banmeyer *et al.* 2005) oder die Pathogenabwehr (Rouhier *et al.* 2004) wichtige Funktionen der Peroxiredoxine. Die Proteine sind zwischen 17 und 22 kDa groß und werden in vier Gruppen unterteilt, entsprechend der Anzahl und Position der Cysteine (Cys) in der konservierten Region (Dietz *et al.* 2006a, Navrot *et al.* 2006), bzw. entsprechend dem katalytischen Mechanismus (Dietz 2003, Rouhier und Jacquot 2002). Es können bis zu drei katalytisch wirkende Cysteine in Peroxiredoxin vorkommen, in der Reihenfolge 1. Cystein, 2. Cystein und das dritte Cystein befindet sich zwischen dem ersten und zweiten Cystein und hat deswegen eine römische Nummerierung (II.) bekommen (Dietz *et al.* 2006a). Nach der Anzahl der Cysteine werden die Peroxiredoxine in vier Gruppen unterteilt, einmal die meist cytosolische 1-Cys Gruppe (mit einem funktionellem Cystein), zweitens die plastidäre 2-Cys Gruppe (mit zwei funktionellen Cysteinen), drittens die Typ II Gruppe mit sechs (A bis F) Untergruppen (das erste Cystein entspricht dem ersten Cystein der 2-Cys Gruppe, das zweite (II.) Cystein hat einen Abstand von etwa 25 Aminosäuren) und viertens die plastidäre Prx Q-Gruppe (hat nur ein katalytisch wirksames Cystein). Die biochemischen Reaktionen der drei Cysteine (Cys) sind verschieden. Bei dem ersten Cystein in der konservierten Region wird die Sulfhydrylgruppe (SH) nach Reduktion von Peroxiden in Schwefelsäure umgewandelt. Bei der 2-Cys Gruppe wird das erste

Cys durch eine Disulfidbrücke eines zweiten intermolekularen Cysteins wieder reduziert (Navrot *et al.* 2006). Bei der Prx Q Gruppe ist das zweite Cys innerhalb derselben Untereinheit gelegen und formt so eine intramolekulare Disulfidbrücke (Rouhier und Jacquot 2002). In den meisten Fällen wird dieses Cystein wieder durch Thioredoxine, Trx Typ Y für die 1-Cys Gruppe oder Trx Typ X für die 2-Cys Gruppe (Collin *et al.* 2003, Dietz *et al.* 2006a), reduziert. Bei den beiden anderen Untergruppen, II Prx und 1-Cys, wird das Cys ohne Disulfidbrückenbildung reduziert, da kein zweites Cystein innerhalb des Prx vorhanden ist. Bei der II Prx Gruppe wird das Cys entweder durch Glutaredoxin (Grx) oder durch Trx reduziert, bzw. auch von beiden (Brehelin *et al.* 2003, Finkemeier *et al.* 2005, Rouhier *et al.* 2001) oder durch Glutathion reduziert (Finkemeier *et al.* 2005, Rouhier *et al.* 2005). Die Proteine der 1-Cys Gruppe werden nur durch Trx reduziert (Pedrajas *et al.* 2000). Experimentell konnte gezeigt werden, daß die Prx eine dreifache Funktion übernehmen: erstens als Antioxidans gegen H₂O₂, Alkyl-Hydroperoxide und Peroxinitrite, zweitens als Modulator für Zellsignalisierungswege und drittens als Redox Sensor (Dietz *et al.* 2006b). Die Aminosäuresequenzen der Peroxiredoxine aus der 1-Cys und 2-Cys Gruppen sind am stärksten konserviert (Goyer *et al.* 2002). Die geringste konservierte Aminosäuresequenz haben die II Prx und die Prx Q Gruppen (Stork *et al.* 2005). Die Prx Q sind mit den Thylakoidmembranen assoziiert (Lamkemeyer *et al.* 2006), wie durch Western-Blot Analyse (Dietz *et al.* 2006b) und durch immunocytochemische Analysen gezeigt werden konnte (Dietz *et al.* 2006a). Die 2-Cys Gruppe ist entweder im Stroma als lösliches Dimer vorhanden oder an die Thylakoidmembran in oligomerischer Form gebunden (König *et al.* 2002, 2003). Ein Peroxiredoxin der II Prx-Gruppe (die Untergruppe E) ist in löslicher Form im Stroma vorhanden (Dietz *et al.* 2006a). Auf dem mitochondrialen Genom von *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa* ist eine Prx kodiert, welche zu der II Prx Gruppe gehört (Dietz *et al.* 2006a). Allgemein sind Peroxiredoxine sehr robuste Proteine, weil sie bei Temperaturen bis zu 50°C noch enzymatisch aktiv bleiben können (Dietz *et al.* 2006a). Dies ist insofern nicht verwunderlich, da bei hoher Lichtintensität und damit die von außen einwirkende Wärmeeinwirkung sehr hoch werden kann. Die Peroxiredoxine der II Prx-Gruppe sind eher allgemeine Antioxidationsproteine in der Zelle, die Peroxiredoxine der 2-Cys Gruppe und Prx Q sind eher mit der photosynthetischen Aktivität korreliert (Dietz *et al.* 2006a).

1.5 Glutaredoxine

Glutaredoxine (Grx) sind kleine monomere Proteine mit einer Größe von ungefähr 10-15 kDa. Sie sind ubiquitär in der Pflanze zu finden. Die Grx werden durch die Glutathion Reduktase (GR) reduziert, welches über NADPH die zur Reduzierung nötigen Elektronen bekommt. Die GR reduziert wiederum das Glutathion (GSH), welche das Grx reduziert (Lemaire 2004, Rouhier *et al.* 2004, 2006). In den Plastiden werden die Grx über das Ferredoxin/Thioredoxin-System reduziert (Schürmann *et al.* 2000). In den meisten Organismen werden die Proteine von verschiedenen Stoffwechselwegen durch Grx oder durch GSH reduziert und so aktiviert. Glutaredoxine sind in vielen verschiedenen Isoformen vertreten. Die Proteine sind in höheren Pflanzen kernkodiert, aber in verschiedene Kompartimente der Zelle vorhanden. Verschiedene Studien konnten zeigen, daß viele Glutaredoxine in verschiedene Kompartimente und Sub-Kompartimente transportiert werden, ohne daß eine erkennbare Signal- und Transitsequenz N-terminal oder C-terminal ein ER-Retentionssignal (KDEL) vorhanden ist (Chew *et al.* 2003, Rouhier *et al.* 2004, 2006). Die Glutaredoxine werden in drei Klassen eingeteilt, gegliedert nach der Aminosäuresequenz im konservierten aktiven Zentrum. Die erste Klasse wird charakterisiert durch Cxx[C/S], bzw. [Y/W]C[G/P/S]Y[C/S]. Zu dieser Klasse werden Glutaredoxine eingeteilt, die CGYC, CPYC, CPFC oder WCSYC/S als aktives Zentrum haben. Die zweite Klasse hat die Aminosäuresequenzen CGFS als aktives Zentrum. Die dritte Klasse der Glutaredoxine hat ein aktives Zentrum mit CCx[C/S/G], bzw. [S/T/G]CC[M/L][C/S/G]. Die Glutaredoxine der dritten Klasse sind sehr klein und vornehmlich im Cytosol lokalisiert (Rouhier *et al.* 2006). Es sind aber noch mehr, aber katalytisch unwirksame Cysteine in den Aminosäuresequenzen der Glutaredoxine vorhanden. Das Grx reduziert Zielenzyme durch einen Dithiol-Disulfid Austausch mit die beiden Cysteine im aktiven Zentrum, ähnlich wie Thioredoxin (Trx). Das Grx katalysiert spezifisch die Deglutathiolierung von Protein-Glutathion-Komplexen (Starke *et al.* 2003). Einige pflanzliche Glutaredoxin Isoformen sind in der Lage, Dehydroascorbat zu Ascorbat zu reduzieren (Rouhier *et al.* 2002, Szederkenyi *et al.* 1997). Ebenso kann Grx (nur die CxxC Gruppe) die Gruppe II Prx reduzieren (Brehelin *et al.* 2003, Rouhier *et al.* 2001, 2006), andere Peroxiredoxine werden nur durch Trx reduziert (Finkemeier *et al.* 2005, Rouhier *et al.* 2001). Andere Zielenzyme sind in *Arabidopsis thaliana* H⁺/Ca²⁺ Transporter (Cheng und Hirschi 2003), welche durch Glutaredoxine aktiviert werden, die eine Aminosäuresequenz von CxxS im

aktiven Zentrum haben. Dies könnte bedeuten, dass Glutaredoxin bei biochemischen Signalkaskaden in der Zelle über die Ca^{2+} Konzentration beteiligt sein könnte (Rouhier et al 2006). Zu den Zielenzymen gehören aber auch Triosephosphat Isomerase (TPI) und Aldolase (AL), diese werden glutathioliert und durch Glutaredoxin deglutathioliert (Ito et al. 2003). Ein TrxH in der Pappel (*Populus trichocarpa*) kann durch Grx reduziert werden (Gelhaye et al. 2003), ebenso wie auch TrxF (Michelet et al. 2005). Viele Glutaredoxin-Gene in der Pappel (*Populus trichocarpa*) sind durch viele und sehr große Introns unterteilt und dadurch durch Genomsequenzanalysen schwer zu identifizieren (Rouhier et al. 2006). Die Transkription und Expression der Grx werden durch verschiedene Stresssituationen induziert: Salz, Ozon, Hitze, Trockenheit oder Starklicht Behandlung (Mittler et al. 2004).

1.6 CP12

Das CP12 Protein (Chloroplastidäres Protein Nr. 12, Pohlmeier et al. 1996) ist plastidär und hat bei Pflanzen eine Größe von ungefähr 8,5 kDa. Dieses Protein initialisiert die Oligomerisation zwischen den Enzymen Phosphoribulokinase (PRK) und Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) in der Anwesenheit von NAD(H). Bei Anwesenheit von NADP(H) dissoziiert das Proteinkomplex wieder in die drei Proteine (Tamoi et al. 2005, Wedel und Soll, 1998). Die PRK verbraucht ein ATP bei der Umsetzung von Ribulose-5-Phosphat zu Ribulose-1,5-Bisphosphat und die GAPDH ein NAD(P)H bei der Umsetzung von 1,3-Bisphospho-Glycerat (BPGA) zu D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat. Durch die Oligomerisierung der PRK und der GAPDH werden beide Enzyme deaktiviert. Dabei bindet das CP12 Protein zuerst an die GAPDH, bevor es an die PRK bindet. Bei Anwesenheit des Substrates BPGA, kann das CP12 schlechter an die GAPDH binden, bzw. kann das BPGA den Proteinkomplex GAPDH/CP12 bei anwesenden Reduktionsmittel wieder trennen (Lebreton et al. 2006). Im Gegensatz zur PRK wird die GAPDH in verschiedene Klassen eingeteilt. Die Einteilung der GAPDH wird nach der C-terminalen konservierten Region durchgeführt. Die GAPDH-B hat, im Gegensatz zu GAPDH-A, C-terminal Aminosäuresequenzen des CP12 (CTE, C-terminal Extension), dadurch kann die GAPDH-B über das Trx reguliert werden (Sparla et al. 2002). Durch die C-terminale CP12 Sequenz kann die GAPDH-B ohne das Protein CP12 mit der PRK oligomerisieren. Die GAPDH-A ist cyanobakteriellen Ursprungs und kommt auch bei

Pflanzen vor; die GAPDH-A ist auch für die Licht/Dunkel Regulation über das Trx steuerbar (Buchanan 1984). Die GAPDH-B kommt bei den Streptophyten vor. Eine weitere Klasse von GAPDH ist die GAPDH-C, diese ist proteobakteriellen Ursprungs. Sie kommt nur im Cytosol bei höheren Pflanzen vor und katalysiert in der Glykolyse die Reduktion des 1,3-Bisphosphoglycerat zu D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat bei Verbrauch eines NADPH. Bei den Landpflanzen gibt es zusätzlich die GAPDH-Cp, diese ist ein Duplikat von der GAPDH-C und ist in den Plastiden lokalisiert (Petersen *et al.* 2003) und betreibt dort eine plastidäre Glykolyse. Diese beiden Formen der GAPDH bilden keine Komplexe (Trost *et al.* 2006).

Bei den Organismen mit sekundären Plastiden (Heterokonten (Diatomeen) und Haptoplonten) gibt es nur die GAPDH-C Form. Diese wurde dupliziert und mit Präsequenzen für die Plastiden und für das Mitochondrium (Heterokonten) versehen. Diese GAPDH-C ist in den Plastiden im Calvin Zyklus physiologisch involviert. Die plastidäre GAPDH-C kann nicht mit der PRK über das CP12 ein Oligomer bilden und hat keine Cysteine für eine Regulation über das Trx.

2. Ergebnisse

2.1 Genomanalyse

2.1.1 Calvin Zyklus Modell in *Phaeodactylum tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana*

Durch die genomweite Suche nach Enzymen des Calvin Zyklus von *Phaeodactylum tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana* konnten Gene für den reduktiven (RPP) und oxidativen (OPP) Pentose Phosphatweg zur CO₂-Fixierung (Calvin 1956) und zur Regeneration von NADPH (Kroth *et al.* 2007) identifiziert werden (siehe Anhang Tabelle 1 und 2). Die Anordnung der Stoffwechselwege in *P. tricornutum* und *T. pseudonana* sind dabei vergleichbar (siehe Abbildung 4 A, B). Der Calvin Zyklus setzt sich aus drei Teilen zusammen und besteht aus der Carboxylierungsreaktion (CO₂-Fixierung), der Reduktion des Kohlenstoffes, sowie der Regeneration des CO₂-Akzeptors Ribulose-1,5-Bisphosphat.

In den folgenden Abschnitten sind die Protein Identifikationsnummer (Prot ID) von Version v3.0 (*T. pseudonana*, Armbrust *et al.* 2004) und v2.0 (*P. tricornutum*) vom JGI Sequence Database in Klammern gefasst. Wie Kroth *et al.* (2007) zeigen, ist der Calvin Zyklus in zwei Teile aufgegliedert: der OPP ist im Cytosol und der RPP im Plastid lokalisiert.

In den Plastiden wird das freie CO₂ durch die Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase (RUBISCO) (*P. tricornutum*, YP_874418/YP_874417 und *T. pseudonana* ABK20721/ABK20720) fixiert (Read *et al.* 1994), die Gene für die kleine und große Untereinheit der RUBISCO sind auf dem Plastidengenom der Diatomeen *P. tricornutum* und *T. pseudonana* kodiert. Anschließend wird das durch die Carboxylierung gebildete 3-Phosphoglycerat durch das Enzym Phosphoglycerat Kinase (PGK) (*P. tricornutum* 22033 und *T. pseudonana* 270304) zu 1,3-Bisphosphoglycerat unter Verwendung von ATP phosphoryliert. Die Reduktion von 1,3-Bisphosphoglycerat zu D-Glyceraldehyd-3-Phosphat (3-PGA), das wichtigste Endprodukt des RPP, wird durch das Enzym Glycerinaldehydphosphat Dehydrogenase (GAPDH) (*P. tricornutum* 22122 und *T. pseudonana* 270231) mittels NADPH katalysiert. Die notwendige Energie in Form von ATP sowie den Reduktionsäquivalenten (NADPH) stammen aus der Lichtreaktion der Photosynthese. Es ist bekannt, dass die 3-PGA aus dem Plastidenstroma in das

Cytosol transportiert wird (Eicks *et al.* 2002, Wittpoth *et al.* 1998). In den Plastiden wird die 3-PGA von mehreren Enzymen des RPP weiterverwendet. Die Triosephosphat-Isomerase (TPI) (*P. tricornutum* 50738, 18228 und *T. pseudonana* 8590) katalysiert die Isomerisierung des 3-PGA zu Dihydroxyacetonphosphat. Das Dihydroxyacetonphosphat wird durch die Fruktosebisphosphat-Aldolase (FBA) (*P. tricornutum* 825, 22993, 24113 und *T. pseudonana* 21748) zusammen mit 3-PGA zu Fruktose-1,6-Bisphosphat verknüpft. Die Fruktose-1,6-Bisphosphat wird durch die Fruktose-1,6-Bisphosphatase (FBPase) (*P. tricornutum* 42886, 42456, 31451, 54279 und *T. pseudonana* 25437, 5601) irreversibel zu Fruktose-6-Phosphat dephosphoryliert. Weiter wird von der Fruktose-6-Phosphat auf die 3-PGA eine C₂-Einheit durch die Transketolase (TKL) (*P. tricornutum* 50819 und *T. pseudonana* 270312) übertragen, dabei entstehen einmal Erythrose-4-Phosphat und Xylulose-5-Phosphat. Die Transaldolase (TAL) (*P. tricornutum* 50313, 20779 und *T. pseudonana* 11661, 270309, 4331) überträgt einen C₃-Rest von der Fruktose-6-Phosphat auf die Erythrose-4-Phosphat, wodurch dann wieder 3-PGA und Seduheptulose-7-Phosphat entsteht. Von der Seduheptulose-7-Phosphat wird ein C₂-Rest auf die 3-PGA durch die TKL übertragen und es entstehen Xylulose-5-Phosphat und Ribose-5-Phosphat. Die Xylulose-5-Phosphat wird durch die Ribulosephosphat-Epimerase (RPE) (*P. tricornutum* 17204 und *T. pseudonana* 270306) zu Ribulose-5-Phosphat umgewandelt. Ebenso zu Ribulose-5-Phosphat umgewandelt wird die Ribose-5-Phosphat durch die Ribosephosphat-Isomerase (RPI) (*P. tricornutum* 50995 und *T. pseudonana* 270308). Die Ribulose-5-Phosphat wird unter Verbrauch von ATP durch die Ribulosephosphat-Kinase (PRK) (*P. tricornutum* 50773 und *T. pseudonana* 4376) in den CO₂-Akzeptor Ribulose-1,5-Bisphosphat irreversibel umgewandelt.

Im Cytosol kann die aus dem Plastidenstroma mittels Triosephosphat-Translokator ausgeschleuste 3-PGA in die Gluconeogenese oder in die Glykolyse einfließen oder in der cytosolischen OPP weiterverwendet werden. Für die cytosolische OPP wird auf die 3-PGA von der TAL (*P. tricornutum* 28222 und *T. pseudonana* 27187) ein nicht phosphorylierter C₃-Rest von der Seduheptulose-7-Phosphat übertragen, dabei entstehen Fruktose-6-Phosphat und Erythrose-4-Phosphat. Die 3-PGA wird unter anderem von der cytosolischen TPI (*P. tricornutum* 54738 und *T. pseudonana* 40958, 7229, 30380) reversibel zu Dihydroxyacetonphosphat umgewandelt. Die Aldolase (AL) (*P. tricornutum* 54738 und *T. pseudonana* 40958, 7229, 30380) katalysiert die Verknüpfung von Erythrose-

4-Phosphat mit Dihydroxyacetonphosphat zu der Heptose Seduheptulose-1,7-Bisphosphat. Danach katalysiert die Seduheptulose-1,7-Bisphosphatase (SBPase) (*P. tricornutum* 9583 und *T. pseudonana* 3523) die irreversible Hydrolyse der Seduheptulose-1,7-Bisphosphat zu Seduheptulose-7-Phosphat, welche weiter der TAL zu Verfügung steht. Die von der TAL synthetisierte Fruktose-6-Phosphat wird reversibel von der Glukose-6-Phosphat Isomerase (GPI) (*P. tricornutum* 53878, 23924 und *T. pseudonana* 39973, 270302, 38266) zu D-Glukose-6-Phosphat umgewandelt. Dieser Zucker wird zunächst durch Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase (GPDH) (*P. tricornutum* 22916, Fusionsprotein 54663 und *T. pseudonana* 28388) zu 6-Phosphogluconolacton oxidiert und es wird dabei NADP zu NADPH regeneriert. Diese Reaktion ist stark exergonisch und daher irreversibel. 6-Phosphogluconolacton wird weiter durch die Phosphogluconolacton-Lactonase (PGL) (*P. tricornutum* 31882 und *T. pseudonana* 5080) hydrolytisch gespalten und es entsteht dabei Gluconat-6-Phosphat. Das so gebildete Gluconat-6-Phosphat wird, unter Regenerierung von NADP zu NADPH, durch Gluconat-6-Phosphat-Dehydrogenase (PGDH) (*P. tricornutum* 26934, Fusionsprotein 54663 und *T. pseudonana* 3900, 33343) zu Ribulose-5-Phosphat oxidiert und es wird dabei CO₂ frei. Bis jetzt konnte nicht beobachtet werden, dass das Ribulose-5-Phosphat vom cytosolischen OPP in das Plastidenstroma zur Weiterverwendung des PRK transportiert wird (siehe Abbildung 4 A, B). Aus der Ribulose-5-Phosphat wird durch die cytosolische RPE (*P. tricornutum* 20015 und *T. pseudonana* 6803) Xylulose-5-Phosphat. Xylulose-5-Phosphat reagiert mit Erythrose-4-Phosphat über die TKL zu Fruktose-6-Phosphat. Bei *P. tricornutum* wurde ein kernkodiertes Gen identifiziert, welches das Protein PGDH (45333, 26934) kodiert. Dieses Gen kann in zwei mRNA Varianten transkribiert werden, welche die gleichen Proteine kodieren, aber mit unterschiedlichen Lokalisationen. Einmal kann dem Protein die Präsequenz fehlen und somit eine cytosolische PGDH (26934) translatieren. Oder dem Protein ist ein Signal- und Transitpeptid N-terminal vorgesetzt und die PGDH (45333) ist laut Signal- und Transitpeptid im periplastidären Raum (pps, periplastidic space) lokalisiert. Beide mRNA Sequenzen werden durch Expressed Sequence Tags (EST) unterstützt bei der Pennate *P. tricornutum* (Maheswari *et al.* 2005, Montsant *et al.* 2005). In diesem Raum würde die PGDH Gluconat-6-Phosphat zu Ribulose-5-Phosphat oxidieren, unter Abspaltung von CO₂ und Regenerierung von NADP zu NADPH. Das Ribulose-5-Phosphat würde dann durch die beiden inneren

Membranen der Plastiden in das Stroma evtl. durch einen Translokator transportiert und stünde dort der PRK zur Verfügung.

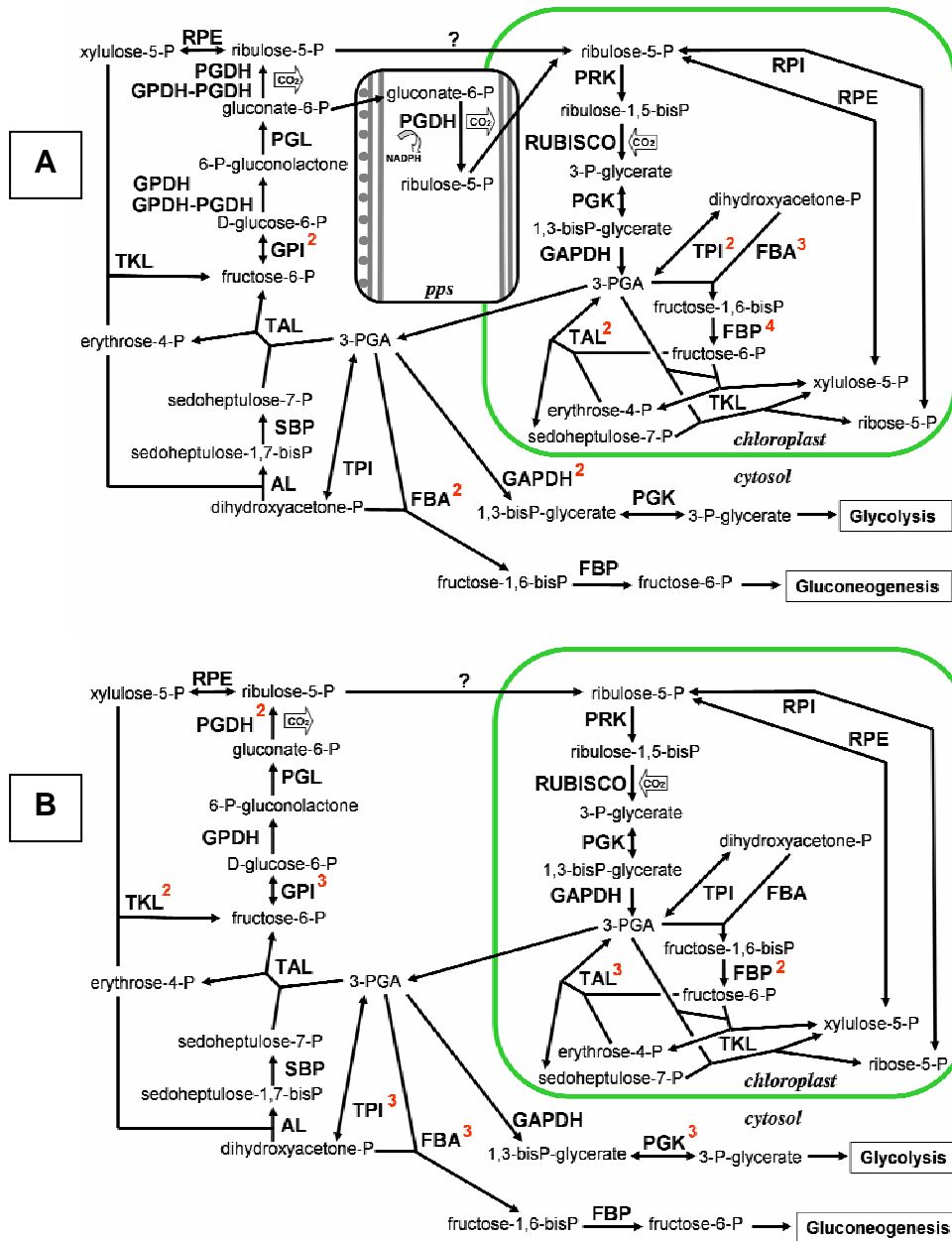


Abb. 4: Modell des oxidativen und reduktiven Pentosephosphatwegs und verwandte Reaktionen in *Phaeodactylum tricornutum* (A) und *Thalassiosira pseudonana* (B). Zur Vereinfachung wurden die Membranen der Organellen reduziert, abgesehen von den Detailansichten der plastidären Membranen. *pps*: Periplastidärer Raum/periplastidic space. Die hochgestellten Zahlen an den Enzymen kennzeichnen die Anzahl der Isoenzyme im jeweiligen Kompartiment. Enzymabkürzungen: AL: Aldolase; FBA: Fruktose-1,6-bisphosphatase; FBP: Fruktose-1,6-bisphosphatase; GAPDH: Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase; GPI: Glucose-6-Phosphat Isomerase; GPDH: Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase; PGL: Phospho-Gluconate Lactonase; PRK: Phosphoribulokinase; RUBISCO: Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase/Oxygenase; PGD: 6-Phospho-Gluconolacton Dehydrogenase, PGK: Phospho-Glycerat Kinase; RPI: Ribose-5-Phosphat Isomerase; RPE: Ribulose-Phosphat Epimerase; RPI: Ribose-5-Phosphate Isomerase; TKL: Transketolase; TAL: Transaldolase; TPI: Triose-Phosphat Isomerase; SBP: Seduheptulose-1,7-bisphosphatase.

Bei *P. tricornutum* (38631) und *T. pseudonana* (10378) konnte jeweils ein kernkodiertes Gen für eine PGL gefunden werden, welche laut Signal- und Transitpeptid in den Plastiden lokalisiert sein müssten. Bei der *T. pseudonana* wurde außerdem noch ein kernkodiertes Gen identifiziert, welches eine RPI kodiert. Da dieses Protein keine Präsequenz aufweist, müsste dieses Protein im Cytosol lokalisiert sein. Für die plastidären PGLs von *P. tricornutum* und *T. pseudonana* und für die cytosolische RPI von *T. pseudonana* konnte kein Stoffwechselweg gefunden werden, in denen sie enzymatisch eingegliedert sein könnten.

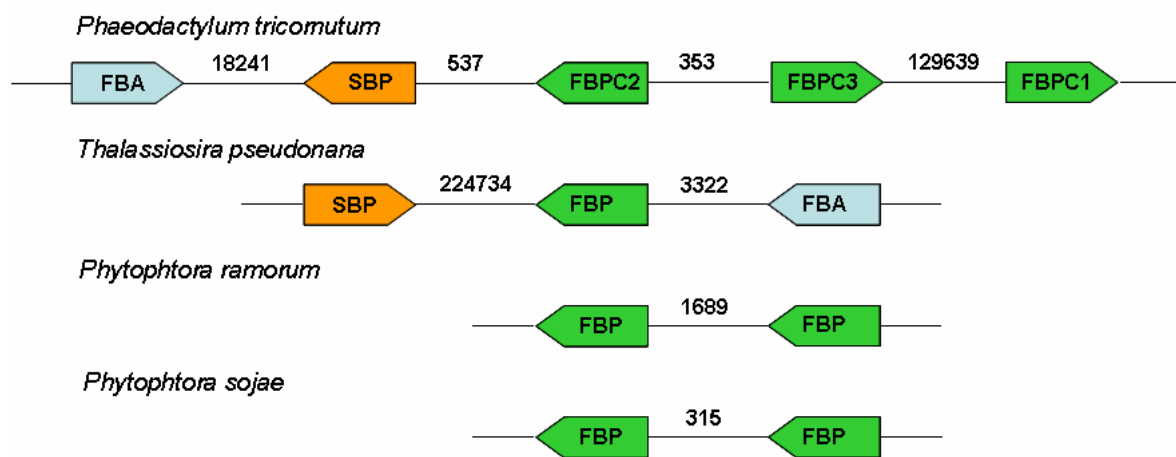


Abb. 5: Genlokalisierung der Seduheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase) und der Fruktose-1,6-bisphosphatase (FBPase) in *Phaeodactylum tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana* vergleichend zu zwei Oomyceten. In den Diatomeen *Phaeodactylum tricornutum* (FBA4: 42447, SBP: 56467, FBPC2: 42456, FBPC3: 31451, FBPC1: 42886), *Thalassiosira pseudonana* (SBP: 3523, FBP: 256250, ALDO2: 21748) und den Oomyceten *Phytophthora ramorum* (FBP: 77241, FBP: 94747) und *P. sojae* (FBP: 109566, FBP: 143601) sind die Genlokalisierung der SBPase zu den FBPasen in Diatomeen und der FBPasen zur FBPasen in Oomyceten auf demselben Chromosom in unterschiedlicher Entfernung und Orientierung gelegen. Nur in *P. tricornutum* sind die FBPasen plastidär und zum reduktiven Pentosephosphatweg (RPP) gehörend. Die SBPase bei *P. tricornutum* und *T. pseudonana* sind vermutlich im oxidativen Pentosephosphatweg (OPP) eingebunden. Bei *P. ramorum* und *P. sojae* sind jeweils beide FBPasen in der Glukoneogenese eingebunden. Die cytosolische Fruktose-1,6-Bisphosphat Aldolase (FBA: 42447) bei *P. tricornutum* ist eine Class-I Aldolase und in der Glukoneogenese physiologisch angesiedelt. Bei der *T. pseudonana* ist die plastidäre FBA eine Class-II Aldolase und zur RPP gehörend. Die angegebenen Zahlen sind der Abstand der Gene zueinander in Basenpaaren (bp).

Interessanterweise sind bei *P. tricornutum* die cytosolische Seduheptulose-1,7-bisphosphat (SBPase 56467) und die plastidären FBPasen (FBPC2 42456, FBPC3 31451, FBPC1 42886) auf demselben Chromosom in unterschiedlichen Orientierungen lokalisiert (siehe Abbildung 5). Zwischen den Genen der SBPase (56467) und der FBPC2 (42456) sind nur 537 Basenpaare (bp) und zwischen den Genen der FBPC2 und FBPC3 (31451) liegen nur 353 bp. Es kann sein, daß ein Gen

für FBPC2 oder FBPC3 durch eine Genduplikation des anderen Gens entstanden ist. Beide Proteine haben eine Homologie der Aminosäuresequenz von mehr als 90%. Zwischen der FBPC3 und FBPC1 (42886) liegen aber 129.639 bp, eine Duplikation der Gene ist hier aufgrund der großen Distanz recht unwahrscheinlich. Auf demselben Chromosom in einiger Entfernung (18.241 bp) vor dem Gen der SBPase (siehe Abbildung 5) ist ein Gen, welche eine cytosolische FBA Class I (42447) kodiert. Dieses Protein ist in der Glukoneogenese physiologisch eingegliedert. Bei *T. pseudonana* ist auf einem Chromosom ein Gen für die cytosolische FBPase (256250) mit einem Abstand von mehr als 224.000 bp zu einem Gen der cytosolischen SBPase (3523). Es ist unwahrscheinlich, dass die beiden Gene voneinander abstammen könnten. In unmittelbarer Nähe (3322 bp) auf dem Chromosom zum Gen der cytosolischen FBPase (256250) ist ein Gen für eine plastidäre FBA Class II (21748), welche physiologisch zur RPP gehört. Die Möglichkeit, daß bei *P. tricornutum* die Gene der SBPase (56467) und der FBPC2 als eine zusammenhängende mRNA transkribiert und die SBPase somit ohne eigenes plastidäres Signal- und Transitpeptid in das Plastid mitgeschleust wird, konnte experimentell ausgeschlossen werden, da keine passende Transkripte gefunden wurden. Die FBPasen bei den Oomyceten *P. ramorum* und *P. sojae* sind wahrscheinlich Genduplikate, dafür spricht jeweils die kurze Distanz auf dem Genom (siehe Abbildung 5). Die *Phytophthora* hat die Plastiden wahrscheinlich sekundär wieder entlassen (Cavalier-Smith 1999, 2003). So sind nur noch die cytosolischen Proteine des OPP übriggeblieben, die für andere Stoffwechselwege gebraucht werden. So sind hier die cytosolischen FBPasen für die Glukoneogenese vorhanden, welche mit den cytosolischen FBPasen von *P. tricornutum* und *T. pseudonana* laut phylogenetischer Analyse zusammen auf einem Ast clustern (siehe Abbildung 13). Da sich die Oomyceten und Diatomeen als letzte sich voneinander evolutionär getrennt haben, sind sich auch die cytosolischen Enzyme am ähnlichsten.

Die SBPase bei *P. tricornutum* (56467) und bei *T. pseudonana* (3523) sind sehr verwandt (siehe Abbildungen 13 und 15). Die cytosolischen FBPasen bei *P. tricornutum* (23247) und *T. pseudonana* (33021) sind phylogenetisch mit den cytosolischen FBPasen von *Phytophthora ramorum* (77241, 94747) und *P. sojae* (109566, 143601) sehr verwandt. Es kann ein gemeinsamer genetischer Ursprung der Gene für die cytosolischen FBPasen konform der Endosymbiontentheorie nicht ausgeschlossen werden.

2.1.2 Regulationsproteine

Der Calvin Zyklus ist in höheren Landpflanzen strikt reguliert, unter anderem auf enzymatischer Ebene durch das Ferredoxin/Thioredoxin-System (Buchanan und Balmer 2005, Ruelland und Miginiac-Maslow 1999). In *P. tricornutum* und in *T. pseudonana* konnten viele Gene für das Ferredoxin/Thioredoxin-System identifiziert werden (siehe Abbildung 6 A, B) (siehe Anhang Tabelle 1 und 2). Einmal konnte ein kernkodierte Gen für die plastidäre Ferredoxin/Thioredoxin Reduktase (FTR) in *P. tricornutum* (50907) und in *T. pseudonana* (26405) identifiziert werden. Es wurden Gene für ein plastidäres TrxF (*P. tricornutum* 46280 und *T. pseudonana* 270230), für ein plastidäres TrxM (*P. tricornutum* 51357 und *T. pseudonana* 40293) und Gene für plastidäre TrxYs (*P. tricornutum* 33356, 43884 und *T. pseudonana* 22657, 30505, 9699) identifiziert. Es konnten keine Gene für TrxX in *P. tricornutum* und *T. pseudonana* identifiziert werden. Weiter konnte ein kernkodierte Gen für TrxO (*P. tricornutum* 31720 und *T. pseudonana* 27059) identifiziert werden. Diese Proteine haben ein mitochondrial gerichtetes Signal- und Transitpeptid. Außerdem konnten kernkodierte Gene für cytosolische NADPH abhängige Thioredoxin Reduktasen (NTRs) identifiziert werden (*P. tricornutum* 51055 und *T. pseudonana* 40200, 39754); dazu Gene für cytosolische TrxHs (*P. tricornutum* 56471 und *T. pseudonana* 41697). Zusätzlich konnten Gene für NTRs identifiziert werden, die laut Signal- und Transitpeptide sehr wahrscheinlich das jeweilige Protein in den periplastidären Raum (pps, periplastidic space) lokalisieren (*P. tricornutum* 56519 und *T. pseudonana* 270256). Ebenso konnten Gene für periplastidäre TrxHs identifiziert werden (*P. tricornutum* 48141, 56521 und *T. pseudonana* 29789, 5491, 270273) (siehe Abbildung 6 A, B). In *P. tricornutum* ist es nicht eindeutig, ob das Gen für die periplastidäre TrxH (48141, 56521) zwei verschiedene mRNA transkribiert, da das einzelne Gen zwei verschiedene Transkriptionsstartmöglichkeiten hat.

Es konnten kernkodierte Gene für das Glutaredoxin (Grx) identifiziert werden, deren Signal- und Transitsequenz in den Plastiden lokalisieren (*P. tricornutum* 43497, 39133 und *T. pseudonana* 270291, 270296, 3733, 270299, 270300). Außerdem konnten kernkodierte Gene für cytosolische Grxs identifiziert werden (*P. tricornutum* 16854 und *T. pseudonana* 23837, 270295). Nur in *P. tricornutum* konnten zusätzlich verschiedene kernkodierte Gene für Grx identifiziert werden, die laut Signal- und Transitpeptide das jeweilige Proteine einmal mitochondrial (37615) und periplastidär (56497) lokalisieren (siehe Abbildung 6 A, B).

Es konnten kernkodierte Gene für je eine cytosolische Glutathion-Synthase (GS) identifiziert werden (*P. tricornutum* 25876 und *T. pseudonana* 29212). Dazu konnten auch die kernkodierten Gene für cytosolische Glutathionreduktasen (GR) identifiziert werden (*P. tricornutum* 35819, 49167 und *T. pseudonana* 41433, 41979, 26457) (siehe Abbildung 6 A, B).

Die zur Detoxifikation von ROS (Reactive Oxygen Species) notwendigen Peroxiredoxine (Prx) sind in *P. tricornutum* und *T. pseudonana* vorhanden. Es konnten Gene für Prxs identifiziert werden, die plastidär lokalisierende Signal- und Transitpeptide haben (*P. tricornutum* 46206, 21736 und *T. pseudonana* 3113). Weiter konnten kernkodierte Gene für Prx identifiziert werden, die periplastidär lokalisierende Signal- und Transitpeptide haben (*P. tricornutum* 56578 und *T. pseudonana* 1936). Kernkodierte Gene für Prx wurden identifiziert, die CER (chloroplastidäres ER) lokalisierende Signal- und Transitpeptide haben, gleichzeitig hat das jeweilige reife Protein C-terminal eine ER-Retentionssequenz (Apt *et al.* 2002). Für das Prx von *P. tricornutum* (22388) ist die ER-Retentionssequenz KTEL und für das Prx von *T. pseudonana* (11178) ist die ER-Retentionssequenz KDEL (siehe Abbildung 6 A, B). Apt *et al.* (2002) konnten zeigen, daß die N-terminale Diatomeen ER-Retentionssequenz (hier: DDEL) ein eGFP-Fusionsprotein (Signal- und Transitpeptid fusioniert an ein eGFP Protein) eindeutig in das ER transportieren ließ. Diese N-terminale ER-Retentionssequenz hat eine höhere Auswirkung auf die Lokalisation des Proteins, als das plastidäre Signal- und Transitpeptid. Nur in *P. tricornutum* konnten kernkodierte Gene für mitochondriale Prxs (38534, 56580) identifiziert werden. Hingegen nur in *T. pseudonana* konnten kernkodierte Gene für cytosolische Prxs (270261, 270271/270263) identifiziert werden. Bei einem Gen für die cytosolische Prx (270271/270263) gibt es zwei Transkriptionsmöglichkeiten, die von EST unterstützt werden.

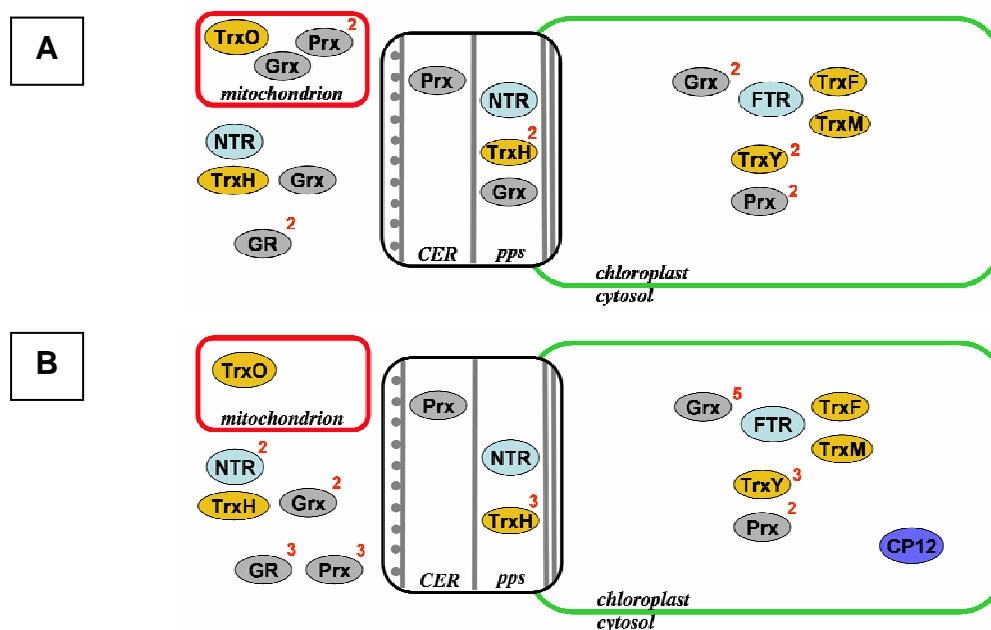


Abb. 6: Lokalisation der Regulationsfaktoren des Calvin Zyklus in *Phaeodactylum tricornutum* (A) und *Thalassiosira pseudonana* (B). Die hochgestellten Zahlen an den Proteinen symbolisieren die Isoformen in den jeweiligen Kompartimenten. Zur Vereinfachung wurden die Organellenmembranen reduziert, bzw. im vergrößerten Ausschnitt genau wiedergegeben. ER: endoplasmatisches Retikulum. pps: periplasmatischer Raum. Thioredoxin (Trx) Typ O/H/Y/M/F. Ferredoxin/Thioredoxin Reduktase (FTR) und NADPH abhängige Thioredoxin Reduktase (NTR). Peroxiredoxin (Prx). Glutaredoxin (Grx). Glutathion Reduktase (GR). CP12 Protein (CP12).

Nur in *T. pseudonana* konnte ein kernkodiertes Gen für das plastidäre CP12 Protein (270287) identifiziert werden (Boggetto *et al.* 2007) (siehe Abbildung 6 B).

2.2 Lokalisationsexperimente

Um experimentell die Lokalisation von Proteinen zu ermitteln, kann an einem grün fluoreszierendem Protein (eGFP, enhanced green fluorescent protein) die zu untersuchende Präsequenz (Signal- und Transitpeptid) N-terminal anfusioniert werden. Diese fusionierte Nukleotidsequenz wird in transformierte *P. tricornutum* (siehe Material und Methoden) transkribiert und translatiert, anschließend wird das Fusionsprotein dorthin transportiert, wie es die Präsequenz vorgibt (Kilian und Kroth 2005, Gruber *et al.* 2007). Alle Fusionsexperimente mit eGFP wurden mit Präsequenzen (Signal- und Transitpeptid) von Proteinsequenzen ausschließlich von *P. tricornutum* durchgeführt.

Die Präsequenzen von vier kernkodierten FBPasen (FBPC1 42886, FBPC2 42556, FBPC3 31451 und FBPC4 54279) (siehe Abbildungen 7 A) ließen das eGFP in den Plastiden lokalisieren, da die die Fluoreszenz vom eGFP mit der Position vom Chlorophyll Autofluoreszenz übereinstimmt (siehe Abbildung 8 A). Die kernkodierte FBPase (23247), zur Glukoneogenese gehörend, ist im Cytosol (siehe Abbildung 7

B) lokalisiert, weil dieses Protein keine Präsequenz hat. Für das Fusionsprotein wurden mehr als 200 Aminosäuren der FBPase an das eGFP fusioniert. Das eGFP-Fusionsprotein ist im Cytosol lokalisiert, weil die Fluoreszenz vom eGFP nicht mit der Chlorophyll Autofluoreszenz übereinstimmt (siehe Abbildung 8 B). Die Präsequenz der kernkodierte PGL (38631) (siehe Abbildung 7A) ließ das eGFP in den Plastiden lokalisieren, weil die Fluoreszenz vom eGFP mit der Position der Chlorophyll Autofluoreszenz (siehe Abbildung 8 A) übereinstimmt. Die kernkodierte SBPase (9583), welche keine Präsequenz hat (siehe Abbildung 7 A), ist im Cytosol lokalisiert (siehe Abbildung 7B). Die eGFP Fluoreszenz ist im Cytosol lokalisiert und korreliert nicht mit der Chlorophyll Autofluoreszenz (siehe Abbildung 8 B).

Von einigen Proteinen des Ferredoxin/Thioredoxin-Systems wurden die Präsequenzen an eGFP fusioniert. Die kernkodierte NTR (51055) und TrxH (56471) haben keine Präsequenz. Bis zu 55 Aminosäuren der reifen Proteine wurden an eGFP fusioniert (siehe Abbildung 9 A) und weil die Fluoreszenz vom eGFP das Cytosol ausfüllt und nicht mit der Position der Chlorophyll Autofluoreszenz korreliert (siehe Abbildung 10 A), sind die NTR und TrxH cytosolisch. Die kernkodierte FTR (50907), TrxF (46280), TrxM (51357) und TrxY (33356) haben eine Präsequenz (siehe Abbildung 9 B) mit der signifikanten Aminosäuren-Sequenz ($_{ASA-FAP}$) von einem Alanin (A) am Ende des Signalpeptides und ein Phenylalanin (F) am Anfang des Transitpeptides (Gruber *et al.* 2007, Kilian und Kroth 2005). Diese Aminosäuren in der Präsequenz sind ein starker Hinweis darauf, dass das Protein plastidär lokalisiert ist. Die Proteine FTR, TrxF, TrxM und TrxY sind in den Plastiden lokalisiert, weil die jeweiligen Präsequenzen am eGFP in den Plastiden lokalisieren, die eGFP Fluoreszenz stimmt eindeutig mit der Position der Chlorophyll Autofluoreszenz überein (siehe Abbildung 10 B). Das TrxO (31720) hat eine Präsequenz (siehe Abbildung 9 C), welche das eGFP in das Mitochondrium-Netzwerk lokalisieren lässt, weil die Fluoreszenz vom eGFP eindeutig über der Chlorophyll Autofluoreszenz liegt (siehe Abbildung 10 C), aber nicht dieselbe Dimension wie die Chlorophyll Autofluoreszenz hat.

A) plastidär

FBPC1:eGFP (42886)

01 05 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75
MEKWGF**SRG**QVPLLLSVVALSFVLLPTTNSFQTSTGQSQPQRLP**PASSASLYMSDPLAGPSAKRAPLQ**RK**DLKQF**
 76 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150
 SR**FLEVE**ECW**KRAEL**RDLE**PVLASVAEACRQ**INRIV**QRAQTDDIYGVAVKIDGSPLDDT**NVQ**GEVQQKLDVLCNTI**
 151 155 160 165 170 175 180
 ML**RAFCGSSRSVHSVASEE**DEPRCCSDVp:eGFP

FBPC2:eGFP (42456)

01 05 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
MKIALLPVVFSSAIS**VRAFL**PT**R**PS**PATQYFRYGPRLATASLSQAAGAAVSKAPVFDEVCETTGVTL**Tp:eGFP

FBPC3:eGFP (31451)

01 05 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65
MMFILKSPALWLLLYPVVAFT**A**ARTNSIR**PTAALS**SVFDLSS**VEAVPSRKT**KAPI**FDEVC**DTT**GVTL**Tp:eGFP

FBPC4:eGFP (54279)

01 05 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75
MGRGVIIFCVKNFAVLLIITSAVS**IQAWI**PL**PF**SATV**KARIDSTTLFFSRYKTP**LYHGGNEESY**GPPAPAVDSR**
 76 80 85
 YYTYVEAPVQSSp:eGFP

PGL:eGFP (38631)

01 05 10 15 20 25 30 35 40 45
MIACSTNIRNLQLFLCLTWTTLCH**GFV**PSPIPRSE**AFLQLLAHK**p:eGFP

B) cytosolisch

FBP:eGFP (23247)

01 05 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75
MSYTRDHDLVILL**NAIAT**S**CKLIT**SAV**Q**RAGVAKLY**GLAGEVNSTGDDQK**LDVLS**NDMMINALVNSGVC**CVLVS
 76 80 85 90 95 100 105 110 115 120 125 130 135 140 145 150
EENEEPIIV**PPGKAGKYCVAFDPLDGSSNIDCNVSVGTIFSVYERKPGS**NGSAEDLL**RSGADCICAGYVVYSSAV**
 151 155 160 165 170 175 180 185 190 195 200 205 210 215 220 225
EMVFTFRGSDVHGFCLDSTIGEFVHTREKMFPAEGGKRIY**SCNEGNAN**ND**QPIKDACDHF**RDSE**QPYTARYV**G
 230
 Sp:eGFP

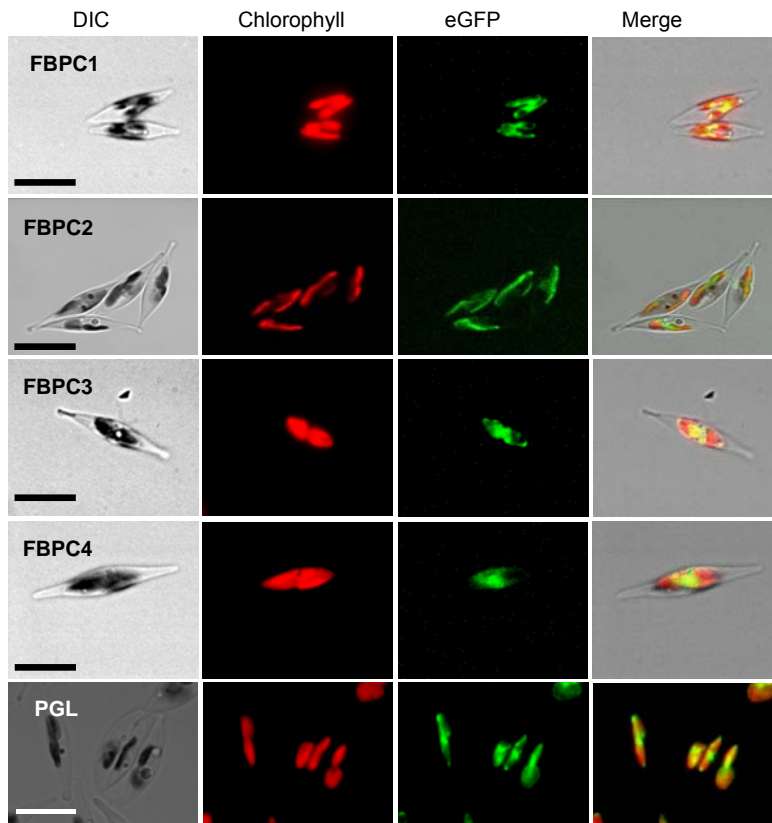
SBP:eGFP (9583)

01 05 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75
MPEAASGKTASERQEDYKT**ANSYGASSSSFYTTTEEKESYEALADVLGSKC**MD**ETLRICITDMLDVCADIT**EARL
 76 80 85 90
 TALVTVEGNKNDFGdp:eGFP

DICK: vorhergesagtes Signalpeptid durch SignalP's Hidden Markov Modelle, UNTERSTRICHEN: geschätztes Transitpeptidomäne, *KURSIV*: reifes Protein, Kleinbuchstabe: fusioniertes Prolin durch den Vektor, **GRAU**: konserviertes Motiv für die Signalpeptidtrennungsregion, **SCHWARZ**: eGFP (enhanced green fluorescent protein)

Abb. 7: Präsequenzen von Proteinen von *Phaeodactylum tricornutum* fusioniert an enhanced green fluorescent protein (eGFP) exprimiert in *P. tricornutum*. A) FBPC1 bis FBPC4: Fruktose-1,6-bisphosphatase C1 bis C4, PGL: Phospho-Gluconate Lactonase. B) FBP: Fruktose-1,6-bisphosphatase, SBP: Seduheptulose-1,7-bisphosphatase. Die Protein ID ist als Zahl in Klammern angegeben.

A) plastidär



B) cytosolisch

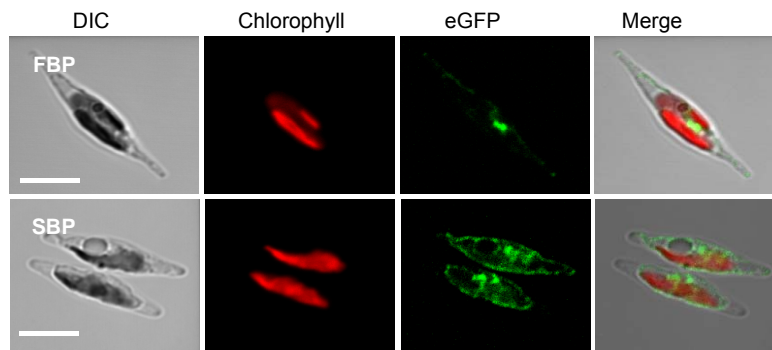


Abb. 8: Lokalisation des Präsequenz:eGFP Fusionsproteins exprimiert in *Phaeodactylum tricornutum*. **A)** Wildtyp Präsequenzen von plastidären Proteinen (FBPC1 bis FBPC4: Fruktose-1,6-bisphosphatase C1 bis C4, PGL: Phospho-Gluconate Lactonase) von *P. tricornutum* führt zum Import des eGFP in das Plastid. **B)** Wildtyp cytosolische Proteine (FBP: Fruktose-1,6-bisphosphatase, SBP: Seduheptulose-1,7-bisphosphatase) von *P. tricornutum* lassen das eGFP im Cytosol auftreten. Normanski differential interference contrast (DIC), rote Chlorophyll Autofloreszenz, grüne eGFP Fluoreszenz und zusammengelegte (Merge) Bilder sind von links nach rechts gezeigt, die Maßeinheit entspricht 10 µm.

A) cytosolisch

NTR:eGFP (51055)

01 05 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55
 MAAAKEAAALGAKVACLDFVKPSPAGTTWGLGGTCVNVGCI PKKLFHIGSL LHESVRKp:eGFP

TrxH:eGFP (56471)

01 05 10 15 20 25 30
 MVKHLESMDDFNTMLETSKTKLVVVDFTAp:eGFP

B) plastidär

FTR:eGFP (50907)

01 05 10 15 20 25 30 35 40
 MKVFLSFVALLVLP L T Q A F M P V S K P S F G R V G G T V Y M A K E M p:eGFP

TrxF:eGFP (46280)

01 05 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75
 MMQQQQQRXQQAQRXXGVGTILLSLWFVPAATAFAPSTLLAFRTQTPVVTTIAKVARTPLT LSAVVDIGSESA
 76
 FDQT:eGFP

TrxM:eGFP (51357)

01 05 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55 60 65 70 75
 MYRAQQYFLSRTLFIHYAILVLTRYCSAFC SLEPVL RPSRWISNRSKSLTLLNTIAWTPRPSKTS PRLSMAVGK
 76 80 85 90 95 100
 TGGKLIETVVEEYTSIVLEMESQKPMVFp:eGFP

TrxY:eGFP (33356)

01 05 10 15 20 25 30 35 40
 MRSFMAAFLCFMTAAEA FVHCKQNSRTLGLRSVAFFRSEGVLWp:eGFP

C) mitochondrial

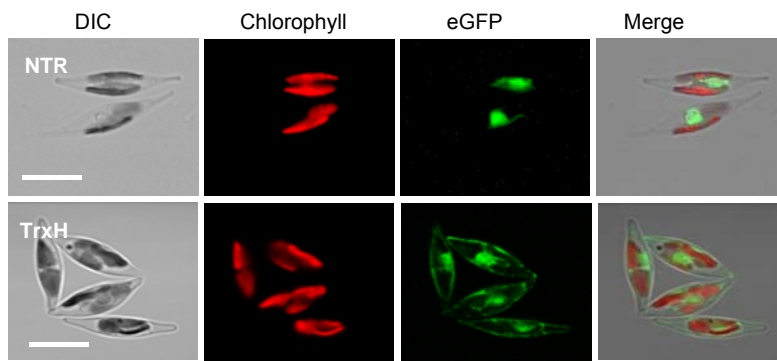
TrxO:eGFP (31720)

01 05 10 15 20 25 30 35 40 45 50 55
 MSTTIAMIALRPSFRRVTAL TGVTRRSMSVITLSDQEAVEKFKT INSKTVCYFTp:eGFP

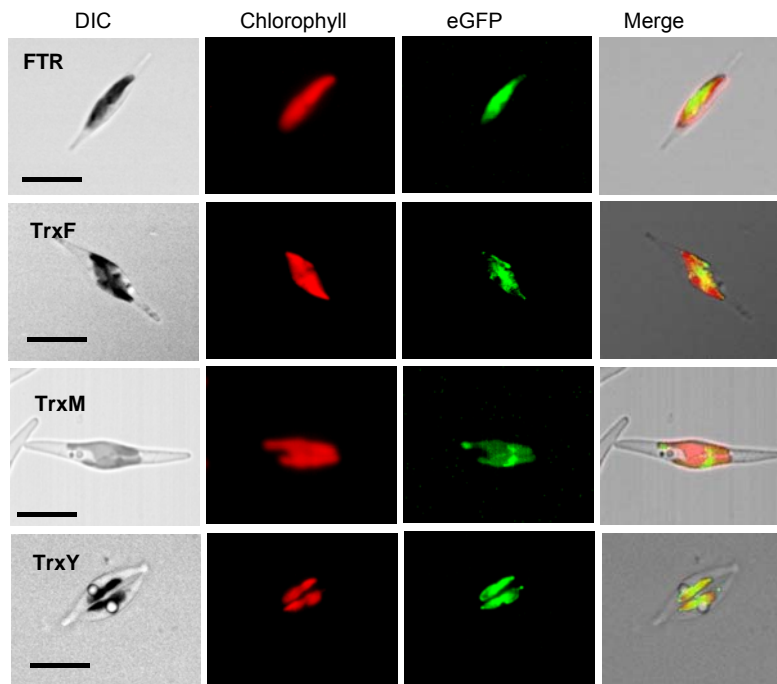
DICK: vorhergesagtes Signalpeptid durch SignalP's Hidden Markov Modelle, UNTERSTRICHEN: geschätztes Transitpeptiddomäne, *KURSIV:* reifes Protein, Kleinbuchstabe: fusioniertes Prolin durch den Vektor, **GRAU:** konserviertes Motiv für die Signalpeptidtrennungsregion, **SCHWARZ:** eGFP (enhanced green fluorescent protein)

Abb. 9: Präsequenzen von Proteinen von *Phaeodactylum tricornutum* fusioniert an enhanced green fluorescent protein (eGFP) exprimiert in *P. tricornutum*. A) NTR: NADPH abhängiges Thioredoxin Reduktase, TrxH: Thioredoxin Typ H. B) FTR: Ferredoxin Thioredoxin Reductase, TrxF/M/Y. Thioredoxin Typ F/M/Y. C) TrxO: Thioredoxin Typ O. Die Protein ID ist als Zahl in Klammern angegeben.

A) cytosolisch



B) plastidär



C) mitochondrial

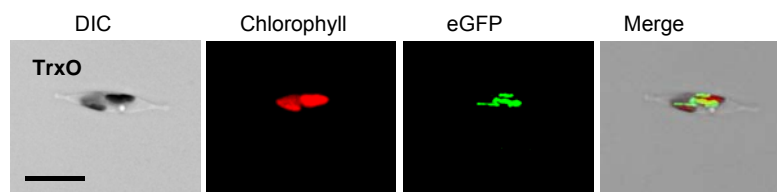


Abb. 10: Lokalisation des Präsequenz:eGFP Fusionsproteins exprimiert in *Phaeodactylum tricornutum*. **A)** Wildtyp cytosolische Proteine (NTR: NADPH abhängige Thioredoxin Reductase, TrxH: Thioredoxin Typ H) von *P. tricornutum* lassen das eGFP im Cytosol auftreten. **B)** Wildtyp Präsequenzen von plastidären Proteinen (FTR: Ferredoxin Thioredoxin Reductase, TrxF/M/Y: Thioredoxin Typ F/M/Y) von *P. tricornutum* führen zum Import des eGFP in das Plastid. **C)** Wildtyp Präsequenzen von mitochondrialen Proteinen (TrxO: Thioredoxin Typ O) von *P. tricornutum*. Normanski differential interference contrast (DIC), rote Chlorophyll Autofluoreszenz, grüne eGFP Fluoreszenz und zusammengelegte (Merge) Bilder sind von links nach rechts gezeigt, die Maßeinheit entspricht 10 µm.

“blob like structure”

PGDH:eGFP (45333)

01 05 10 15 20 25
MFLTILLFAAFCTTTLESIQTLSTNEIp:eGFP

TrxH:eGFP (48539)

01 05 10 15 20 25 30 35 40 45
MRSYLLVAAVMLYGTTFMTGDAVQGPAPATKAPSSCAAVDDTTLFGVp:eGFP

DICK: vorhergesagtes Signalpeptid durch SignalP's Hidden Markov Modelle, UNTERSTRICHEN: geschätztes Transitpeptidomäne, *KURSIV:* reifes Protein, Kleinbuchstabe: fusioniertes Prolin durch den Vektor, **GRAU:** konserviertes Motiv für die Signalpeptidtrennungsregion, **SCHWARZ:** eGFP (enhanced green fluorescent protein)

Abb. 11: Präsequenzen von Proteinen von *Phaeodactylum tricornutum* fusioniert an enhanced green fluorescent protein (eGFP) exprimiert in *P. tricornutum*. PGDH: 6-Phospho-Gluconolactone Dehydrogenase, TrxH: Thioredoxin Typ H. Die Protein ID ist als Zahl in Klammern angegeben.

“blob like structure”

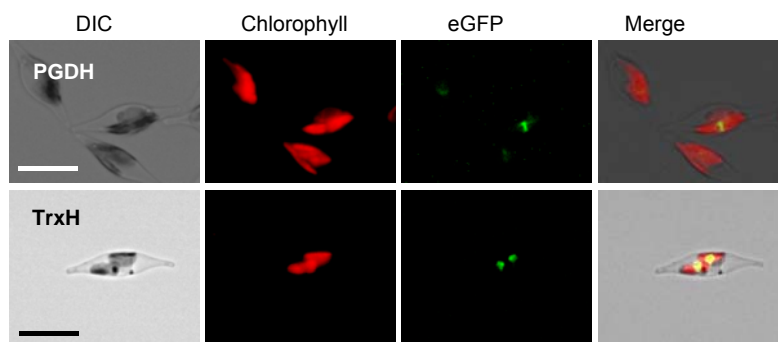


Abb. 12: Lokalisation des Präsequenz:eGFP Fusionsproteins exprimiert in *Phaeodactylum tricornutum*. Wildtyp Präsequenzen von periplastidären (blob like structure) Proteinen (PGDH: 6-Phospho-Gluconolactone Dehydrogenase, TrxH: Thioredoxin Typ H) von *P. tricornutum* führt zum Import des eGFP in den periplastidären Raum. Normanski differential interference contrast (DIC), rote Chlorophyll Autofluoreszenz, grüne eGFP Fluoreszenz und zusammengelegte (Merge) Bilder sind von links nach rechts gezeigt, die Maßeinheit entspricht 10 µm.

Wenn Fusionsproteine (Signal- und Transitpeptid eines Proteins fusioniert an eGFP) punktförmige Fluoreszenzen im, bzw. an den Plastiden erzeugen und nicht auf einer Dimensionsebene mit der Chlorophyll Autofluoreszenz liegen, wird dies als „blob like structure“ bezeichnet (Kilian und Kroth 2005). Gould *et al.* (2006b) interpretieren die Lokalisation der „blob like structure“ so, daß die Fusionsproteine im periplastidären Raum (pps, periplastidic space) akkumulieren. Gould *et al.* (2006a) haben eine

Präsequenz von einer kernkodierte plastidären UGG-Transferase (Protein für Stärkesynthese) von einer Cryptophyte an eGFP fusioniert. Da die Cryptophyten im periplastidären Raum unter anderem mit Hilfe von UGG-Transferase Stärke synthetisieren, muss dieses Protein oder das Fusionsprotein im periplastidären Raum (pps) lokalisiert sein. Die Fluoreszenz dieses Fusionsprotein ergab „blob like structure“. Rückschließend kann man sagen, das „blob like structure“ ein starker Indiz für periplastidär lokalisierte Proteine sind. Wie genau diese Akkumulation im pps funktioniert, muß noch geklärt werden (Gruber *et al.* 2007).

Die jeweiligen Präsequenzen der kernkodierte PGDH (45333) und TrxH (48539) (siehe Abbildung 11) am eGFP-Fusionsprotein lassen die Fluoreszenz des eGFP als „blob like structure“ erscheinen. Die Fluoreszenz des eGFP liegt über der Position der Chlorophyll Autofluoreszenz (siehe Abbildung 12). Die PGDH (45333) und TrxH (48539) sind nach Gould *et al.* (2006a und 2006b) im pps lokalisiert.

2.3 Phylogenetische Analysen und Vergleich der Aminosäuresequenzen

2.3.1 Calvin Zyklus Enzyme

In der phylogenetischen Analyse der kernkodierte Fruktose-1,6-Biphosphatasen (FBPasen) von *P. tricornutum* und *T. pseudonana* (siehe Abbildung 13) ist die Seduheptulose-1,7-Bisphosphatase als Outgroup mit einem Bootstrap von 100 gut unterstützt. Die FBPase der Glaucophyte *Cyanophora paradoxa* (cyano) ist basal zu den anderen FBPasen. Die frühe phylogenetische Trennung ist mit einem Bootstrap von 99 unterstützt. Die cytosolischen FBPasen gruppieren zusammen auf einen gemeinsamen Teilstamm mit einer Bootstrap Unterstützung von 82, inklusive der cytosolischen FBPasen von *P. tricornutum* (23247) und *T. pseudonana* (256250). Die cytosolischen FBPasen von *P. tricornutum* und *T. pseudonana* gruppieren wiederum zusammen mit FBPasen von anderen Heterokonten, Dinoflagellaten und Eugleniden. Die plastidären FBPasen von *P. tricornutum* (C1 42886, C2 42456, C3 31451, C4 54279) und *T. pseudonana* (25437, 5601) gruppieren an drei verschiedenen Stellen innerhalb des Astes der plastidären FBPasen. Die plastidären FBPasen von *P. tricornutum* (C2 42456, C3 31451) gruppieren miteinander mit einer Bootstrap Unterstützung von 100. Diese beiden FBPasen haben funktionelle Cysteine in der konservierten Region im richtigen Abstand zueinander (Ruelland und Miginiac-Maslow 1999) (siehe Abbildung 14). Durch diese Cysteine können die FBPasen sehr wahrscheinlich durch Thioredoxin Type F (TrxF) reduziert werden. Die regulierbaren

plastidären FBPasen haben eine strikte Affinität zu TrxF (Collin *et al.* 2003). Die plastidären FBPasen von *P. tricornutum* (C1 42886, C4 54279) und *T. pseudonana* (5601, 25437) sind zueinander phylogenetisch sehr verwandt (siehe Abbildung 13) (Reyes-Prieto und Bhattacharya 2007). Die plastidären FBPasen sind nicht weiter aufschlüsselbar, da zu wenige Sequenzen vorhanden sind.

In der phylogenetischen Analyse der kernkodierte cytosolischen Seduheptulose-1,7-Bisphosphatasen (SBPase) von *P. tricornutum* (9583) und *T. pseudonana* (3523) ist die Outgroup der FBPasen mit einem Bootstrap von 100 gut unterstützt (siehe Abbildung 15) (Reyes-Prieto und Bhattacharya 2007). Die SBPasen der Viridiplantae, Rotalgen und Chlorarachniophyten clustern zusammen mit einer Bootstrap Unterstützung von 100. Diese trennen sich von den anderen SBPasen. Die SBPase von *P. tricornutum* (9583) gruppiert zusammen mit SBPasen von Viridiplantae und Cryptophyten mit einer guten Bootstrap Unterstützung. Die SBPase von *T. pseudonana* (3523) gruppiert nicht mit der SBPase von *P. tricornutum*. Für weitere phylogenetische Aussagen fehlen weitere Sequenzen.

In der phylogenetischen Analyse der Phosphogluconat Lactonasen (PGL) haben die plastidären PGLs von *P. tricornutum* (10378) und *T. pseudonana* (38631) eine frühe Trennung zu den anderen PGLs mit einer guten Bootstrap Unterstützung von 100. Sie bilden ein Schwesterast mit einer Sequenz von einer Grünalge (siehe Abbildung 16). Die cytosolischen PGLs (*P. tricornutum* 31882 und *T. pseudonana* 5080) clustern auf einen separaten Ast mit PGLs von Rotalgen, Oomyceten und Pilzen phylogenetisch zusammen mit einer Bootstrap Unterstützung von 87. Dieser Subast trennt sich zu PGLs von Viridiplantae (siehe Abbildung 16).

In der phylogenetischen Analyse der 6-Phospho-Gluconolacton Dehydrogenase (PGDH) haben die Sequenzen der Viridiplantae und Cyanobakterien eine basale Stellung. Die periplastidäre PGDH (45333) und die 26934) sind zwei verschiedene Sequenzen aus demselben Gen, da zwei verschiedene Transkriptionsmöglichkeiten bestehen. Deswegen haben diese Splicevarianten eine Bootstrap Unterstützung von 100. Die beiden cytosolischen PGDHs von *T. pseudonana* (33343, 3900) sind von zwei verschiedene Gene und clustern mit einer Bootstrap Unterstützung von nur 56. Die PGDHs von *P. tricornutum* und *T. pseudonana* clustern zuerst mit Sequenzen von Oomyceten mit einer Bootstrap Unterstützung von 85 und dann zu Sequenzen von Apicomplexa mit einer Bootstrap Unterstützung von 76.

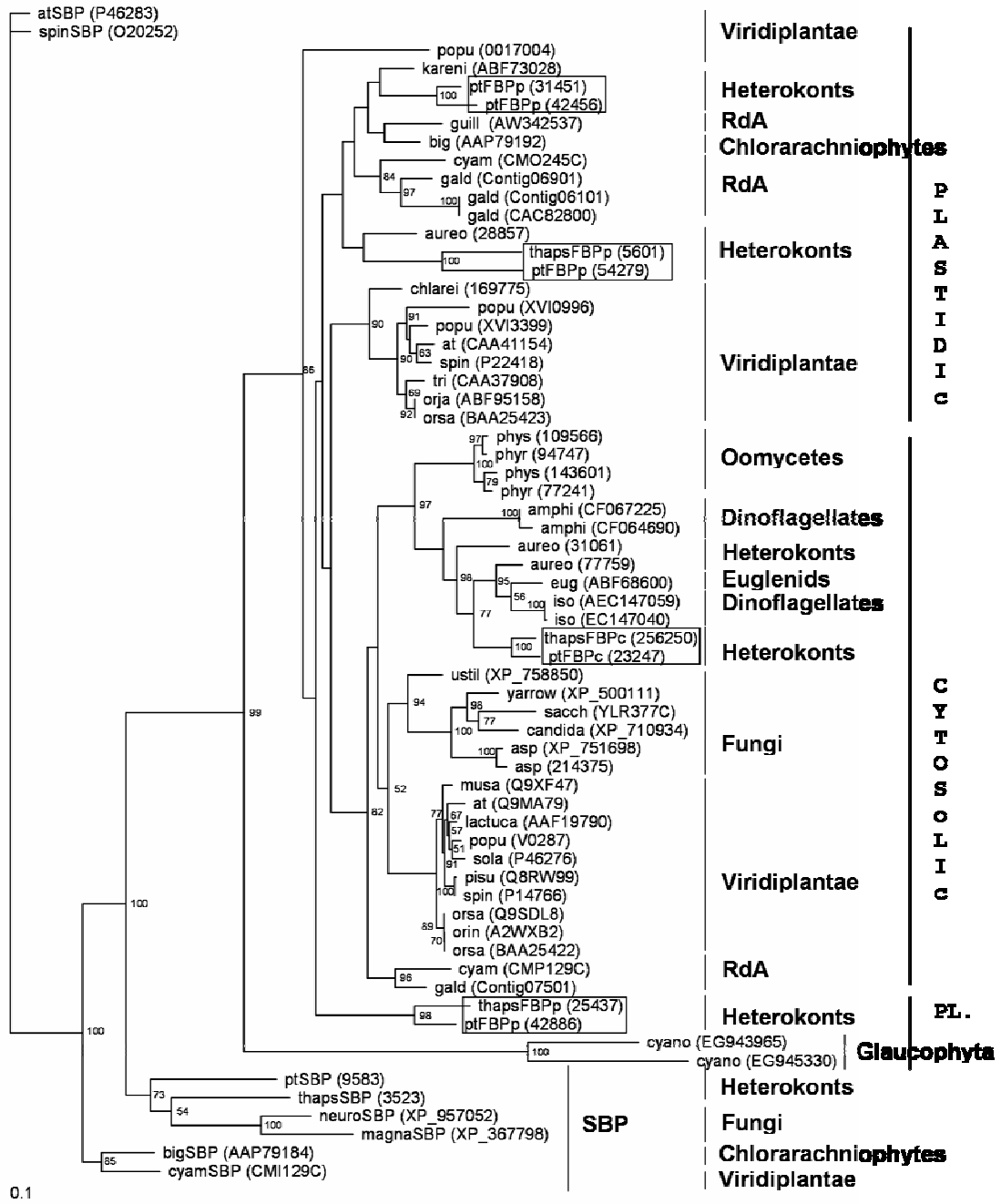


Abb. 13: Phylogenetische Analyse von Fruktose-1,6-Bisphosphatase (FBPase). Maximum Likelihood Baum mit angegebenen Bootstrap Value über 50. Es wurden 64 Sequenzen mit 495 Aminosäurepositionen zur Berechnung verwendet. Die seitlichen Markierungen verdeutlichen das Verwandtschaftsfeld der Proteine. Die in Klammern angegebenen Nummern sind die Prot ID. Abkürzungen für die Organismen: *Amphidinium carterae* (amphi), *Arabidopsis thaliana* (at), *Aspergillus* sp. (asp), *Aureococcus anophagefferens* (aureo), *Bigeloviella natans* (big), *Candida albicans* (candida), *Chlamydomonas reinhardtii* (chlarei), *Cyanidioschyzon merolae* (cyam), *Cyanophora paradoxa* (cyano), *Euglena gracilis* (eug), *Galdieria sulphuraria* (gald), *Guillardia theta* (guill), *Isochrysis galbana* (iso), *Karenia brevis* (kareni), *Lactuca sativa* (lactuca), *Magnaporthe grisea* (magna), *Musa* sp. (musa), *Neurospora crassa* (neuro), *Oryza sativa* (indica cultivar-group) (orin), *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) (orja), *Oryza sativa* (orsa), *Phaeodactylum tricornutum* (pt), *Phytophthora ramorum* (phyr), *Phytophthora sojae* (phys), *Pisum sativum* (pisu), *Populus trichocarpa* (popu), *Saccharomyces cerevisiae* (sacch), *Solanum tuberosum* (sola), *Spinacia oleracea* (spin), *Thalassiosira pseudonana* (thaps), *Triticum aestivum* (tri), *Ustilago maydis* (ustil), *Yarrowia lipolytica* (yarrow). Viridiplantae: Grünalgen und Landpflanzen, RdA: Red Algae.

?

ptp_42886__ FLEVECWKRAELRDLEPVLASVAEACRQINRIVQ-RAQTDDIYGVAVKIDGSPDDTNVQG-
 thp_25437__ FLEVECWKPLSLRNLDRITLLGVSDACKQINRIVQ-RAQTDDLYGAAVDPLTGLQADTNVQG-
 ptc_23247__ ----FVMSYTRDHDLVILLNAIATSCKLITSAVQ-RAGVAK-----LYGLAGEVNSTG-
 thc_256250__ ----YVMQNTKDHELTILLNLTATSFKLISSAVG-RAGVAQ-----LYGLAGEVNSTG-
 ptp_42456__ FMNEVATLNPDLKELTTLFGAIDTACKAISNLVK-RSQLPSSD-----TLGLEGTLLNVQG-
 ptp_31451__ FMTEVSLLNPEIEELTTLFGAIETACKAIANLVK-RSPLPSSD-----TLGLQGEINVQG-
 pea_P46275__ WLLQQEQKGIIDAELTIVLSSISMAKQIASLVQ-RANISN-----LTGTQGAVNIQG-
 ptp_54279__ FLSDAVKENAELRDLESFLFMGIQMAKKTIASLVN-RAGLVYS-----ITEDIRDDITDG-
 thp_5601__ WLSAKVQDYPELRDMESLHLSIQMAKKTISNLIHSSSGIAPT-----KPPSTTNTNSNPN

ptp_42886__ --EVQQKLDVLCNTIMLRAFCCGSSR-SVHSVASEEED---EPRCCSDVMNDSAFAVGN----
 thp_25437__ --EVQQQLDVLCCNTLMLRAFCCGASNNVICAVASEEED---LPRSCAD-----SGE----
 ptc_23247__ --DDQKKLDVLSNDMMINALVNSGV--CCVLVSEENE---EPIIVPPG-----KAGK----
 thc_256250__ --DDQKKLDVMSNDMMINALVNSGV--CCVLVSEENE---EPIVVPAD-----KAGK----
 ptp_42456__ --EDQKKLDVITNDLLKRALRFTGR--LGVLAASEEED---VPVDLLRS-----GLHNRGS-
 ptp_31451__ --EDQKKLDVIANDILKRALRFTGR--LGVLAASEEED---TPVDLMR-----DPSTK---
 pea_P46275__ --EDQKKLDVISNEVFSNCLRSSGR--TGI IASEEED---VAVAVEES-----YSGN----
 ptp_54279__ RFYSMKRLDHLSTVVLKNALKYTGKCEVLAPKSRLDN--ESPAHQPGVLIKASMDSN----
 thp_5601__ RDNSMKRLDQISKNVLQNALRFTGRLRVVEAARNENNDEEGPADHQPGVTIAYALDQYGLGK

1. Cys

ptp_42886__ -----FIAVFDPLDGSKNIDASLPVGSIFGIYKKIP-----G
 thp_25437__ -----YVAVFDPIDGSKNIDSSLPVGTVFGIYRSPE-----G
 ptc_23247__ -----YCVAFDPLDGSNNIDCNVSVGTIFSVYERKP-----G
 thc_256250__ -----FCVAFDPLDGSNNIDCNVSVGTIFSVYEKK-----G
 ptp_42456__ -----EILIEEGEKYVAVFDPLDGSNNVDAGIPTGTIIGVYEHDE-SCNTNLECC
 ptp_31451__ -----KVLIDEGEKYVAVFDPLDGSNNVDAGIPTGTIIGIYEHDE-TCKIDPDA
 pea_P46275__ -----YIVVFDPLDGSNNLDAAVSTGSI FGIYSPND-ECLPDFGD
 ptp_54279__ -----YVACL DPLDGSNADASIC TGT VFGVF EKETSTG I S L W K K
 thp_5601__ DGARKKASMSGGENKKWGNTRRLAACFDPLDGSNADAAICTGT VFGVFDAD--AGFKGGES

2. Cys

3. Cys

ptp_42886__ KSVDD-----QTFLQDGSGLVAAGYCLFSATTVLVLTGLSG-VDGF TLDPDTGRFLH
 thp_25437__ VKVGKDG----WLSDFSFLQRGTMVAAGYCLYSATTVLVLTGLSG-VHGF TLDPDKQTF LQ
 ptc_23247__ -SNGSAE-----DLLRSGADCLCAGYVVYSSAVEMVFTFRGSDVHGFCLDSTIGEFVH
 thc_256250__ --DGNVN-----DLLRSGADCLCAGYCCYSSATELVFTFQGGTVEGFCLDPTIGEFVH
 ptp_42456__ TPEECTE--QEAOCLANTLQPGTNLVAAYCLYSSSTFFALTGLNG-VYIF TLD ETIGEFIL
 ptp_31451__ LEEDRTK--QENLCLANTLQPGTNLVAAYCLYSSSTFLVLTGLGAG-TYGF TLD ETIGEFVL
 pea_P46275__ DSDNTLGTTEEQRCIYVNCQPGSNLLAAGYCMYSSSVAFVLTIGKG-VFVFTLDPLYGEFVL
 ptp_54279__ SREDRDR----FLVDSVLQPGKNMRAAGYCLYSSATVLVFTLGES-VQGF TLD PQMQEFVL
 thp_5601__ PDLGDEK----SLVRAVLQPGKNLLAAGYCIYSSSTTILVFSLGGG-THGF TLD PNLNEFVL

ptp_42886__ THQDIRIPSSG--PIYSFNEANFKDFDPPVKHFLNALKEGSSSTGIRSNARYIGALVADVHN
 thp_25437__ THPNM RIPDSG--SLYSFNEANSREFSEPVKHFLEKMK EAGKIGGKKISSRYV GALVADVHN
 ptc_23247__ TREKMVFPAEGGKRIYSCNEGNANNWDQPIKDACDHFRD----SEQPYTARYVGSVMADIHR
 thc_256250__ TRINMRFPEDGGKRIYSCNEGNFVHWDQPIKDAVEAFKS----SEKPY SARYVGSVMADIHR
 ptp_42456__ SKPSVQIPES--SIYSFNEAKLEMWDEPMRKT VNSWREGTGKSGKIFSSRYIGSMVGDVHR
 ptp_31451__ SHPNIKIPECS--SIMS FNEANTPSWDRPLQDTFAKWR TGTGKSGKFFSSRYIGSMVGDVHR
 pea_P46275__ TQENLQIPKSG--EIYSFNEGNYKLWDENLKKYIDDLKE-PGPSGKPY SARYIGSLVGD FHR
 ptp_54279__ THPDLTIPKRG--SVYSCNEANSEGWDDAYNSYLRNLKTGKGETGKRYAHRYVGSVMGDIHR
 thp_5601__ THPNM RIPNRG--SIYSCNEAYSEGWDDNFKRYLKT LKTGKGQTGQRYTQRYIGSMVGDVHR

ptp_42886__ VLINGGIYGPST-RANRNGKLRLLYESAPMAMILEQAGGAGSTG-----RGRILDV V ATK-
 thp_25437__ VLINGGIYGPST-RDNPSGKLRLLYESAPMAMIMEQAGGAGSTG-----YGRILDMMERK G
 ptc_23247__ TILYGGIYMPAD-AKSPKGKLRLLYEGIPMAMIEQAGGVASTGFFNGKIQRVLDLVPDE-
 thc_256250__ TLLYGGIYIYPAD-KKSPKGKLRCLYEGIPMALIEQAGGIAS TGLFEGKIGRVVELTPDA-
 ptp_42456__ TLLYGGVFGYPAD-NENPIGKLRLLYEAAPMSFIMEQAGGISTTG-----MQRVMEIQPLM-
 ptp_31451__ TLLYGGVFGYPGD-KKNPNGLRLLYEGAPMSFIMEQAGGLSTTG-----TQRVMEISPDT-
 pea_P46275__ TLLYGGIYGYPRD-KKSKNGKLRLLYECAPMSFIVEQAGGKSDG-----HQRVLDIQPTE-
 ptp_54279__ TLLYGGIFAYPADRLEHPDGNLQLLYKAAPMAYIVHTAGGKAIDGR----SGSLLEVRPDR-
 thp_5601__ TLYYGGIFCCPSDTEVNHNKGNLQLVYKSAPMAYIEHAGGKSTNG-----TVNLLVEVPKQ-

```

ptp_42886__IHQRIPTFLGSIENV
thp_25437__IHVRVPTFLGSENV
ptc_23247__IHAKCPIIMGGKRDV
thc_256250_IHCKCPIIMGGPRDV
ptp_42456__VHQRVPVIMGSKNDV
ptp_31451__VHQRVPIIMGSRQDV
pea_P46275_IHQRVPLYIGSTEEV
ptp_54279__VHQKSPCFIGSYDDV
thp_5601___VHERSPCFMGSADDM
    
```

Abb. 14: Vergleich der Aminosäuresequenz von Fruktose-1,6-Bisphosphatase (FBPase) von *Pisum sativum* zwischen *Phaeodactylum tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana*. Die konservierten Regionen des aktiven Zentrums mit den wichtigen Cysteinen wurden gelb unterlegt. Als Referenz für die regulierten Enzyme wurde die FBPase (P46275) aus *Pisum sativum* (pea) genommen (Ruelland und Mirginiac-Maslow 1999). Die notwendigen Cysteine für eine Regulation über das Thioredoxin Typ F (1. und 2. Cystein) wurden rot eingekreist. Das Cystein, welche fast alle FBPasen N-terminal haben (versehen mit ?), könnte evtl. für eine Glutathionylierung notwendig sein. Die FBPasen aus *P. tricornutum* (pt) und *T. pseudonana* (th) sind entweder plastidär (p) oder cytosolisch (c). Die jeweiligen Prot ID sind dahinter geschrieben.

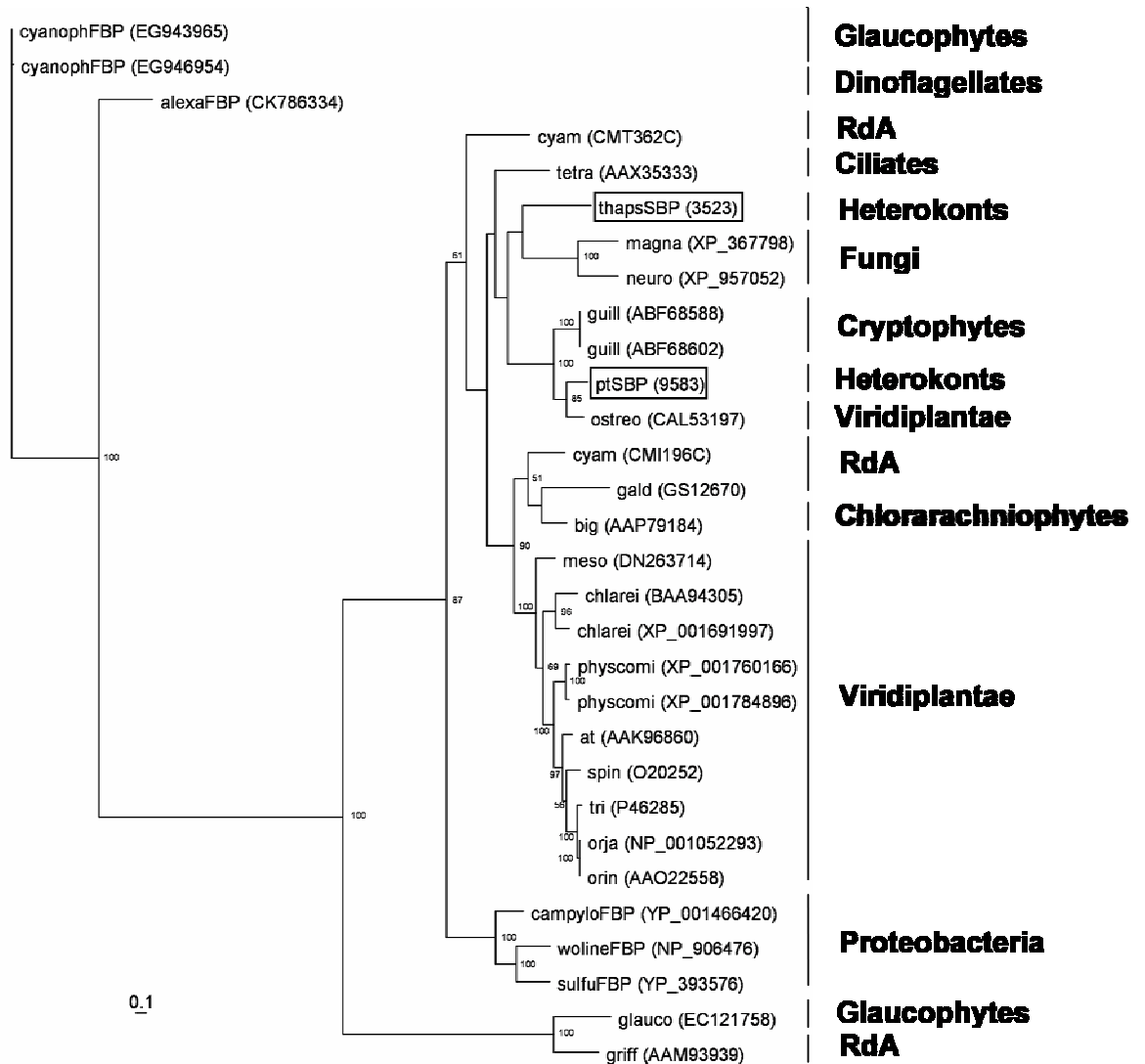


Abb. 15: Phylogenetische Analyse von Seduheptulose-1,7-Bisphosphatase (SBPase). Maximum Likelihood Baum mit angegebenen Bootstrap Value über 50. Es wurden 30 Sequenzen mit 439 Aminosäurepositionen zur Berechnung verwendet. Die seitlichen Markierungen verdeutlichen das Verwandtschaftsfeld der Proteine. Die in Klammern angegebenen Nummern sind die Prot ID.

Abkürzungen für die Organismen: *Alexandrium tamarense* (alexa), *Arabidopsis thaliana* (at), *Bigelowiella natans* (big), *Campylobacter* sp. (campylo), *Chlamydomonas reinhardtii* (chlarei), *Cyanidioschyzon merolae* (cyam), *Cyanophora paradoxa* (cyanoph), *Galdieria sulphuraria* (gald), *Glaucocystis nostochinearum* (glauco), *Griffithsia okiensis* (griff), *Guillardia theta* (guill), *Magnaporthe grisea* (magna), *Mesostigma viridae* (meso), *Neurospora crassa* (neuro), *Oryza sativa* (indica cultivar-group) (orin), *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) (orja), *Ostreococcus tauri* (ostreo), *Phaeodactylum tricornutum* (pt), *Physcomitrella patens* (physcomi), *Spinacia oleracea* (spin), *Sulfurimonas denitrificans* (sulfu), *Tetrahymena thermophila* (tetra), *Thalassiosira pseudonana* (thaps), *Triticum aestivum* (tri), *Wolinella succinogenes* (woline). Viridiplantae: Grünalgen und Landpflanzen, RdA: Red Algae.

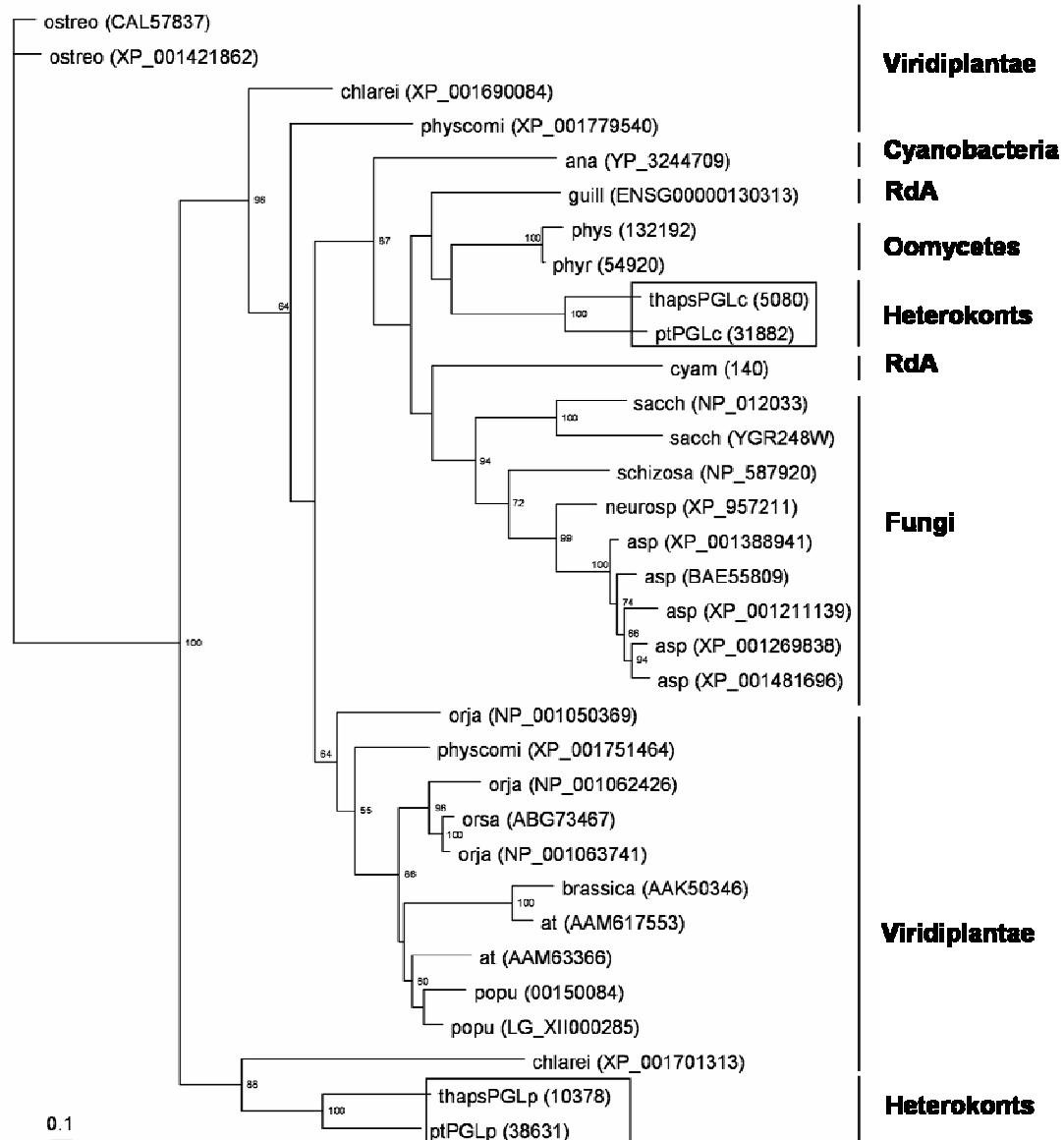


Abb. 16: Phylogenetische Analyse von Phosphogluconat Lactonase (PGL). Maximum Likelihood Baum mit angegebenen Bootstrap Value über 50. Es wurden 33 Sequenzen mit 400 Aminosäurepositionen zur Berechnung verwendet. Die seitlichen Markierungen verdeutlichen das Verwandtschaftsfeld der Proteine. Die in Klammern angegebenen Nummern sind die Prot ID. Abkürzungen für die Organismen: *Anabaena variabilis* (ana), *Arabidopsis thaliana* (at), *Aspergillus* sp. (asp), *Brassica* sp. (brassica), *Chlamydomonas reinhardtii* (chlarei), *Cyanidioschyzon merolae* (cyam), *Guillardia theta* (guill), *Neurospora crassa* (neuro), *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) (orja), *Oryza sativa* (orsa), *Ostreococcus tauri* (ostreo), *Phaeodactylum tricornutum* (pt), *Physcomitrella patens* (physcomi), *Phytophthora ramorum* (phyr), *Phytophthora sojae* (phys), *Populus trichocarpa* (popu), *Saccharomyces cerevisiae* (sacch), *Schizosaccharomyces pombe* (schizosa), *Thalassiosira pseudonana* (thaps). Viridiplantae: Grünalgen und Landpflanzen, RdA: Red Algae.

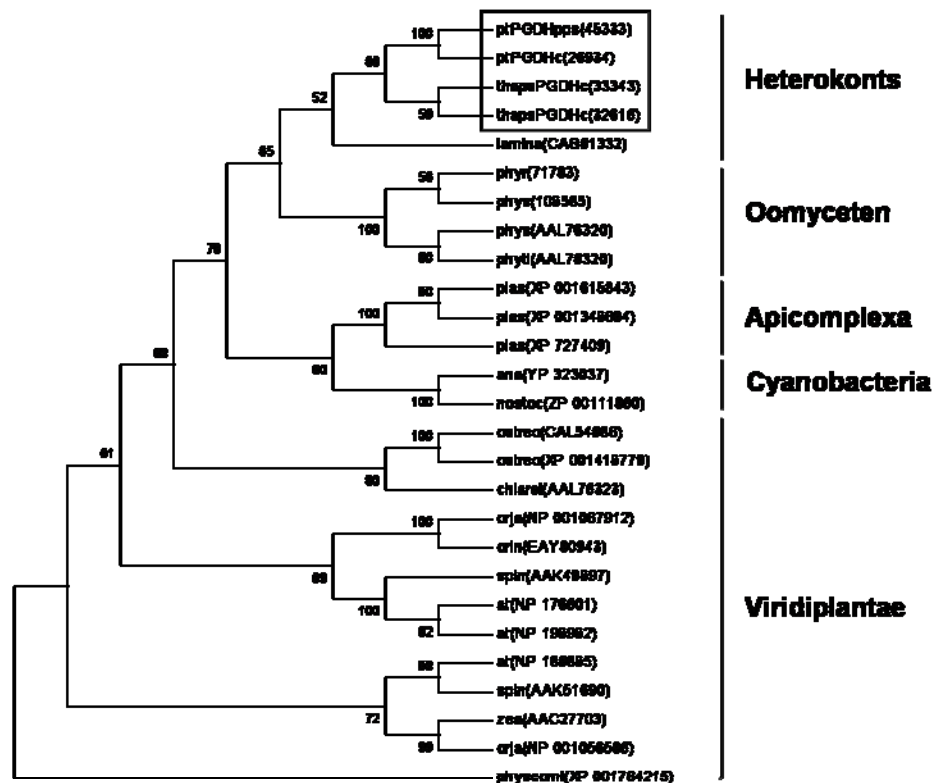


Abb. 17: Phylogenetische Analyse von 6-Phospho-Gluconolacton Dehydrogenase (PGDH). Maximum Parsimony Baum mit angegebenen Bootstrap Value über 50. Die seitlichen Markierungen verdeutlichen das Verwandtschaftsfeld der Proteine. Für die PGDH aus *T. pseudonana* ergab sich teilweise neue Protein ID (alt: 32616, neu: 3900). Die in Klammern angegebenen Nummern sind die Prot ID. Abkürzungen für die Organismen: *Anabaena variabilis* (ana), *Arabidopsis thaliana* (at), *Chlamydomonas reinhardtii* (chlarei), *Laminaria digitata* (lami), *Nostoc punctiforme* (nostoc), *Oryza sativa* (indica cultivar-group) (orin), *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) (orja), *Ostreococcus tauri* (ostreo), *Phaeodactylum tricornutum* (pt), *Physcomitrella patens* (physcomi), *Phytophthora infestans* (phyti), *Phytophthora ramorum* (phyr), *Phytophthora sojae* (phys), *Plasmodium falciparum* (plas), *Spinacia oleracea* (spin), *Thalassiosira pseudonana* (thaps), *Zea mays* (zea). Viridiplantae: Grünalgen und Landpflanzen, RdA: Red Algae.

2.3.2 Ferredoxin/Thioredoxin-System

Bei der phylogenetischen Analyse von Thioredoxinen Typ H (TrxH) clustern zwei periplastidäre TrxH (*P. tricornutum* 48539, *T. pseudonana* 5491) (siehe Abbildung 18) zusammen mit einer Bootstrap Unterstützung von 90. Sie bilden eine frühe Gruppe, aber ohne Bootstrap Unterstützung. Die periplastidären TrxHs (*P. tricornutum* 48141, 56521, *T. pseudonana* 29789) clustern zu einer gemeinsamen Gruppe mit einer Bootstrap Unterstützung von 94. Die Stellung der periplastidären (pps) TrxHs zueinander lässt sich aufschlüsseln, aber der phylogenetische Zusammenhang der cytosolischen TrxHs zueinander ist nicht mit Bootstrap unterstützt. Die cytosolischen TrxHs haben keine direkte Gruppierung zu den periplastidären TrxHs. Für genauere phylogenetische Aussagen fehlen aber weitere Sequenzen von annotierte TrxHs.

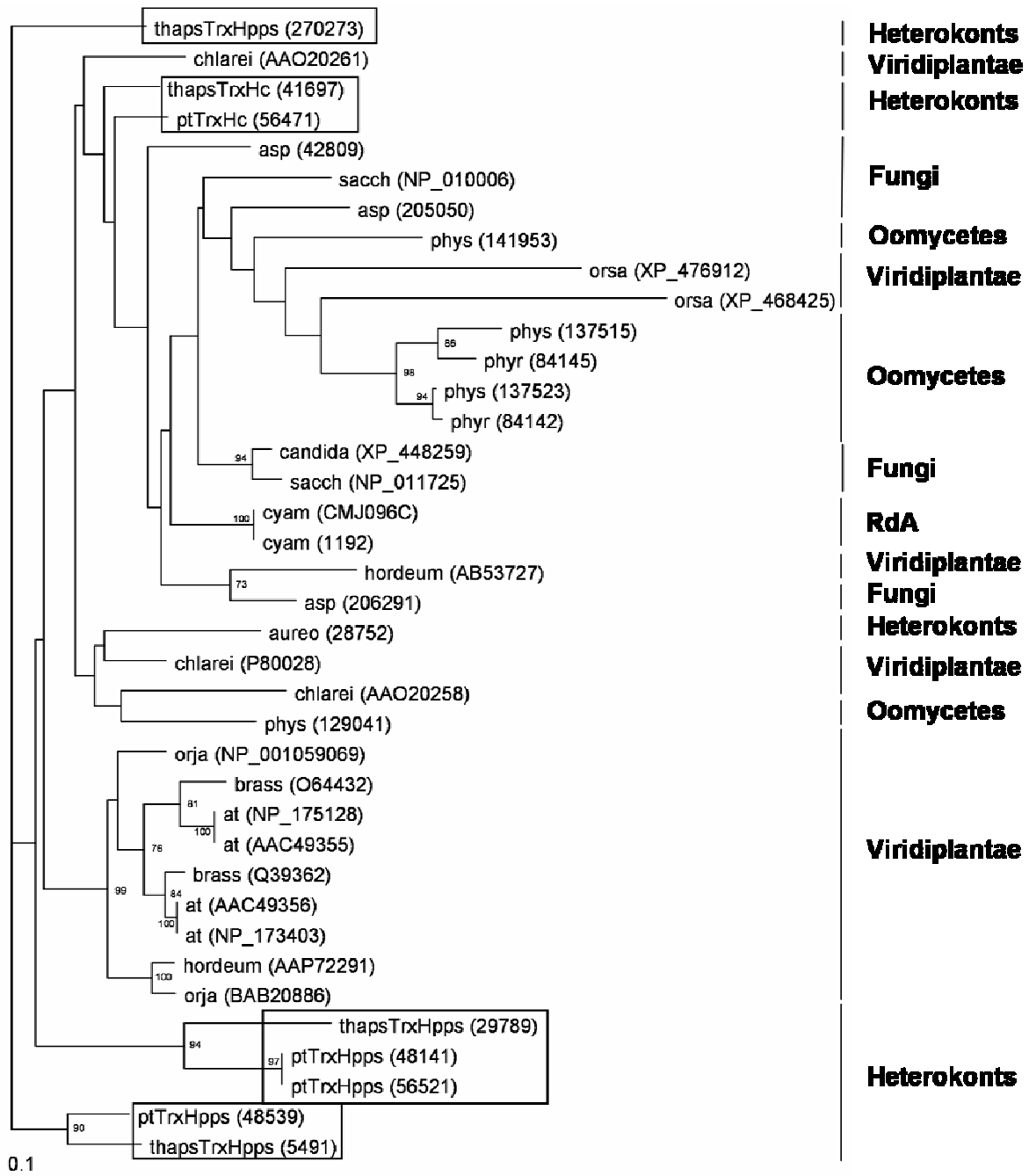


Abb. 18: Phylogenetische Analyse von Thioredoxin Typ H (TrxH). Maximum Likelihood Baum mit angegebenen Bootstrap Value über 50. Es wurden 38 Sequenzen mit 250 Aminosäurepositionen zur Berechnung verwendet. Die seitlichen Markierungen verdeutlichen das Verwandtschaftsfeld der Proteine. Die in Klammern angegebenen Nummern sind die Prot ID. Abkürzungen für die Organismen: *Arabidopsis thaliana* (at), *Aspergillus* sp. (asp), *Aureococcus anophagefferens* (aureo), *Brassica* sp. (brassica), *Candida albicans* (candida), *Chlamydomonas reinhardtii* (chlarei), *Cyanidioschyzon merolae* (cyam), *Hordeum vulgare* (hordeum), *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) (orja), *Oryza sativa* (orsa), *Phaeodactylum tricorutum* (pt), *Phytophthora ramorum* (phyr), *Phytophthora sojae* (phys), *Saccharomyces cerevisiae* (sacch), *Thalassiosira pseudonana* (thaps). Viridiplantae: Grünalgen und Pflanzen, RdA: Red Algae.

Michelet *et al.* (2005) fanden heraus, daß bei Thioredoxinen Typ F (TrxF) aus *Arabidopsis thaliana* ein weiteres Cystein (C60) vorhanden ist, welches durch Glutathion glutathionyliert werden kann. Bei dem Vergleich der Aminosäuren der TrxFs von *P. tricornutum* (46280) und *T. pseudonana* (270230) ist an dieser Position kein Cystein vorhanden (siehe Abbildung 19) und somit wahrscheinlich nicht glutathionyliert.

```

atF2_NP_197144_GQVTEVDKD-TFWPIVKAAGDKIVVLDMYTQW*CGPCKVIAPKYKELSEKYQDMVFLK
atF1_NP_186922_GQVTEVDKD-TFWPIVKAAGEKLVVLDMYTQW*CGPCKVIAPKYKALSEKYDDVVFLK
ptF_46280_SAVVDIGSESAFDQTIASAGGSLVVVDYSTTWCGPCKVIAPKFEELSEKYGDAVFLK
thF_270230_MAVVDVNSEAEFDKAVSAGADKLVVVIDYSTTWCGPCKVIAPKFDELSDQYPDSVFIK

atF2_NP_197144_L--DCN*QDNKPLAKELGIRVVPTFKILKDNKVVKEVTGAKYEDLLAAIEAARSG---
atF1_NP_186922_L--DCNPDNRPLAKELGIRVVPTFKILKDNKVVKEVTGAKYDDLVAAIETARSAASG
ptF_46280_VIGDASPASKLMKREGVRSVPSFH*YFKNGEKVDVVNGANAEEAIEAAIAKHGAER--
thF_270230_VIGDASPASKLMKREGVRSVPSFH*YFKNGSKVDVVNGANAEEAIEAAIKKHE-----

```

Abb. 19: Vergleich der Aminosäuresequenz von TrxF zwischen *Arabidopsis thaliana*, *Phaeodactylum tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana*. Die konservierte Region des aktiven Zentrums (WCGPCK) ist grau unterlegt, die wichtigen Cysteine wurden gelb unterlegt. Das Cystein an der Position 60 (C60) ist bei den TrxF von *A. thaliana* (at) zu finden, nicht aber bei den TrxF von *P. tricornutum* (pt) und *T. pseudonana* (th). Somit sind diese beiden wahrscheinlich nicht glutathionyliert (Michelet *et al.* 2005).

Bei der phylogenetischen Analyse von NADPH abhängige Thioredoxin Reduktasen (NTR) sind die NTRs der Viridiplantae und Cyanobakterien basal zu den anderen Sequenzen. Die kernkodierte periplastidäre (270256) und die cytosolische NTR (40200) von *T. pseudonana* scheinen eine rezente Duplikation zu sein, da sie eine Bootstrap Unterstützung von 100 haben. Zusammen clustern sie mit der NTR Sequenz von *P. tricornutum* (56519) (siehe Abbildung 20) mit einer Bootstrap Unterstützung von 98. Diese drei Sequenzen könnten einen gemeinsamen Ursprung haben. Die periplastidären NTRs haben eine deutlich frühe Trennung von den cytosolischen NTRs mit einer Bootstrap Unterstützung von 90. Die cytosolischen NTRs (*P. tricornutum* 51055, *T. pseudonana* 39754) sind in einem Teilstück zusammen mit Sequenzen von Viridiplantae, Ciliaten, Oomyceten und Rotalgen mit einer Bootstrap Unterstützung von 100.

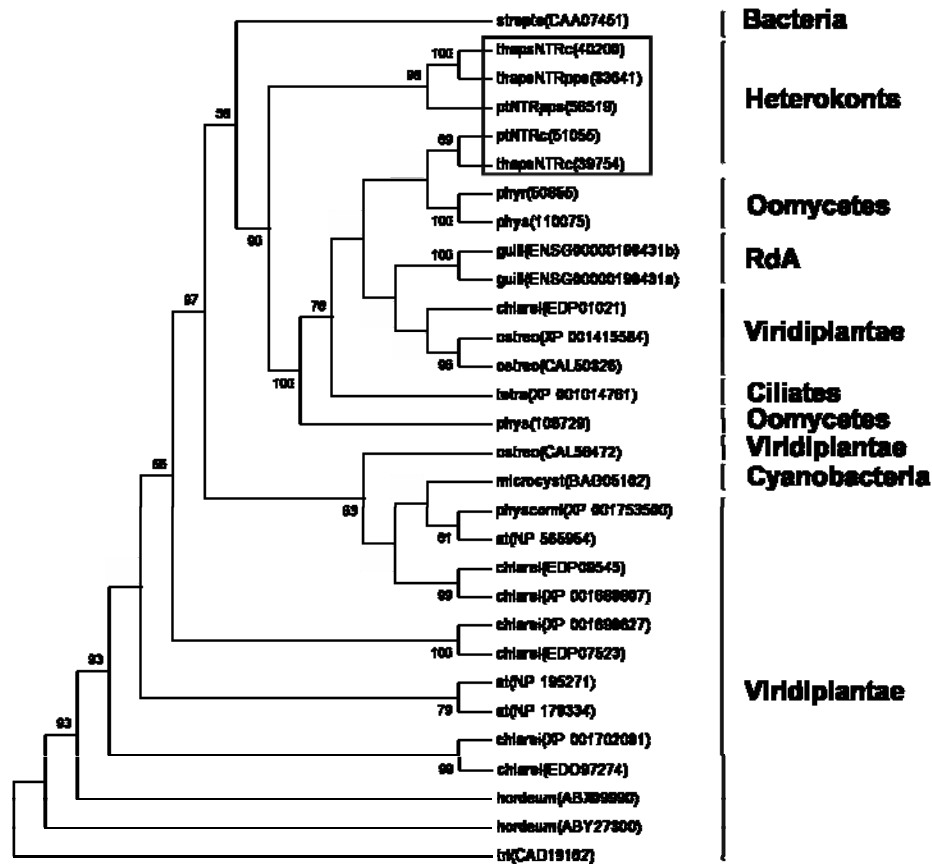


Abb. 20: Phylogenetische Analyse von NADPH abhängiger Thioredoxin Reduktase (NTR). Maximum Parsimony Baum mit Bootstrap Value über 50. Die seitlichen Markierungen verdeutlichen das Verwandtschaftsfeld der Proteine. Für die NTR aus *T. pseudonana* ergab sich teilweise neue Protein ID (alt: 33641, neu: 270256). Die in Klammern angegebenen Nummern sind die Prot ID. Abkürzungen für die Organismen: *Arabidopsis thaliana* (at), *Chlamydomonas reinhardtii* (chlairei), *Guillardia theta* (guill), *Hordeum vulgare* (hordeum), *Microcystis aeruginosa* (microcyst), *Ostreococcus tauri* (ostreo), *Phaeodactylum tricornutum* (pt), *Physcomitrella patens* (physcomi), *Phytophthora ramorum* (phyr), *Phytophthora sojae* (phys), *Streptomyces coelicolor* (strepto), *Tetrahymena thermophila* (tetra), *Thalassiosira pseudonana* (thaps), *Triticum aestivum* (tri). Viridiplantae: Grünalgen und Pflanzen, RdA: Red Alga.

Das Glutaredoxin (Grx) kann bei *P. tricornutum* und bei *T. pseudonana* in drei Gruppen eingeteilt werden. Die erste Gruppe mit zwei Cysteinen hat meistens die konservierte Region von CPYC (Buchanan und Balmer 2005) (siehe Abbildung 21). Bei *P. tricornutum* wären dies die Grxs (plastidär: 43497, periplastidär: 5649, cytosolisch: 16854) und bei *T. pseudonana* (plastidär: 270296, 3773 und 270291, cytosolisch: 270295). Die zweite Gruppe hat nur ein Cystein an der zweiten Position und mit der konservierten Region von CGFS (Buchanan und Balmer 2005) (siehe Abbildung 21). Bei *P. tricornutum* ist das die mitochondriale Grx (19158) und bei der *T. pseudonana* einmal die cytosolische (23837) und die plastidäre (270300) Grx. Die dritte Gruppe von plastidären Grxs hat in der konservierten Region keine Cysteine vorhanden, sondern jeweils durch Serine ersetzt (*P. tricornutum* 39133, *T.*

pseudonana 270299) (siehe Abbildung 21). Weiter C-terminal des konservierten Zentrums sind weitere Cysteine vorhanden, welche eventuell das alte Regulationszentrum ersetzt haben könnten (siehe Abbildung 21 (?)). Dies muß aber experimentell noch weiter untersucht werden.

```

* *
ptp_39133__IAANKKSNKVLIIYTYG--LSPFSSSEAVSMLE-ASG-YD-----YEKIELGAE
thp_270299__IVA AKKEKKALIYTYG--LSPFSSSAIELLD-SIG-YQ-----YTNIELGLE
thp_270296__IIDFTSSNPVAMYSFT--TCPFCRKAKDYLD-ENS-IP-----YTTIELDLL
thp_3733___IEEDINSAPCVMFTWE--PSPCKQAIKYLD-IAG-AK-----YKIVRLDD-
ptp_43497__AQTEIDTHAVVFSKS--RCPFCCLATKSLLN-DLK-VDG----VIVHELDQM
thp_270291__AKAEIAANDVVVFSKS--YCPFCSTSTKQLLN-KMN-ID-----AKVYELDNM
ptc_16854___IQDEIQSHDIVVFSKS--YCPYCTTTKDLLRQKLPQVD-----VAVYELDRR
thc_270295__ITSAIASNDVLI FSTT--YCTHCQQTQQLLT-RMN-VT-----PTVIELDRM
ptpps_56497__VQQHISGSDAMVFAKS--YCPYCKATRSLLM-QLQEESKTSWTLDIVDLDM
ptm_37615___IKEHVDSNRVMLYMKGNPSMPMCGFS AKVVQ-VLQSEG-----VDFSSVNIL
thc_23837___IDGHVKGKVMMLYMKGSPAQPMCGFSATVVQ-ILKSQG-----VDFASVNVL
thp_270300__IQSLVDENPVLLFMKGSKLFPCGFSNTACQ-ILQSYN-----IDFHTVDVL

? ? ?
ptp_39133__WFL LGK--ESVTRVALAKQVENGATSLPKIFIGGCIGGCSELAGLVESKE
thp_270299__WFL LGPS--ESEIRMLLSQEVNDGATSLPKIFIGEECIGGYKELCAIVESGE
thp_270296__PDNEG-----NEIRAQLGRLTRR--TSVPSIFIGGEYIGGCNDGPGLLPMK
thp_3733___PWSEG-----NPVRAELGKMVGR--SSVPCIFIGGKYVGGFDGGVGEE----
ptp_43497__--DDGA-----DVQAALATLTGQ--RTV PNVFVGGQHVGGNDDTQAAAASGK
thp_270291__--DNGA-----DIQSALLDISGQ--RTV PNVFVKGKHLGGNDDTQAAARS GK
ptc_16854___--PDGK-----TLQDELLTMTGQ--RTV PNVYVKGQHVGGNDDTQAAFRAGR
thc_270295__--KNGLGAGEDSIALKLLHLYGQ--STV PNVFIKGQHIGTNDVQAKARSGE
ptpps_56497__PEDDGP-----FLQMELLIATNQ--KTVPSIFIGGEHVGGNLELQALYNSGN
ptm_37615___--DYP-----AIREGIKKFSEW--PTIPQLYVNGEFIGGC DIVLAMHESGE
thc_23837___--DYP-----EVREGVKKYAQW--PTIPQLYVEGEFVGGC DI IKDLHESGE
thp_270300__--ADD-----EVRQGVKVFSDW--PTIPQLYVCGEFIGGSDIMIEMYQSGE

```

Abb. 21: Vergleich der Aminosäuresequenz von Glutaredoxin (Grx) von *Phaeodactylum tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana*. Die konservierten Regionen des aktiven Zentrums sind grau unterlegt, die wichtigen Cysteine wurden gelb unterlegt. Die 2 Cysteinen Gruppe hat die mehr oder weniger konservierte Region von CPYC (mit roten Sternen markiert). Die 1 Cystein Gruppe hat die konservierte Region von CGFS. Die Grx aus *P. tricornutum* (pt) und *T. pseudonana* (th) sind entweder plastidär (p), mitochondrial (m), im periplasmatischen Raum lokalisiert (pps) oder cytosolisch (c). Die jeweilige Prot ID ist dahinter geschrieben.

2.3.3 Peroxiredoxine

Bei der phylogenetischen Analyse der Peroxiredoxine (Prx) (siehe Abbildung 22) gruppieren die plastidären Prxs von *P. tricornutum* (46206, 21736) und *T. pseudonana* (1936, 3114, 270374) als Outgroup zusammen. Diese fünf Prxs sind laut Aminosäuresequenz in die „1. Cystein“ Gruppe (Dietz *et al.* 2006a) einzuordnen (siehe Abbildung 23) und trennen sich sehr früh von den anderen Peroxiredoxinen. Der phylogenetischen Äste der plastidären Prxs trennt sich mit einem Bootstrap von 100 und 96 von den anderen Prxs der Heterokonten, welche fast alle in die „II

Cystein“ Gruppe (Dietz *et al.* 2006a) einzuordnen sind (siehe Abbildung 22, 23). Das cytosolische Prx von *T. pseudonana* (270261) und das plastidäre Prx von *P. tricornutum* (56578) gruppieren untereinander mit einer Bootstrap Unterstützung von 99, aber trennen sich von den anderen Prx. Vielleicht ist die plastidäre Präsequenz des Prx von *P. tricornutum* eine spätere Errungenschaft. Dies müsste aber weiter geklärt werden. Sie trennen sich aber von den anderen Prx der „II Cystein“ Gruppe mit einer Bootstrap Unterstützung von 100. Das cytosolische Prx (270271/270263) und das im CER lokalisierte Prx (11178) von *T. pseudonana* gruppieren zusammen mit einer Bootstrap Unterstützung von 77. Die doppelte Prot ID zeigt zwei Transkriptionsmöglichkeiten des Gens an, die von verschiedenen ESTs unterstützt werden. Das cytosolische und im CER lokalisierte Prx sind laut Vergleich der Aminosäuresequenz keiner bekannten Prx-Gruppe zuzuordnen (siehe Abbildung 23). Die im CER lokalisierte Prx (22388) von *P. tricornutum* gruppiert mit Sequenzen von Bakterien zusammen mit einer Bootstrap Unterstützung von 100. Dieses Gen könnte durch einen horizontalen Gentransfer erworben worden sein.

Diese phylogenetische Analyse zeigt, dass die Prx zwar jeweils ihrer Cystein-Gruppen Einteilung gruppieren, aber innerhalb des Astes nach ihrer phylogenetischen Abstammung angeordnet sind.

Eine mitochondriale Prx (56580) von *P. tricornutum* lässt sich weder phylogenetisch, noch anhand der sowieso fehlenden Cysteine einordnen und wurde deshalb in der phylogenetischen Analyse nicht berücksichtigt. Dieses Prx hat im C-terminalen letzten Drittel der Aminosäuresequenz ein zusätzliches Stopcodon. Die nachfolgenden Aminosäuren, mit einem darin enthaltenen Cystein, werden noch als Peroxiredoxin erkannt. Dieses Prx (56580) ähnelt am meisten der PRXlike5 Klasse von *Homo sapiens*. Es gibt bei Plasmodien in diesen Fällen die Möglichkeit, daß dieses Stopcodon als Tryptophan abgelesen wird (Moore *et al.* 2008), dieses ist aber bei Pflanzen noch nicht berichtet worden. Es wäre weiter möglich, dass das Stopcodon editiert wird. Dieses Phänomen ist bei mitochondrialen mRNA häufig und seltener bei plastidären mRNA beobachtet worden (Steinhauser *et al.* 1999), jedoch nicht bei mRNA kernkodierter Genen.

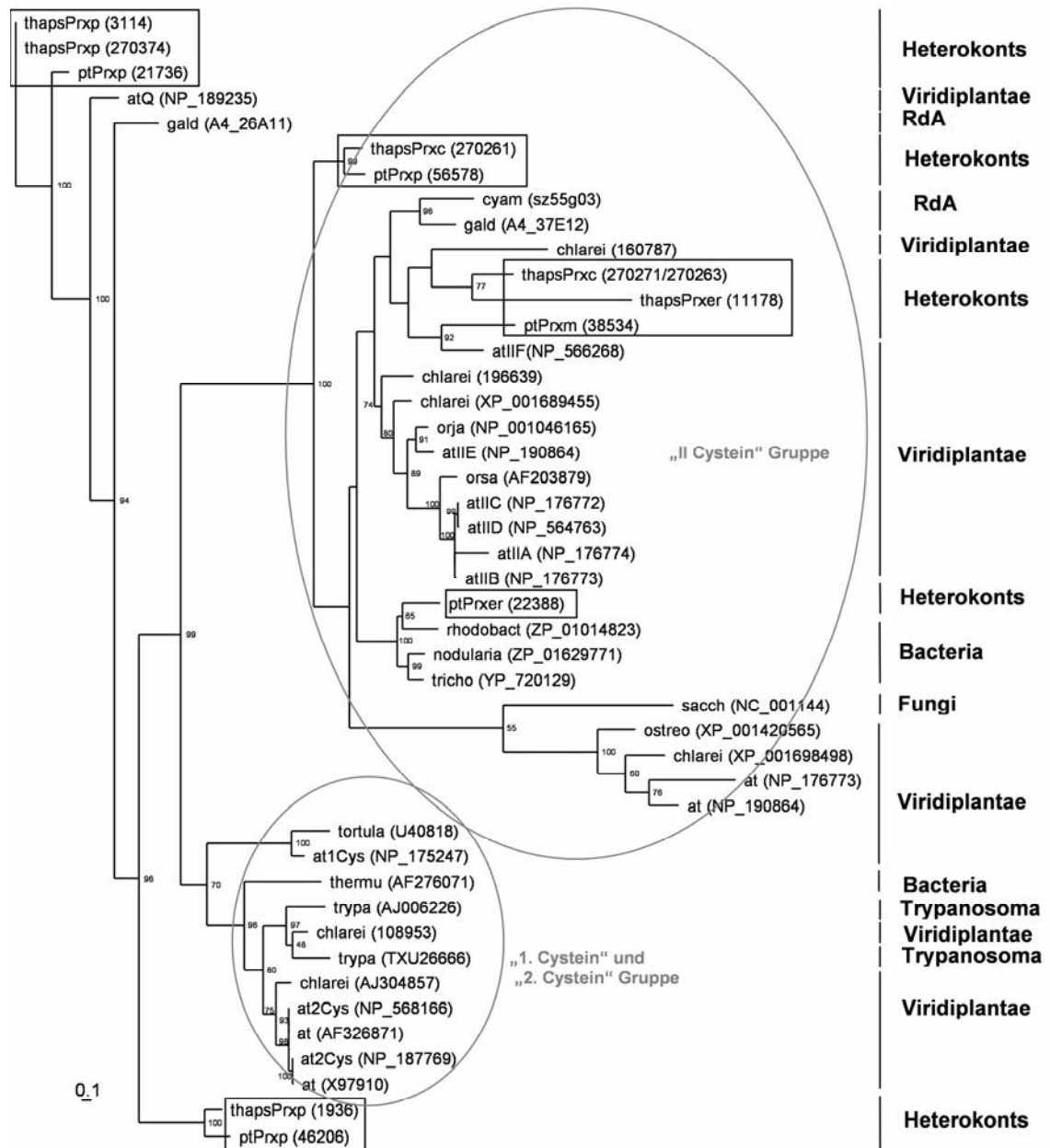


Abb. 22: Phylogenetische Analyse von Peroxiredoxin (Prx). Maximum Likelihood Baum mit angegebenen Bootstrap Value über 50. Es wurden 45 Sequenzen mit 230 Aminosäurepositionen zur Berechnung verwendet. Die seitlichen Markierungen verdeutlichen das Verwandtschaftsfeld der Proteine. Die in Klammern angegebenen Nummern sind die Prot ID. Nicht in der phylogenetischen Analyse enthalten ist die mitochondriale ptPrx (56580), da nicht genügend annotierte ähnliche Prx Sequenzen existieren; es hat die nächste phylogenetische Verwandtschaft mit humanPRDX5(AFF04856) mit einer E-Value von $8e^{-14}$ (50 bis 80 Aminosäuren). Abkürzungen für die Organismen: *Arabidopsis thaliana* (at), *Chlamydomonas reinhardtii* (chlarei), *Cyanidioschyzon merolae* (cyam), *Galdieria sulphuraria* (gald), *Nodularia spumigena* (nodularia), *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) (orja), *Oryza sativa* (orsa), *Ostreococcus tauri* (ostreo), *Phaeodactylum tricorutum* (pt), *Rhodobacteriales Bacterium* (rhodobact), *Saccharomyces cerevisiae* (sacch), *Thalassiosira pseudonana* (thaps), *Thermus aquaticus* (thermu), *Tortula marginata* (totula), *Trichodesmium erythraeum* (tricho), *Trypanosoma cruzi* (trypa). Viridiplantae: Grünalgen und Pflanzen, RdA: Red Alge. Bei den Sequenzen von *A. thaliana* sind teilweise die Cystein Gruppen Zugehörigkeit (Dietz et al. 2006a) angegeben, siehe dazu auch die Abbildung 23.

1. Cys

ptm_38534_ -SLQKARPWYMSDAEGSNMADDNAVTLKDLFKKQTVLFGVPPAPFTGTCSNEHYPGYKAL
 atIIF_NP_566268_ VSLQKARSWDEGVS-----SKFSTTPLSDIFKGGKVVIFGLPGAYTGVCSQQHVPSYKSH
 thc_36078_ VKVGDKIPSVVLKEGQADYEKPVVDVNIIGELIAGKKVALFAVPGAFTPGCSKSHLPSFITA
 ptp_14898_ --VGDITIPDVTLTELSSGEDKPVVDKIVDLIAGKKVAIFGVPGAFTPGCSKSHLPSFMEA
 atIIC_NP_176772_ --VGDVVPDGTISFFDEND-QLQTVSVHSLAAGKKVILFGVPGAFTPTCSMSHVPGFIGK
 atIID_NP_564763_ --VGDVVPDGTISFFDEND-QLQTVSVHSLAAGKKVILFGVPGAFTPTCSMSHVPGFIGK
 atIIB_NP_176773_ --VGDVVPDGTISFFDEND-QLQTVSVHSLAAGKKVILFGVPGAFTPTCSMKHVPGFIEK
 atIIA_NP_176774_ --VGDVFPDGSISFFDEND-QLQTVSVHSLAAGKKVILFGVPGAFTPTCSMNHVNGFIEK
 atIIE_NP_190864_ --VGDKLPDSTLSYLDPSTGDVKTVTVSSLTAGKKTILFAVPGAFTPTCSQKHVPGFVSK
 thp_3114_ --VGDVVPDGTISFFDEND-QLQTVSVHSLAAGKKVILFGVPGAFTPTCSQKHVPGFVSK
 thp_270374_ --VGDVVPDGTISFFDEND-QLQTVSVHSLAAGKKVILFGVPGAFTPTCSQKHVPGFVSK
 ptp_21736_ --VGETAPDFALTDQNGK-----VVKRSGIR--KPLVVYFYFYPADSTPGCTKQAT-AFNDK
 atQ_NP_189235_ --KGQAAPDFTLKQNGK-----PVSLKYYK--KPVVLYFYFYPADSTPGCTKQAC-AFRDS
 thp_31169_ --LGSPAPSFLLPNSKGGQ---QVTLDSLSSSG-KWTVLYFFPGAFTSGCTLEAR-KFQED
 ptp_12713_ --TGAKAPFFELPNSRSGG---STSLKLNLSG-KWTVLYFYFPGAFTSGCTLEAR-GFQED
 at2Cys_NP_187769_ --VGNKAPDFEAEAVFDQE--FIKVKLSYIGKKYVILFFYPLDFTFVCPTEIT-AFSDR
 at2Cys_NP_568166_ --VGNKAPDFEAEAVFDQE--FIKVKLSYIGKKYVILFFYPLDFTFVCPTEIT-AFSDR
 pter_22388_ VPEVTFLTRSRVESNDPNPFWDKLRTRTDDYFKGKRVVFAIPGAFTPTCSSTHLPGYEAA
 at1Cys_NP_175247_ --LGDVTPNLEVETHTDK-----FKLHDYFANSWTVLFSHPGDFTPVCTTELG-AMAKY
 ther_11178_ --RLATIATASLWGAAAI-----FVSSVSVGDKLPSVELHSGFPQKIDLATYATANKS
 thc_264670_ -----MMNWAKSQVGLSMLTFLGDPNSELTKALVSGRYLL

II Cys

ptm_38534_ ADDFL-QAGVDRIVC-----YSVADPYAMDGWAKALKN-----
 atIIF_NP_566268_ IDKFK-AKGIDSVIC-----VSVNDPFAINGWAEKLG-----
 thc_36078_ QKELR-EKGVDLTIC-----IATNDAYVMEAWGRTSGG-----
 ptp_14898_ QEELK-GRGVDMTIC-----VATNDAYTMEAWGRTSGG-----
 atIIC_NP_176772_ AEELK-SKGIDEIIC-----FSVNDPFFVMKAWGKTYP-----
 atIID_NP_564763_ AEELK-SKGIDEIIC-----FSVNDPFFVMKAWGKTYQ-----
 atIIB_NP_176773_ AEELK-SKGVDEIIC-----FSVNDPFFVMKAWGKTYP-----
 atIIA_NP_176774_ AEELK-SNGVDEIIC-----LSGDDPFMITAC-----
 atIIE_NP_190864_ AGELR-SKGIDVIAC-----ISVNDAFVMEAWRKDLG-----
 thp_3114_ IQAIR-KEFKADVVG-----ISGQGAESKQKFAQELG-----
 thp_270374_ IQAIR-KEFKADVVELITLTLDFLHFFVYCS--CVGISGQGAESKQKFAQELG-----
 ptp_21736_ VKELR-AKYGADLVG-----ISGQDTASKQKFASELG-----
 atQ_NP_189235_ YEKFK-KAG-AEVIG-----ISGDDSASHKAFASKYK-----
 thp_31169_ VKYH-ALN-SQIVG-----VSVDSVDKNSAF--CREEK-----
 ptp_12713_ IERYR-ALN-AQIVG-----VSVDPVEKNAQF--CSAEG-----
 at2Cys_NP_187769_ HSEFE-KLN-TEVLG-----VSVDSVFSHLAWVQTDKRSKGL-----
 at2Cys_NP_568166_ YEEFE-KLN-TEVLG-----VSVDSVFSHLAWVQTDKRSKGL-----
 pter_22388_ YDKIR-QQGVDDVYC-----LSVNDAFVMRQWGLHQGLTEDKTVGG
 at1Cys_NP_175247_ AHEFD-KRGVKLLG-----LSCDDVQSHKDWIKDIEAFNHG-----
 ther_11178_ VDALHTKAGIDEIIC-----YCVNDGAVMSAWANDLGDVNYEAGN-
 thc_264670_ CEF--CWDNCLVLFNFSG-----

ptm_38534_ -DAEKITFMADPDSLFAKAYGLDAAYDAVS--LGQRSIRFSMVVADGKVEAFHKVDDAVK
 atIIF_NP_566268_ -AKDAIEFYGDFDGKFKHKSGLGLDKDLAAL--LGRPSRERSAYVEDGKVAKNV-VEEAPS
 thc_36078_ -ADAGIRFLSDANAELSRALGLSMENDVM----VTRKRFSLIAEDGIVTHY-FSSADAS
 ptp_14898_ -SDVGIRFLADNSGFTLTKELGLVMEPTVG----IRTKRFLSLIAEDGKVTYK-FSSAKDS
 atIIC_NP_176772_ -ENKHVKFVADGSGEYTHLLGLELDLKD--GLGIRSRFFALLLDNLKVTVANVESGGEF
 atIID_NP_564763_ -ENKHVKFVADGSGEYTHLLGLELDLKD--GLGIRSRFFALLLDNLKVTVANVENGGEF
 atIIB_NP_176773_ -ENKHVKFVADGSGEYTHLLGLELDLKD--GLGVRSRFFALLLDNLKVTVANVESGGEF
 atIIA_NP_176774_ -ENKHVKFVEDGSGEYIQLLGLELEVVDK--GLGVRSRFFALLLDNLKVIIVNVGSGGD
 atIIE_NP_190864_ -INDEVMLLSDNGEFTGKLGVELDLRDKPVGLGVRSRRYAILADDGVVVKVNLLEEGAF
 thp_3114_ ---LDFSILADEGDAVRSFAK--VPKAAFG----FLPGRVTVYLDKNGVCTSVYDNIAD-
 thp_270374_ ---LDFSILADEGDKVRKEFN--VPRAAFG----LLPGRVTVYLDKNGVCTSVYDNIAD-
 ptp_21736_ ---LDFSILADEGDKVRKEFN--VPRAAFG----LLPGRVTVYLDKNGVCTSVYDNIAD-
 atQ_NP_189235_ ---LPYTLLSDEGNKVRKDWG--VPGDLFG----ALPGRQTVYLDKNGVQQLIYNNQFQ-
 thp_31169_ ---LDFMMLTDEGGSSISKAYGSSLSIPGFG----TFSNRQTYIIDPQQNVRWVFDVESH
 ptp_12713_ ---LDFYMLSDTGGRVSNLSYSGALSVPFGFG----MFSNRQTYIIDPEGNLRWVFTDVESR
 at2Cys_NP_187769_ -GDLNYPILISDVTKSISKSGVLIHQGIA----LRG---LFIIDKEGVIQHSITINLNG-
 at2Cys_NP_568166_ -GDLNYPILVSDITKSISKSGVLIHQGIA----LRG---LFIIDKEGVIQHSITINLNG-
 pter_22388_ -LGFTKVKLIPDGAFAAFTRGMGMSTLWDVER-GFGERSWRYSMVVNDGVIEKLFVEQPLLQ
 at1Cys_NP_175247_ -SKVNYPIIADPNKEIIPQLNMIDPIENGP-----SRALHIVGPDISKIKLSFLYPSST
 ther_11178_ -DKGRLTFLGDPEGLTRKLEMETHPGPIS--VGIIGRLNGEVKYVAVSEAEDDPAGDE
 thc_264670_ ---SNVCI IQDLELTHPGPVGLGPGRC--KR----FAMHVVDGVIKAVNVSESADDPGDS

2. Cys

```

ptm_38534_      DAETLLADVKEWKDHQ-----
atIIF_NP_566268_ DFKVTGAEVILGQI-----
thc_36078_     DNTWAPNVLAAL-----
ptp_14898_     SDTWAPNVLSAL-----
atIIC_NP_176772_ TVSSAEDILKAL-----
atIID_NP_564763_ TVSSAEDILKAL-----
atIIB_NP_176773_ TVSSADDILKAL-----
atIIA_NP_176774_ SLFQLMKMTTTTMSNLPTDLLEEIISRVPRKYMRAVRLTCKRWNGMFKSQSFTKMH
atIIE_NP_190864_ TNSSAEDMLKAL-----
thp_3114_      AASHIGAAKEALAAMKPAKKGFFESLPP-----
thp_270374_    AASHIGAAKEALAAMKPAKKGFFESLPP-----
ptp_21736_     AESHVDEAIEVLADLKQSQGPLAGFLG-----
atQ_NP_189235_  PEKHIDETLKFLKAA-----
thp_31169_    IPRHSAEVLEKLELQAV-----
ptp_12713_    IARHSVEVLEKLELETVKA-----
at2Cys_NP_187769_ IGRSVDETMRTLQALQYIQENPDEVCPAGWKPGKESMKPDPKLSKEYFSAI-----
at2Cys_NP_568166_ IGRSVDETMRTLQALQYVQENPDEVCPAGWKPGKESMKPDPKLSKEYFSAI-----
pter_22388_    NSGPDPFEVSDADTMLAYLQKTEL-----
at1Cys_NP_175247_ GRNMDEVLRALDSLLMASKHNNKIATPVNWKPDQPVVISPAVSDEEAKKM-----
ther_11178_    NPEKTLAPAILDAIVGLKDEL-----
thc_264670_    DPSASLADGIMATMK-----

```

Abb. 23: Vergleich der Aminosäuresequenz von Peroxiredoxin (Prx) von *Arabidopsis thaliana* (at), *Phaeodactylum tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana*. Die konservierten Regionen des aktiven Zentrums mit den wichtigen Cysteinen wurden gelb unterlegt. Die „2 Cysteinen“ Gruppe hat die Cysteine an der „1. Cysteinen“ und „2. Cysteinen“ Stelle (rot markiert und eingekreist). Die „II Cysteinen“ Gruppe hat einmal das erste Cystein an der „1. Cystein“ Position und das zweite Cystein an der „II Cystein“ Position. Die zweite Gruppe wird auch „1 like 2 Cystein“ Gruppe genannt (Goyer *et al.* 2002). Die 2/II Einteilung erfolgte nach Dietz *et al.* (2006a) und die darin angegebenen Referenz Prx aus *A. thaliana* (at). Die Prx aus *P. tricornutum* (pt) und *T. pseudonana* (th) sind entweder plastidär (p), mitochondrial (m), im ER lokalisiert (er) oder cytosolisch (c). Die jeweilige Prot ID oder Accession Nummer ist dahinter geschrieben.

3. Diskussion

3.1 Calvin Zyklus

Durch die Genomanalyse nach Proteinen des Calvin Zyklus konnten in *P. tricornutum* und *T. pseudonana* alle Gene für die Proteine des Calvin Zyklus (reduktiver Pentose Phosphatweg, RPP) (Calvin *et al.* 1948) und des oxidativen Pentose Phosphatweg (OPP) identifiziert werden (siehe Anhang Tabelle 1 und 2). Im Gegensatz zu höheren Landpflanzen ist der plastidäre RPP und cytosolische OPP getrennt lokalisiert. Die experimentellen Ergebnisse von Michels *et al.* (2005) an *Odontella sinensis* konnten somit an den Diatomeen *P. tricornutum* und *T. pseudonana* bestätigt werden (Kroth *et al.* 2007). Es kann davon ausgegangen werden, daß der RPP und OPP generell in Diatomeen in verschiedenen Kompartimenten lokalisiert ist. Zumindest in *P. tricornutum* (9583) und *T. pseudonana* (3523) fehlt die SBPase in den Plastiden, ihre enzymatische Reaktion kann durch die TAL übernommen (siehe Abbildung 4 A, B) worden sein, oder durch eine von den plastidären FBPasen, wie es für eine cyanobakterielle FBPase gezeigt worden ist (Tamoi *et al.* 1996). Nur bei *P. tricornutum* ist eine Transkriptionsvariante (45333) des Gens für PGDH sehr wahrscheinlich im periplastidären Raum (pps) lokalisiert. Durch die enzymatische Reaktion würde dort neben der Regeneration von NADP zu NADPH auch CO₂ freigesetzt. Dieses freigesetzte CO₂ wird wahrscheinlich sofort wieder zu HCO₃⁻ für die Kohlenstoffaufkonzentrierung gebunden (Kroth *et al.* 2007, Roberts *et al.* 2007) oder diffundiert weiter ins Stroma in Richtung RUBISCO. Das regenerierte NADPH kann im pps für periplastidäre Proteine oder membrangebundene Translokatoren zur Verfügung stehen. Ein periplastidäres Protein, welches NADPH zur Reduktion benötigt, wäre die NTR. Wiederum nur in *P. tricornutum* ist ein cytosolisches Fusionsprotein GPDH-PGDH (54663) vorhanden, es ist fraglich ob die enzymatische Reaktion des Fusionsproteins in Verbindung mit der cytosolischen PGL (31882) schneller abläuft. Die PGDHs sind zumindest „plastidären Ursprungs“, d.h. die Gene müssten eher von aufgenommenen Cyanobakterien abstammen, als von der Wirtszelle. Es ist erkenntlich, daß die Gene dupliziert wurden, aber wann dies geschah, vor oder nach der sekundären Endocytobiosis ist unklar (siehe Abbildung 17). Ebenso haben die plastidären PGLs bei *P. tricornutum* und bei *T. pseudonana* sich früh von den cytosolischen PGLs im Rahmen der Endocytobiosis phylogenetisch getrennt. Bei *P. tricornutum* und bei *T. pseudonana*

sind in den Plastiden mehrere Isoformen der FBPase vorhanden (siehe Anhang Tabelle 1 und 2). Nur bei FBPC2 (42456) und FBPC3 (31451) der *P. tricornutum* kann die Enzymaktivität durch Reduktion der Cysteine gesteigert werden (siehe auch Kapitel 3). Die notwendigen Cysteine sind dafür vorhanden. Ob die FBPasen in *P. tricornutum* und *T. pseudonana* jeweils als Hetero- oder als Monotetramere vorliegen, muss noch geklärt werden. Diese verschiedenen Formen der Oligomerisierung der FBPasen untereinander sind ausschlaggebend, ob eine Regulation durch TrxF alle verschiedenen plastidären FBPasen in *P. tricornutum* gleichzeitig möglich ist oder nicht. Wenn die verschiedenen plastidären FBPasen in *P. tricornutum* ein Heterotetramer bilden, wären die FBPasen C1 und C4 über die Regulation der FBPasen C2 und C3 durch TrxF indirekt auch reguliert. Wenn die vier verschiedenen FBPasen jeweils nur Monotetramere bilden würden, wäre eine Regulation durch TrxF nur bei den Monotetrameren aus FBPC2 und FBPC3 möglich. Wie eine Regulation bei den Monotetrameren aus FBPC1 und FBPC4 möglich ist, müsste weiter geklärt werden. Eine andere Möglichkeit zur Regulierung des Calvin Zyklus ist die direkte Substrat- oder Produkthemmung der Enzyme durch die spezifischen Zucker. Spezifische Cofaktoren, wie Mg^{2+} für die FBPase, können bei zu hoher Konzentration das Protein wiederum hemmen (Han *et al.* 1975, Kelly *et al.* 1982, Rakus *et al.* 2004). Die Gene für die FBPC2 (42456) und C3 (31451) in *P. tricornutum* sind wahrscheinlich durch Genduplikation entstanden. Die cytosolischen und plastidären FBPasen in *P. tricornutum* und *T. pseudonana* haben einen gemeinsamen genetischen Ursprung, welcher noch vor der ersten Endocytobiosis zurückgeht (siehe Abbildung 13). Die Gene für die FBPasen (sowie für die SBPase) können sogar eventuell von der ersten heterotrophen Wirtszelle abstammen (Reyes-Prieto und Bhattacharya 2007). Einige der Enzyme des RPP sind allerdings durch Enzyme von Proteobakterien, bzw. von Eubakterien ersetzt worden (Martin *et al.* 1997, 2000).

Die plastidär kodierte RUBISCO ist das Schlüsselenzym für den Calvin Zyklus, welches die CO_2 -Fixierung an Ribulose-1,5-Bisphosphat katalysiert. Es gibt bis zu vier verschiedene Formen der RUBISCO (Tabita *et al.* 2008). Die Form I, welche sich aus 8 große und 8 kleine Untereinheiten (L_8S_8) zusammensetzt (Knight *et al.* 1990), kann in vier verschiedene Subgruppen (A bis D) eingeteilt werden. Landpflanzen haben eine RUBISCO in der Form IB, Diatomeen aber haben eine RUBISCO in der Form ID, welche sehr ähnlich zu der proteobakteriellen Form IC ist (Badger und Bek

2008, Wawrik *et al.* 2002). Das Proteobakterium (*Rhodospirillum rubrum*) hat keine RUBISCO Aktivase. Diese Ähnlichkeit der RUBISCO könnte unter anderem ein Grund sein, dass Diatomeen auch keine RUBISCO Aktivase haben. Die RUBISCO muss dann auf eine noch unbekannt Art reguliert werden. Bei *P. tricornutum* ist die diurnale Transkriptionsrate der RUBISCO evtl. eine Möglichkeit der Regulation (Wawrik *et al.* 2002).

3.2 Regulationsfaktoren des Calvin Zyklus

Durch die Genomanalyse nach Proteinen des Ferredoxin/Thioredoxin System konnten in *P. tricornutum* und *T. pseudonana* Gene für Thioredoxine (Trx) F,M,Y,O und H identifiziert werden (siehe Anhang Tabelle1 und 2). Es konnten keine Trxs identifiziert werden, die dem Typ X entsprächen. Die TrxFs von *P. tricornutum* (46280) und *T. pseudonana* (270230) haben, im Vergleich zu TrxFs aus *A. thaliana*, kein glutathionylierbares Cystein C-terminal vorhanden (Michelet *et al.* 2005). Entweder dieser inhibierende Regulationsmechanismus am TrxF durch Glutathion ist in der evolutionären Linie der Grünalge und höheren Landpflanzen entwickelt worden oder die Diatomeen haben diesen Mechanismus verloren. Jedenfalls sind die TrxFs von *P. tricornutum* und *T. pseudonana* durch die jeweilige Ferredoxin-Thioredoxin Reduktase (FTR) reduzierbar und aktivierbar. Bei *P. tricornutum* sind zwei plastidäre FBPasen (FBPC2 42456, FBPC3 31451) vorhanden, die sehr wahrscheinlich regulative Zielproteine des TrxF sind. Bei *T. pseudonana* sind die beiden plastidären FBPasen (25437, 5601), aufgrund der fehlenden reduzierbaren Cysteine, wahrscheinlich durch TrxF nicht aktivierbar. Das TrxM aktiviert unter anderem im RPP die GAPDH bei höheren Landpflanzen. Bei GAPDHs von *P. tricornutum* (22122, 51128, 51129) und bei *T. pseudonana* (270231) entsprechen der GAPDH-C Gruppierung mit eubakteriellen Ursprungs (Kroth *et al.* 2007), d.h. sie haben keine zur Reduzierung benötigten C-terminalen Cysteine (Liaud *et al.* 2000). Das TrxM kann somit nicht regulativ über die GAPDH im RPP wirken. Welche anderen Zielproteine das TrxM in den Diatomeen hat, muss noch weiter geklärt werden. Die NADPH abhängige Thioredoxin Reduktase (NTR) reduziert TrxH, welches wiederum die Peroxiredoxine (Prx) reduzieren kann (Dietz *et al.* 2006a). Die NTRs von *P. tricornutum* (51055, 56519) und *T. pseudonana* (270256, 40200, 39754) sind evolutiv zur ersten Endocytobiosis der heterotrophen Wirtszelle mit einem Cyanobakterium zurückzuführen (siehe Abbildung 20). Es ist aber unklar, ob die Gene von der ersten

Wirtszelle oder vom Cyanobakterium stammen, da in der phylogenetischen Analyse keine bakteriellen Sequenzen herangezogen wurden. Bis jetzt wurden NTRs und TrxHs in höheren Landpflanzen nur im Cytosol identifiziert. Bei *P. tricornutum* und *T. pseudonana* sind beide Proteintypen wahrscheinlich auch im periplastidären Raum (pps) vorhanden. Dieser Raum entspricht dem Cytosol der Rotalge, bevor sie von einer heterotrophen Wirtszelle endocytobiotisch aufgenommen wurde (Keeling *et al.* 2004). Dies kann ein weiterer Hinweis in Diatomeen sein, neben der PGDH von *P. tricornutum*, dass im periplastidären Raum nicht nur Transportvorgänge (Gruber *et al.* 2007) stattfinden, sondern auch ganze Stoffwechselwege ablaufen, ähnlich wie in den Glaucophyten und der Stärkesynthese (Gould *et al.* 2006a).

Das Glutaredoxin (Grx) wird entweder durch FTR und NTR oder durch die Glutathionreduktase reduziert und aktiviert. Die plastidären Glutaredoxine in höheren Pflanzen deglutathionylieren unter anderem das glutathionylierte TrxF. Dieses „Fine Tuning“ System des Ferredoxin/Thioredoxin Systems fällt aber in *P. tricornutum* und in *T. pseudonana* weg. Außerdem konnte in höheren Landpflanzen eine Interaktion von Glutaredoxin und TrxH beobachtet werden, der genauere Zusammenhang ist aber noch unbekannt (Buchanan und Balmer 2005, Dietz *et al.* 2006a). Glutathionylierung von Proteinen führt zur Inhibierung der Enzymaktivität, ob dies auch bei Enzymen des RPP (Triosephosphat Isomerase und Aldolasen, Ito *et al.* 2003) von *P. tricornutum* und *T. pseudonana* geschieht, ist noch nicht untersucht worden, bzw. es ist noch zu wenig über diesen Prozess bekannt (Kroth *et al.* 2007, Lemaire *et al.* 2007). Das zur Glutathionylierung von Proteinen notwendige Glutathion wird in *P. tricornutum* und *T. pseudonana* jeweils durch eine cytosolische Glutathion-Synthase (GS) synthetisiert und jeweils durch eine cytosolische Glutathionreduktase (GR) reduziert. In den Plastiden konnte keine GS und GR identifiziert werden. Damit plastidäre Proteine durch reduziertes Glutathion glutathionyliert werden, müsste reduziertes Glutathion durch die vier plastidären Membranen diffundieren oder transportiert werden. Bei *A. thaliana* konnte zumindest plastidäre Glutathion-Synthasen identifiziert werden (Wachter *et al.* 2005). Glutaredoxine können auch ROS (reactive oxygen species) in der Zelle inaktivieren (Dietz *et al.* 2006a).

Nur in *T. pseudonana* konnte ein kernkodierte Gen für ein mögliches CP12 (270287) Protein identifiziert werden (Boggetto *et al.* 2007) (siehe Anhang Tabelle 2), welches für die Redoxregulation der plastidären Glyceraldehyd-3-Phosphat

Dehydrogenase (GAPDH, 270231), bzw. auch für die Phosphoribulokinase (PRK, 4376) zuständig sein könnte (Oesterhelt *et al.* 2007, Reyes-Prieto und Bhattacharya 2007, Wedel *et al.* 1998). Der GAPDH-C fehlen aber die nötigen Cysteine für eine Regulation von Trx oder für eine Bindung des CP12 Proteins. Bei der Rotalge *Galdieria sulphuraria*, wie auch bei *T. pseudonana* sind bei dem CP12 Protein nur zwei der vier Cysteine vorhanden. Das CP12 Protein ist somit nicht mehr in der Lage intramolekulare Disulfidbrücken für die Selbst-Inaktivierung zu bilden (Oesterhelt *et al.* 2007), bzw. kann eine Komplexbindung mit nur einem Protein durchzuführen. Die PRK hat ein *in vivo* nicht vorliegendes Redoxpotential (Michels *et al.* 2005), aber hat Cysteine vorhanden, über die das CP12 Protein oligomerisieren könnte. Hier wäre eine Regulationsmöglichkeit vorhanden, ob dies aufgrund des Redoxpotentials der PRK stattfindet ist aber fraglich.

Peroxiredoxine (Prx) sind für die Reduktion und Inaktivierung der für die Zelle gefährlichen ROS (reactive oxygen species) zuständig (Dietz *et al.* 2006a). Peroxiredoxine haben im Gegensatz zu Glutathion und Ascorbat ein breiteres Spektrum von Peroxiden, wie H₂O₂, Alkylperoxide und Peroxinitrite. Somit werden Proteine und DNA in der Zelle vor oxygenen Schäden geschützt (Goyer *et al.* 2002, Winyard *et al.* 2005). Die plastidären Peroxiredoxine in *P. tricornutum* und *T. pseudonana* können mitunter durch das TrxY reduziert und aktiviert werden (Dietz *et al.* 2006a). Sie können der „1 Cystein“ Gruppe zugeordnet werden. Die Peroxiredoxine der „2 Cystein“ Gruppe fehlen in *P. tricornutum* und *T. pseudonana*, diese würden aber durch das Thioredoxin Typ X reduziert (Dietz *et al.* 2006a), welche in *P. tricornutum* und *T. pseudonana* auch nicht vorhanden sind. Die Peroxiredoxine der „2 Cystein“ Gruppe und die Thioredoxine Typ X kommen bei höheren Landpflanzen vor (Dietz *et al.* 2006a). Vielleicht sind diese Prx und Trx Typ X bei der Rotalgenlinie sekundär verloren gegangen. Dies könnte eine Erklärung sein, das bei *P. tricornutum* und *T. pseudonana* diese Protein-Gruppen nicht existieren.

Die RUBISCO Aktivase konnte bis jetzt weder in *P. tricornutum* noch in *T. pseudonana* per Genomanalyse identifiziert werden. Sie ist für eine Regulation der RUBISCO in höheren Landpflanzen notwendig (Zhang *et al.* 1999). Aktuell wird angenommen, dass die RUBISCO nicht regulierbar ist, experimentelle Daten dazu fehlen noch.

Kapitel 2 Identifizierung von möglichen Zielproteinen von Thioredoxin F in *Phaeodactylum tricornutum*

1. Einleitung

Photoautotrophe Organismen (Landpflanzen, Moose, Algen) fixieren CO₂ im Calvin Zyklus in den Plastiden und schleusen es so in den Kohlenstoffkreislauf ein (Calvin 1948). Im Chloroplasten ist an den Calvin Zyklus (reductive Pentosephosphate Pathway, RPP) noch ein weiterer Weg gekoppelt: der oxidative Pentosephosphatweg (OPP). Dieser OPP regeneriert verbrauchte NADPH unter Abspaltung eines CO₂ und synthetisiert gleichzeitig Pentosephosphate (Ribulose-5-Phosphat), welche für die Biosynthese von Aminosäuren, Nukleotiden und Fettsäuren verwendet werden. Obwohl beide Zyklen, der RPP und der OPP für das Überleben von phototrophen Organismen lebensnotwendig sind, dürfen sie nicht beide gleichzeitig ablaufen, ansonsten käme es zu einem gleichzeitigen Verbrauch von ATP ohne Nettofixierung von CO₂ („futile cycle“). Um dies zu verhindern, werden der RPP und der OPP durch das Ferredoxin/Thioredoxin-System reguliert (Buchanan und Balmer 2005, Wilhelm 2006). In den Plastiden der Landpflanzen wird die Glukose-6-Phosphat Dehydrogenase (GPDH) als erstes Enzym der OPP durch ein Thioredoxin (Trx) im Licht reduziert und dadurch deaktiviert (Martin *et al.* 2000). Beim RPP werden durch das Trx die Enzyme Phosphoribulokinase (PRK), die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH), die Fruktose-1,6-Bisphosphatase (FBPase) und die Seduheptulose-1,7-Bisphosphatase (SBPase) am Tage reduziert und dadurch aktiviert. Die RUBISCO Aktivase wird durch TrxF bei Licht ebenfalls reduziert und aktiviert. Die reduzierte Aktivase katalysiert die Aktivierung der RUBISCO unter Verbrauch von ATP (Lemaire *et al.* 2007, Portis 2003). In *P. tricornutum* und *T. pseudonana* konnte bis jetzt kein Gen für die RUBISCO Aktivase identifiziert werden. Neben Proteinen der RPP und OPP werden noch andere Proteine durch Thioredoxin reguliert. So wird u.a. das plastidäre Enzym NADP-Malat Dehydrogenase (NADP-MDH) durch Thioredoxin aktiviert, welches unter Verbrauch von NADPH die Oxidation von Malat zu Oxalacetat katalysiert. Dieses Enzym ist in der oxidierten Form inaktiv (Lemaire *et al.* 2007). Ebenfalls in den Plastiden höherer Pflanzen wird die ATPase durch Thioredoxin aktiviert. Die ATPase synthetisiert ATP unter Einfluss eines pH Gradienten über die Thylakoidmembran, der bei Belichtung aufgebaut wird. Im Dunkeln fällt dieser pH

Gradient weg und die ATPase würde ATP wieder zu ADP spalten. Dies wird durch die Regulation durch das Thioredoxin verhindert (Nalin und McCarty 1984, Schwarz *et al.* 1997). Bei höheren Landpflanzen wird das Enzym Acetyl-CoA Carboxylase (ACCase), welches den ersten Schritt in der *de novo* Fettsäurebiosynthese katalysiert, durch das Thioredoxin reguliert (Sasaki *et al.* 1997, Hunter und Ohlrogge 1998, Kozaki *et al.* 2001). Bei der Stärkebiosynthese in höheren Landpflanzen wird das Enzym ADP-Glucose Pyrophosphorylase (AGPase) bei Licht durch Thioredoxin aktiviert (Geigenberger *et al.* 2005). Die Thioredoxine in Landpflanzen können in verschiedene Gruppen eingeteilt werden (siehe auch Kapitel 1). Die plastidären Thioredoxine sind Typ F, M, Y und X. Das Thioredoxin (Trx) Typ F reguliert u.a. die Fructose-1,6-Bisphosphatase (FBPase), die Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase (GAPDH) (Lemaire *et al.* 2007). Durch das TrxM und TrxF werden u.a. PRK, Seduheptulose-1,7-Bisphosphatase (SBPase), NADP-MDH, ATPase, RUBISCO Aktivase, ACCase und AGPase reduziert. Die GAPDH wird nur durch TrxM reduziert (Lemaire *et al.* 2007). Die Peroxiredoxine (Prx), welche in der Zelle ROS (Reactive Oxygen Species) inaktivieren, können aufgrund der regulativ wichtigen Cysteine in verschiedene Gruppen eingeteilt werden (Dietz *et al.* 2006a) (siehe auch Kapitel 1). Die „2-Cystein“ Prx werden durch das TrxX reguliert, während das Prx-Q durch das TrxY reduziert wird (Lemaire *et al.* 2007). Die Regulation der Zielproteine der Thioredoxine findet über die Reduzierung der Cysteine, bzw. deren SH-Gruppen, statt. Die Cysteine der Thioredoxine werden zuerst über die Reduktase reduziert, das so aktivierte Thioredoxin aktiviert anschließend ein Zielprotein (siehe auch Kapitel 1).

Diatomeen besitzen die Gene für die plastidären Thioredoxine M und F. Die FBPase kann in Pflanzen nur eine spezifische Interaktion mit dem TrxF eingehen (Buchanan 1980, Jacquot *et al.* 1997). Die GAPDH wird in Pflanzen vor allem durch TrxM reduziert (Howard *et al.* 2008, Scheibe *et al.* 1996). Welche spezifischen Interaktionen mit Proteinen die TrxF und TrxM in *P. tricornutum* und *T. pseudonana* eingehen, weiß man noch nicht. Bei den Diatomeen *P. tricornutum* und *T. pseudonana* sind der reduktive und der oxidative Pentosephosphatweg räumlich voneinander getrennt (siehe Kapitel 1). Bei *P. tricornutum*, *T. pseudonana* und *Odontella sinensis* (Michels *et al.* 2005) ist in den Plastiden nur der RPP vorhanden. Die SBPase ist im Cytosol lokalisiert und vermutlich in den OPP physiologisch eingebunden. Die PRK besitzt zwar die für die Regulation durch Reduktion notwendigen Cysteine in der konservierten Region, allerdings ist das Redoxpotential

des Proteins zu positiven Werten hin verschoben, so dass es unter natürlichen Bedingungen stets aktiv ist (Michels *et al.* 2005). Die plastidäre GAPDH in Diatomeen unterscheidet sich von der GAPDH von höheren Landpflanzen und Grünalgen und wird als GAPC bezeichnet. Dieser GAPC fehlt die C-terminale Extension (CTE) des CP12 Proteins (Boggetto *et al.* 2007). Die GAPA aus höheren Pflanzen aggregiert mit der Phosphoribulokinase (PRK) zu einem Homotetramer. Solche Aggregate konnten in *Odontella sinensis* nicht nachgewiesen werden (Michels, unveröffentlicht). In *P. tricornutum* und *T. pseudonana* ist die FBPase bislang das einzige bekannte Enzym, das über TrxF reguliert werden kann. In *T. pseudonana* sind zwar zwei FBPasen in den Plastiden vorhanden, aber es fehlen die notwendigen hochkonservierten Cysteine (siehe Kapitel 1 und Kroth *et al.* 2007). Interessanterweise konnte im Genom der *T. pseudonana* ein Gen für ein CP12 Protein gefunden werden (Boggetto *et al.* 2007). Bei *P. tricornutum* sind vier FBPasen vorhanden, von denen zwei Enzyme (FBPC2, FBPC3) die notwendigen Cysteine in der konservierten Region zur Reduzierung durch das Trx besitzen (Ruelland und Miginiac-Maslow 1999) (siehe Kapitel 1). Bei *P. tricornutum* könnte der RPP über Thioredoxin F durch die FBPasen reguliert werden, während bei *T. pseudonana* der RPP eventuell über eine Enzymkomplexbildung von PRK und CP12 Protein reguliert werden kann. Daher ist es wichtig zu wissen, welche weiteren Zielenzyme das Trx im Plastid von *P. tricornutum* und *T. pseudonana* hat.

Thioredoxin ist ein kleines (12,5 kDa) ubiquitär vorkommendes Protein und besitzt vier α -Helices und fünf β -Sheets (Eklund *et al.* 1984, 1991, Qin *et al.* 1994, Capitani *et al.* 2000). Es besitzt in seinem aktiven Zentrum (WCGPCK) zwei Cysteine, über die es unter Dithiol-Disulfidbrückenbildung die Zielenzyme reduziert. Zuerst muß das Thioredoxin durch die Reduktase reduziert werden, bevor es die Zielenzyme reduzieren kann. Die Zielenzyme haben ebenfalls Cysteine, die in der korrekten sterischen Anordnung vorliegen (es muß ein Abstand der Sulfhydrylgruppen der Cysteine unter 10 Å vorhanden sein) (Buchanan 1991, Jacquot *et al.* 1997, Motohashi *et al.* 2001, Schürmann 1995) (siehe Abbildung 1). Bei der Dithiol-Disulfidbrückenbildung der Cysteine des TrxF und des Zielenzymes ist das jeweilige erste N-terminale Cystein im aktiven Zentrum, welches die erste Bindung eingeht (Brandes *et al.* 1993). Das zweite Cystein mit seiner Sulfhydrylgruppe geht auch eine Disulfidbindung mit dem ersten Cystein des TrxF ein.

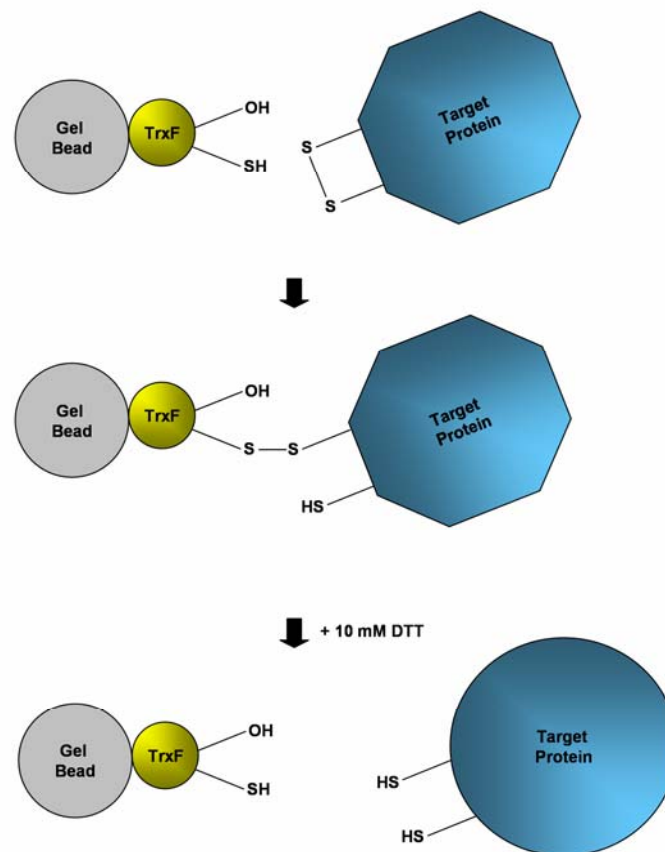


Abb. 1: Schematische Darstellung der Thioredoxin (Trx) Affinitätschromatographie nach Motohashi *et al.* (2001). Das erste Cystein mit seinem reduziertem Schwefelatom (SH) und das Serin mit seiner OH-Gruppe, welches durch eine Mutagenese-PCR von Cystein zu Serin mutiert wurde, binden die Zielproteine (Target Protein). Das modifizierte Trx ist selber an CNBr-aktivierte Sepharose (Amersham) gebunden laut Herstellerangaben. Um die Zielenzyme vom mutierten TrxF zu lösen, wird 10 mM reduziertes DTT zu den an das mutierte Trx gebundene Proteinen gegeben. Für mehr Details siehe Material und Methoden.

Diese erste Disulfidbindung wird durch das zweite Cystein des TrxF in der Disulfidbindung beeinflusst und so löst sich das Zielenzym vom TrxF wieder und ist an den beiden Cysteinen reduziert (Brandes *et al.* 1993, Hisabori *et al.* 2005), bzw. enzymatisch aktiv durch eine Konformationsänderung. Das TrxF ist danach oxidiert, (die SH-Gruppen der beiden Cysteine bilden untereinander eine Disulfidbrücke) und muß anschließend von der Ferredoxin/Thioredoxin Reduktase (FTR) wieder reduziert werden.

Wenn das zweite Cystein im aktiven Zentrum (WCGPSK) des TrxF durch ein Serin ausgetauscht wird, kann es nicht mehr die lösende Eigenschaft übernehmen und das Zielenzym bleibt am TrxF gebunden. Erst wenn ein starkes Reduktionsmittel

dazugegeben wird, kann die Bindung gelöst werden (Verdoucq *et al.* 1999, Motohashi *et al.* 2001, Hisabori *et al.* 2005, Hosoya-Matsuda *et al.* 2005). Durch Bindung an eine solche Affinitätschromatographiesäule konnten RUBISCO Aktivase, GAPDH, Seduheptulose-1,7-Bisphosphatase, ein „2-Cystein“ Prx und die kleine Untereinheit der RUBISCO isoliert und identifiziert werden (Motohashi *et al.* 2001). Wenn nun über eine solche Säule stromale oder cytosolische Proteine gegeben werden, kann jedes Protein an das mutierte TrxF binden, welche an der Oberfläche liegende Cysteine haben. Nach Auswaschen nicht gebundener Proteine von der Affinitätssäule, werden die spezifisch gebundenen Proteine wieder durch DTT vom TrxF gelöst (Motohashi *et al.* 2001, Hisabori *et al.* 2005, Hosoya-Matsuda *et al.* 2005). Mit dieser Methode konnten viele bekannte Proteine aus dem RPP und OPP, aber auch viele neue Proteine identifiziert werden, welche als Zielproteine von Trx bislang unbekannt waren, z.B. das Peroxiredoxin Typ Q (Dietz *et al.* 2006a, Motohashi *et al.* 2001, Hisabori *et al.* 2005).

Bei dieser Methode können auch Proteine an die Trx-Affinitätschromatographiesäule binden, welche entweder keine eigentlichen Zielenzyme des Trx *in vivo* sind oder cytosolische Proteine, welche keine eigentlichen Zielenzyme vom plastidären TrxF, sondern evtl. von TrxH sind. Daher ist es wichtig, im Einzelfall zu prüfen, ob die Enzyme tatsächlich redox-regulierbar sind.

2. Ergebnisse

2.1 Aufreinigung von Thioredoxin Typ F und Thioredoxin Typ M

Die Gene der TrxF und TrxM aus *P. tricornutum* wurden in verschiedene Überexpressionsvektoren (pET23d(+), pQE30 und pTYB2) ligiert, und in verschiedenen *E. coli* Stämmen (BL21 (DE3), BL21 (DE3) Codonplus, M15[pREp4]) exprimiert. Dabei wurden die Proteine immer als Inclusionbodies in der Zelle abgelagert. Es stellte sich durch bioinformatischen Analysen heraus, daß für manche Nukleotidsequenzen von *P. tricornutum* nicht immer die benötigten tRNAs in der *E. coli* Zelle vorhanden waren (Codon-Usage). Durch fehlende tRNAs für „seltene“ Nukleotidsequenzen kann entweder die Translation abgebrochen werden oder das Protein wird falsch gefaltet, aufgrund falsch eingebauter Aminosäuren. Dies wird damit erklärt, dass der Translationskomplex am Anfang weniger stabil ist und durch selten verwendete Codons (low-usage codons) auseinander dissoziieren kann

(Goldman *et al.* 1995). Wenn nun vor dem zu exprimierenden Protein für *E. coli* Zellen lesbare Nukleotidsequenzen (etwa 60 Nukleotide) N-terminal vorgesetzt werden, bleibt unter anderem der Translationskomplex stabil und das Protein wird in *E. coli* exprimiert (Goldman *et al.* 1995, Kleber-Janke und Becker 2000). Bei dem Vektor pET28a(+) kann N- und C-terminal dem Protein ein HIS-Tag angehängt werden. Die beiden Thioredoxine Typ F (Wildtyp und Mutante) und Typ M (Wildtyp) wurden N- und C-terminal mit einem HIS-Tag versehen (siehe Abbildung 2). Durch die Multiple Cloning Side wurden dem Protein bewusst zusätzliche Nukleotide/Aminosäuren angefügt, welche aber keine Codon-Usage Probleme in *E. coli* Stämmen verursachen.

```

1         10         20         30         40         50         60         70
TrxF_CS_  MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMPPLTL SAVVDIGSES AFDQTIASAGG-SLVVVDYSTTWCGPSKVIAPKFEE
TrxF      MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMPPLTL SAVVDIGSES AFDQTIASAGG-SLVVVDYSTTWCGPSKVIAPKFEE
TrxM      MGSSHHHHHHSSGLVPRGSHMAV GKTGGKLIETV E EYTSIVLEMESQKPV M V F TAPWC GPCRLSIPVVKD

80        90        100       110       120       130       140
TrxF_CS_  LSEKYGDAVFLKVI GDASPDASKLMKREGVRSVPSFHYFKNGEKVDV VNGANAEAEIAA-----IAKH
TrxF      LSEKYGDAVFLKVI GDASPDASKLMKREGVRSVPSFHYFKNGEKVDV VNGANAEAEIAA-----IAKH
TrxM      VMKQF--AGQIEVVEVCTDDLPEVASDAGVVS IPTIQMYAKDEL LDTIVGCVAKSVLAASVEK VLEETLSRH

150
TrxF_CS_  GALBHHHHHH
TrxF      GALBHHHHHH
TrxM      GALBHHHHHH

```

Abb. 2: Sequenzen von Vektorkonstrukten mit pET28d(+) und Thioredoxin Typ F (CS: Mutante), Wildtyp und Thioredoxin Typ M aus *P. tricornutum*. Kursiv: Multiple Cloning Site, Schwarz: HIS-Tag, Grau: konserviertes aktives Zentrum, C: Cystein, s: Serin.

Die Expression dieser veränderten Konstrukte ergaben im *E. coli* Stamm Rosetta (DE3) lösliche Proteine. Die Thioredoxine konnten anschließend mit Hilfe des HIS-Tags über eine Ni-NTA Säule aufgereinigt werden (siehe Abbildung 3). Danach wurden durch Zugabe von Ammoniumsulfat (0,5 M) so viele Proteine ausgefällt, bis auch das Thioredoxin ausfiel. Um das Thioredoxin von *E. coli* stammenden Proteinen zu reinigen, wurden sie über eine zweite Säule (hydrophobische Interaktionschromatographie, HIC) aufgereinigt. Bei der HIC können die hydrophoben Aminosäuren (Alanin, Glycin, Isoleucin, Leucin, Methionin, Phenylalanin und Prolin) der Proteine an die Säulenmatrix binden. Bei der Aufreinigung der Thioredoxine über die HIC wurde das Protokoll von Hisabori *et al.* (2005) dahingehend verändert, daß die Proteine mit 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ vorher gefällt

wurden. Dadurch konnte die Proteinmenge von Trx wesentlich erhöht werden, da sie bei einer Konzentration von 1,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ auch ausfielen.

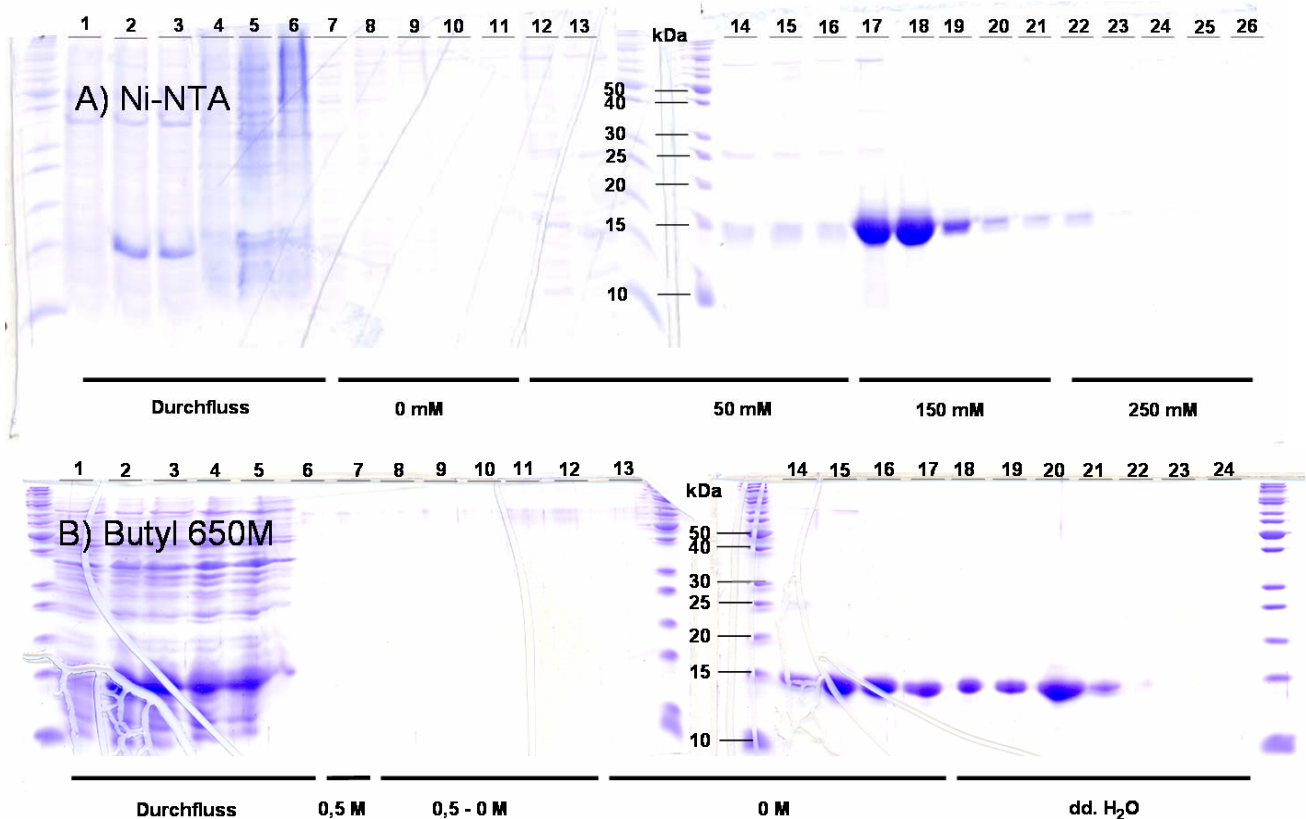


Abb. 3: SDS-Gele der Aufreinigung des TrxF (Mutante). Die erste Aufreinigung der verschiedenen Trx Typen (F Wildform, F Mutante, M Wildform) erfolgte über eine Ni-NTA Agarose (QIAGEN) (A), von Slot 1 bis 6 wurde der Durchfluss aufgetragen. Von Slot 7 bis 11 wurden Proteinfractionen aufgetragen, die mit Waschpuffer gelöst wurden. Von Slot 12 bis 16 wurden Proteinfractionen aufgetragen, die mit Elutionspuffer und 50 mM Imidazol gelöst wurden. Von Slot 17 bis 21 wurden Proteinfractionen aufgetragen, die mit Elutionspuffer und 150 mM Imidazol gelöst wurden. Von Slot 22 bis 26 wurden Proteinfractionen aufgetragen, die mit Elutionspuffer und 250 mM Imidazol gelöst wurden. Die zweite Aufreinigung der Thioredoxine erfolgte nach Motohashi *et al.* (2001) über eine Butyl 650M Säule (B), wobei leichte Modifikationsänderungen vorgenommen wurden (siehe Text). Von Slot 1 bis 6 wurde der Durchfluss aufgetragen. In Slot 7 wurde die Proteinfraction aufgetragen, die mit Tris-Puffer mit 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gelöst wurden. Von Slot 8 bis 12 wurden Proteinfractionen aufgetragen, die mit einem linearen Tris-Puffer Gradienten von 0,5 M bis 0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gelöst wurden. Von Slot 13 bis 17 wurden Proteinfractionen aufgetragen, die mit Tris-Puffer ohne Ammoniumsulfat gelöst wurden. Von Slot 18 bis 24 wurden Proteinfractionen aufgetragen, die mit dd. H_2O gelöst wurden. In der Mitte der SDS-Gele ist die Proteingröße (kDa) angegeben.

2.2 *In vitro* Reduktionstest

Thioredoxine werden *in vivo* durch die jeweilige Reduktase reduziert. *In vitro* können die Thioredoxine durch Reduktionsmittel, etwa durch DTT, reduziert werden. AMS (4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid) kann an die Sulfhydrylgruppen reduzierter Cysteine von Proteinen binden (Kobayashi *et al.* 1997, Motohashi *et al.* 2001, Vestweber und Schatz 1988). Durch die Bindung des AMS an

die Cysteine des reduzierten Thioredoxin wird die Masse des Proteins erhöht, so dass es auf einem SDS-Gel von nicht reduzierten Thioredoxine unterschieden wird. Nur Cysteine, die einen Abstand in der Tertiärstruktur unter etwa 10 Å haben, können miteinander intramolekulare Disulfidbrücken bilden.

Die Reduktionsteste von TrxF (Wildtyp) und TrxM mit AMS zeigen, daß die beiden Trxs in *E. coli* richtig gefaltet wurden, da die Cysteine untereinander Disulfidbrücken bilden können. Des Weiteren benötigen TrxF und TrxM unterschiedliche Konzentrationen von DTT für eine vollständige Reduktion. TrxF kann mit 100 µM DTT vollständig reduziert werden, TrxM benötigt mindestens 500 µM DTT, um vollständig reduziert zu werden (siehe Abbildung 4). Bei der Abbildung 4A sind zwei Doppelbanden des TrxM bei 0 µM DTT zu sehen. Die obere Bande kann nicht erklärt werden, es sollte nur eine Bande des oxidierten TrxM zu sehen sein. Bei der DTT Konzentration von 500 µM sind zwei Banden zu sehen: die untere der beiden Banden ist das reduzierte TrxM (etwa 17 kDa), die obere Bande (etwa 20 kDa) kann nicht erklärt werden. Die Bande des reduzierten TrxM ist schon bei der DTT Konzentration von 100 µM zu erkennen. Es lässt sich daraus vermuten, dass TrxF ein wesentlich niedrigeres Redoxpotential haben muß und wesentlich schneller reduziert wird als TrxM.

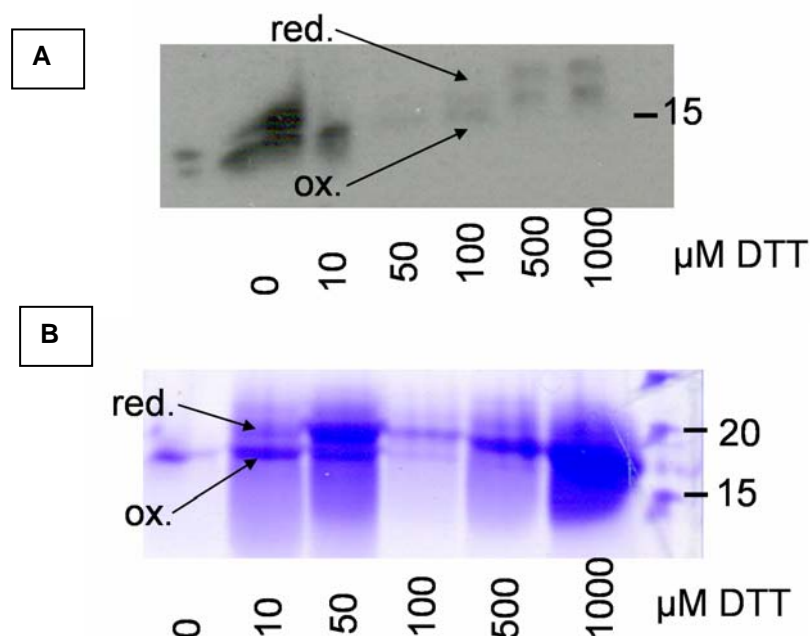


Abb. 4: *In vitro* Reduktion von TrxM (A) und TrxF (B). Reduktionslevel von TrxM (A) erkennbar auf Western-Blot gegen HIS-Tag und TrxF (B) auf SDS-Gel erkennbar. Beim Western-Blot (A) sind die beiden dickeren Banden bei 0 µM DTT leicht verschoben, weil beim Blotten das SDS-Gel ein wenig verrutschte. Das TrxF ist bei 100 µM DTT und TrxM erst bei 500 µM DTT vollständig reduziert. Der Reduktionsgrad der Thioredoxine wird mit Hilfe von AMS und der Änderung der Mobilität im SDS-Gel durchgeführt.

2.3 Affinitätschromatographie

Um mögliche Zielproteine des Thioredoxin zu identifizieren, wurden die Thioredoxine modifiziert. Im aktiven Zentrum (WCGPCK) wurde das zweite Cystein (C2) durch eine Mutagenese-PCR (einfache Punktmutation in der Nukleotidsequenz) in Serin umgewandelt, da die Zielproteine über das erste Cystein an das Thioredoxin binden und durch das zweite Cystein gelöst werden. Durch die Mutation können Proteine nach der Binding an Thioredoxin nicht mehr lösen. Für die Affinitätschromatographie wird zuerst das mutierte Trx über die NH-Gruppen der Aminosäuren unspezifisch an die Säule gebunden, dabei bleiben an der Matrix allerdings noch viele chemische Bindestellen frei, die mit Glycin deaktiviert werden müssen. Diese Deaktivierung durch Glycin ist im Protokoll von Hisabori *et al.* (2005) nicht enthalten. Es können somit nur noch Proteine an das mutierte Thioredoxin über das erste Cystein binden und nicht noch an die Säulenmatrix. Die gebundenen Proteine werden auf der Säule gewaschen und von nicht gebundenen, unspezifischen Proteinen gereinigt. Anschließend werden die gebundenen Proteine durch Reduktionsmittel gelöst und fraktioniert.

Die eluierten Proteine wurden zur Identifizierung über ein 2D-SDS-Gel zuerst durch isoelektrische Fokussierung und dann im SDS-Gel aufgetrennt (siehe Abbildung 5). Anschließend wurden die einzelnen Proteine isoliert und mit Trypsin im Gel verdaut. Trypsin schneidet Proteine nur an bestimmten Aminosäuresequenzen. Die Peptidfragmente wurden mit Carbamidomethyl stabilisiert. Die Größe der einzelnen individuellen Proteinfragmente wurde mittels Massen-Spektrographie (Mass Spec) im MALDI-TOF TOF bestimmt (durch Dr. Toru Hisabori (Tokyo Institute of Technology, Japan) und Dr. Naomi Hosoya-Matsuda (Kanagawa University Hiratsuka, Japan)). Jedes Protein hat nach der katalytischen Spaltung durch Trypsin ganz individuelle Mass Spec Größen. Identische Aminosäuresequenzen in verschiedenen Proteinfragmenten ergeben die gleiche Mass Spec Größen. Hier unterscheiden sich verschiedene Proteine mit gleichen oder ähnlichen Sequenzbereiche in der Gesamtzahl aller Proteinfragmente. Je mehr Proteinfragmente eines Proteins in ihren Größen bestimmt wurden, umso detaillierter lassen sich durch Berechnungsprogramme die gesammelten Proteine identifizieren.

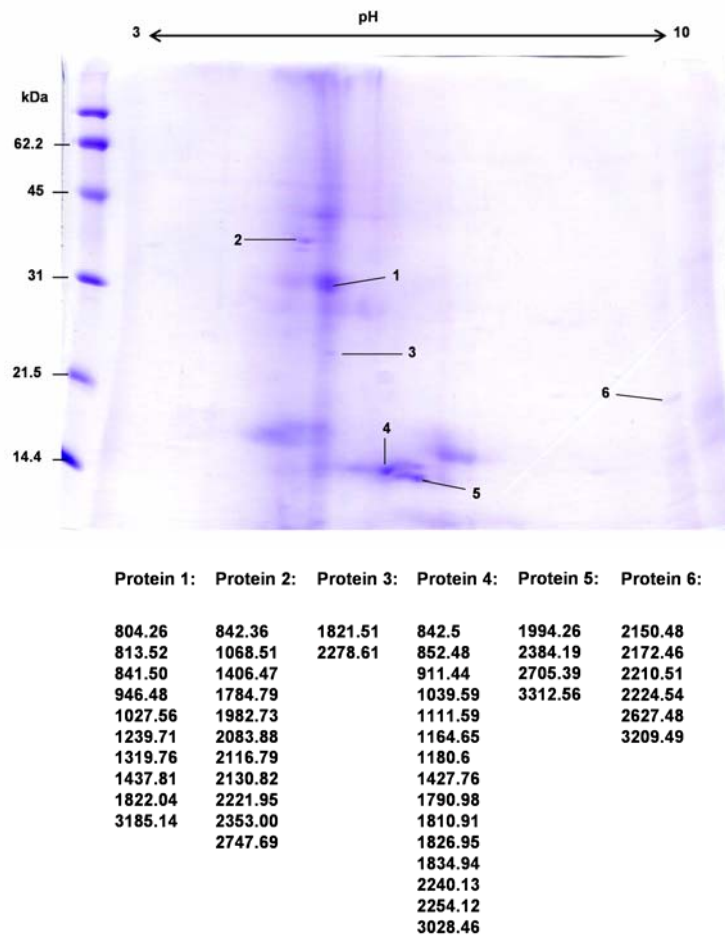


Abb. 5: 2D-SDS-Gel eluierter Proteine. Die Zielproteine wurden nach der Trx-Affinitätschromatographie auf ein 15% 2D-SDS-Gel aufgetragen. Die möglichen Zielenzyme sind durchnummeriert. Die mit Massenspektrographie bestimmten Größen der einzelnen Proteinfragmente sind unterhalb des Bildes aufgeführt.

2.4 Identifizierung der eluierten Proteine

Es wurde die Software PeptideSearch (EMBL, Heidelberg, Deutschland) verwendet, um aus den massenspektrographisch ermittelten Größen der Peptidfragmente die wahrscheinlichsten Proteine aus *P. tricornutum* zu berechnen. Diese Software erlaubt die Integration der Proteinsequenzen von *P. tricornutum* in dem alle möglichen Fragmente anhand ihrer molekularen Masse identifiziert werden, die nach Verdau mit Trypsin entstehen könnten. Die Software berechnet die fraglichen Proteine zudem nach der im 2D Gel erkennbaren Größe. Die jeweilige Peptidgröße wurde in dem Berechnungsprogramm um etwa 5-10 kDa größer angegeben, um evtl. Degradationen der Proteine auf dem 2D-SDS Gel zu berücksichtigen. Es wurden sämtliche automatisch annotierten Leserahmen der JGI-Gendatenbank, sowie der „BottomDrawer“ verwendet. Dieser „BottomDrawer“ enthält all die Nukleotidsequenzen, die bei der Genomsequenzierung vorerst keinem

Chromosom zuzuordnen waren. Die wahrscheinlichen Proteine wurden noch einmal gegengeprüft, indem das mögliche Protein mit dem Programm ProSpector MS-Digest (<http://prospector.ucsf.edu/>) theoretisch mit Trypsin verdaut und mit Carbamidomethyl stabilisiert wird, anschließend wurden die Massen der Proteinfragmente mit dem MALDI-TOF TOF (MALDI: Matrix-assisted laser desorption/ionization, TOF: Time of flight) ermittelt. Nur wenn die bei ProSpector berechneten Mass Spec Werte mit den Werten unter Abbildung 4 übereinstimmten, kann es in der Genomdatenbank identifiziert werden. Die so identifizierten Proteine wurden in Tabelle 4 aufgelistet.

Tab. 1: Mögliche Zielproteine von TrxF ermittelt über die Peptidmasse nach Trypsin-Verdau. Es wurden die möglichen Zielproteine aus der Peptidmasse der jeweiligen Proteinfragmente berechnet. Alle aufgelisteten Proteine weisen Cysteine auf. Die Proteingröße stimmt nicht immer überein mit der Größe auf dem 2D-SDS Gel überein. Die Protein ID ist von JGI vorgegeben, bei mehreren Transkriptionsmöglichkeiten eines Gens, wird für jedes Protein eine Prot ID vergeben. *) Dieses hypothetische Protein ist nicht eindeutig zuzuordnen, die Scores bei NCBI GenDatenbank sind zu unsicher.

Spot	Protein	Hits of Mass Spec Data	Prot ID	Name	kDa (mature protein)	predicted Location
1	1	813.52 841.50 946.48 1027.56 1239.71 1319.76 1437.81 3185.14	56583	Hypothetical protein*	28,44	plastidic
1	2	1027.56/1027.56 1437.81/1437.81	1681/1880	NAD-dependent glycerol-3-phosphate DH (EC 1.1.1.8)	46,33 / 35,83	cytosolic
2	1	1068.51 2221.95	45368	Tyrosyl-tRNA Synthetase (EC 6.1.1.1)	86,54	cytosolic
2	2	1784.79	48155	Methyltransferase	42,58	cytosolic
4	1	1427.76 1810.91 1826.95 2254.12	1883	gag-pol Polyproteine	219,22	cytosol
4	2	852.48 911.44 2240.13 2254.12	AAF07201	RUBISCO small Subunit	15,97	plastidic
5	1	2705.39	36403	Myosin-like (class II, heavy chain)	14,85	plastidic
6	1	2150.48/ /2172.46 /3209.49	56585/56587	Thiopurine S-Methyltransferase (EC 2.1.1.67)	15,52 / 24,71	cytosol

Dazu werden auch die Werte angegeben, welche vom Protein bei ProSpector mindestens einen bis mehrere Hits ergaben. Alle Proteine weisen in ihrer Aminosäuresequenz Cysteine auf. Allerdings weist nur die NAD-abhängige Glycerol-

3-Phosphat Cysteine mit einem Aminosäureabstand von 22 (Position 152 und 174) bis 23 (Position 320 und 344) Aminosäuren auf.

Bei den anschließenden Abbildungen werden die Sequenzen der Proteine aus *P. tricornutum* mit den ähnlichsten Proteinsequenzen verglichen, die beim Vergleich mit der NCBI Gendatenbank die größte Sequenzhomologie aufwiesen. Die prozentuale Identität mit anderen Proteinen ist einmal im Anhang (Tabelle 1) angegeben oder in den folgenden Bilduntertiteln. Die Cysteine sind gelb unterlegt.

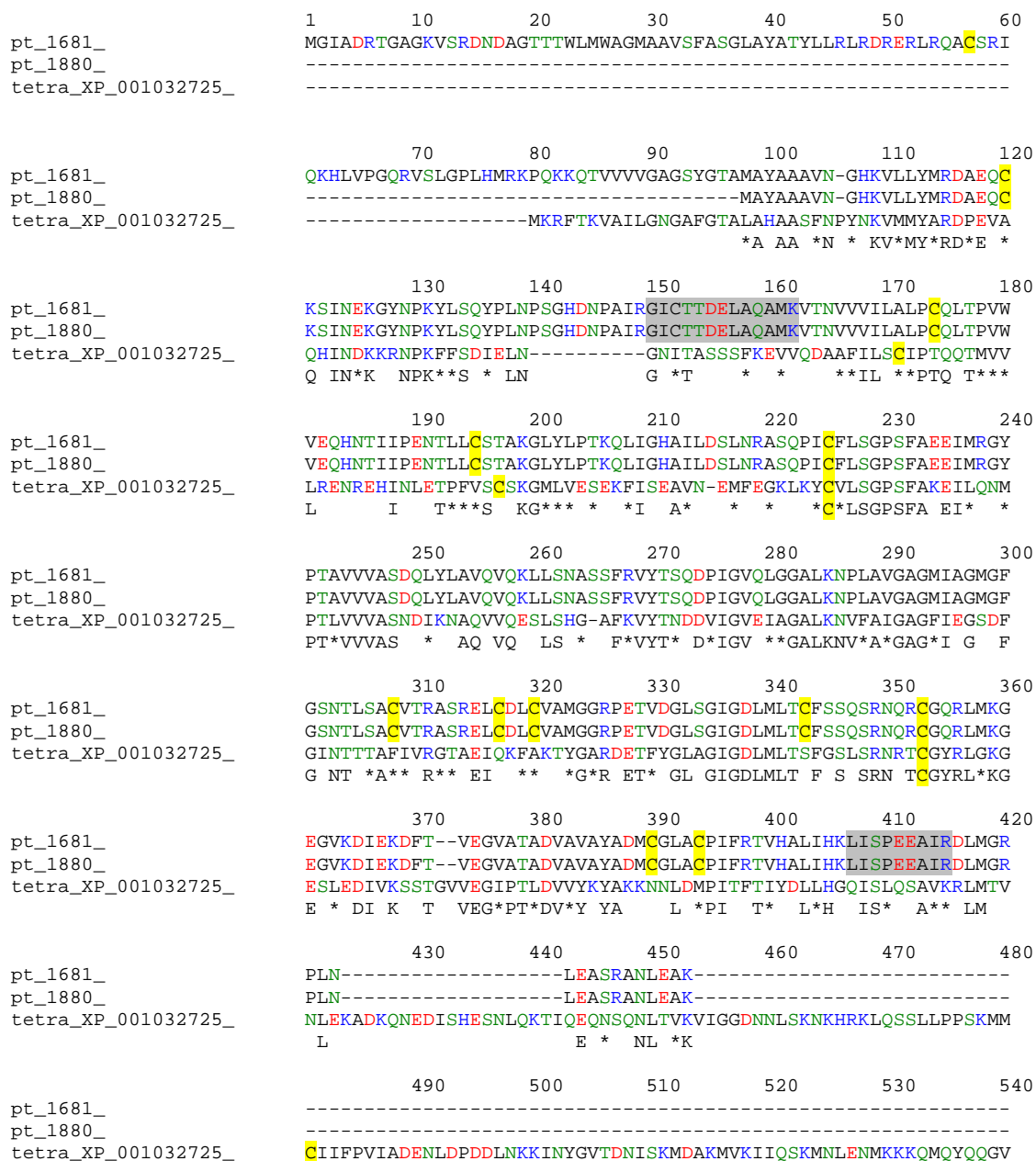


Abb. 6: Vergleich der Aminosäuresequenz der NAD-abhängige Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase von *Phaeodactylum tricornutum* (pt) und *Tetrahymena thermophila* (tetra). Schwarz: hydrophobisch (ACFGILMPVWY), Grün: hydrophil (NQST), Blau: basisch (HKR), Rot: sauer

(DE), Cystein: **C**. *: Aminosäure der gleichen Gruppe. **Grau**: Aminosäuresequenz, die den Werten der Mass Spec Analyse entsprechen. Die Prot IDs sind hinter den Proteinen angegeben. Bei pt sind zwei Prot IDs angegeben, weil das Gen für die NAD-abhängige Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenase zwei verschiedene Transkriptionsmöglichkeiten hat. Das Protein (1681) hat keine Präsequenz. Beide NAD-abhängige Glycerol-3-Phosphat Dehydrogenasen haben eine Proteinidentität von 41% zum Vergleichsprotein.

```

1         10        20        30        40        50        60
pt_45368_  MSSGLKRVKTRARFVSVWEVAEGAKLASATFPSTMTATEAKKVDPPVKVDPPAGAVAKKGSS
trypa_XP_817411_  -----

70        80        90        100       110       120
pt_45368_  VKKPEPKPTRPWTEPLQQDFDRIFSVGEECISGPELQTLTAKGRGSESTGFNLYDGFEP
trypa_XP_817411_  -----MTAQKPTFEMTTEERYALVRSVGEECIQEELLNLTIKK-----PNIRCYDGFEP
          * ***P          * * SVGEECI* EL L*T K          * *YDGFEP

130       140       150       160       170       180
pt_45368_  SGRMHIAQGVFKAMNVNKCCTYEGTNATFVFWVADWDFALMNDKMGGLLEKIRTVGHYLIIEV
trypa_XP_817411_  SGRMHIAQGVFKAMNVNKCCTQSG--CFVFWVADWDFALMNDKMGGELEKIRIVGQYLIIEV
          SGRMHIAQGVFKAMNVNKCCT G * FVFWVADWDFALMNDKM*G*LEKIR VG YLIEV

190       200       210       220       230       240
pt_45368_  WKAAGMDLSNVVFKWASEEITTHADKYWPTMLDVARRFNVTRIKKCCQIMGRLEGLTAA
trypa_XP_817411_  WKAAGMNEKVIFLWSSEITRNANSYWKTVLDIGRRNTIARIKKCCQIMGKQEGTLTAA
          WKAAGM * V*F W SEEIT A YW T*LD**RR ** RIKKCC*IMGR EG*LTAA

250       260       270       280       290       300
pt_45368_  QILYPLMQCTDVFFLKADICQLGVDQRKVNMLAREYCDAAAGIKHKPIILSHHMLYGLKAG
trypa_XP_817411_  QILYPLMQCADIFFLKADICQLGLDQRKVNMLAREYCDLIGRKLKPVILSHHMLSGLKEG
          QILYPLMQC D*FFLKADICQLG*DQRKVNMLAREYCD**G K KP*ILSHHML GLK G

310       320       330       340       350       360
pt_45368_  QEKMSKSDPDSAVFMEDSAADVERKIMNAYCPIVA EVAAGATDGEPLDAGKESMHLKGDG
trypa_XP_817411_  QPKMSKSDPDSAI FMEDTREDVERKIRHAYCPRLRQKKA E V P D G A V S S E E -----
          Q KMSKSDPDSA*FMED* DVERKI AYCP * A * * * * *

370       380       390       400       410       420
pt_45368_  LKNPCLDYIENIIFSPPGATFSAGSTTFQDYGAVRDAFLSKQISEDELKRLGLIIELNRL
trypa_XP_817411_  -KNPVLDFYQHVIYSRPAASTTINGTLYKTYEEL E E A F V D G T I T E E L L K D A L A E L N L L
          KNP*LDY* *I*S P*A* ** T * Y * *AF* *ISE* LK *L*IELN LL

430       440       450       460       470       480
pt_45368_  EPVRSHFDTNENAKNLLSLVQYKKE SASSITEKVVRRNLNLVELKKVPAGAHLVFAPLPS
trypa_XP_817411_  EPVRHHFACDPHAAGLLEKVKSF R K G G Q T P P L T D I G --- P F E Q S E T P L A V V L P T V I K L S
          EPVR HF A LL V ***K * * * * * **A** L* ** *S

490       500       510       520       530       540
pt_45368_  GSPTLQSAMDVFTLLQAAEDRCPVLLLSDWTA R V C N S C D A D L K V I A A Y H S V F V A S L K A L K
trypa_XP_817411_  VNVAVAISDAVKAFLEQHS D G E V V L L L P E W T A F S C G E V T G E E K N I S A A L E L N L A L L Q A T Y
          *** * V *L D *VLLL *WTA C * ** K I A* * *A L A

550       560       570       580       590       600
pt_45368_  PRLMENVQVLLQSDAILADPSNYWISVINVGRHFMLDDIMG P S M K D S E G V G R V I G R L M Q V
trypa_XP_817411_  LR-KEWVRVVRQS Q L I L D N P N D Y W V A A I N A G R R N M L Q Y L G - D V C G E F K A A G D L V A A L M Y V
          *R E V V* QS *IL P* YW* *IN*GR* ML ** * * **G *** LM*V

610       620       630       640       650       660
pt_45368_  ADAAGVEPASIAMADSEDTKIEGNLVTEFFGKKLP S L S A P S V S F R T L P S L R L Q P E R E S D A
trypa_XP_817411_  ADVAMLKATHIISAPHERG--YHEVVKKFFDGRVTAIPAREG-----TVPPLHRPEA
          ADAA** * I* A E *V FF ** * A * * * P * *A

670       680       690       700       710       720
pt_45368_  L R N E N D E Y F L L D D P K I S G K S K L K K A F C E P G N V T F C P P I A L A D M F A L K G A K G V L E I H R S P E
trypa_XP_817411_  LVAGADDVFLDDTDMDTRRKIKKAYCAPN---EAANPVLSIAAWLLRERGLTVERAAE
          L D***LDD * * K*KKA*C P ** **L ***L *G L * R *E

730       740       750       760       770       780
pt_45368_  N G G D H I Y E S V T E L E K D F A D G S L H P S D L K T A A I A V M G T V M E E L A A G L K A D G D A I K A G K T L K
trypa_XP_817411_  N G G N V A Y T S E A R L R D D A Q S G T L H P A D L K A A V T K P L L E V C A V S K A V L S S - A E G K K L S Q T L R
          N G G *Y S L D* G*LHP DLK A* *** V* A*L *** K* TL*

```

```

                                790
pt_45368_      AFQKKAQKQK
trypa_XP_817411_ QAETLSKRSK
                * K * K K
    
```

Abb. 7: Vergleich der Aminosäuresequenz der Tyrosyl-tRNA Synthetase von *Phaeodactylum tricornutum* und *Trypanosoma cruzi* (trypa). Schwarz: hydrophobisch (ACFGILMPVWY), Grün: hydrophil (NQST), Blau: basisch (HKR), Rot: sauer (DE), Cystein: C. *: Aminosäure der gleichen Gruppe, Grau: Aminosäuresequenz, die die den Werten der Mass Spec Analyse entsprechen. Die Prot IDs sind hinter den Proteinen angegeben. Die Tyrosyl-tRNA Synthetase von *P. tricornutum* hat eine Proteinidentität von 33% zum Protein von *T. cruzi*.

```

                                1      10      20      30      40      50      60
pt_48155_      MQDLLEEAEGTFATESTVKELRCPFVLELWDEARAVRWDYADGERVYYRPKQRSGVVRKR
frankia_YP_480878_ -----MKINRRELLGREGTIDR
                                **      R G * R

                                70      80      90      100     110     120
pt_48155_      RRPVEDFNVDHSLYKPDSWSILVDGRVKPKSLTDCSKLLPLTASFGSLLVRVPDTASFR
frankia_YP_480878_ ENNVGHFSARARTY-----DMSSSWCTDDELGAVIVRVAN-----
                *V F** Y                D*S ** *G *IVRVA

                                130     140     150     160     170     180
pt_48155_      HWAVAWSGPTDRVLEIGCSTGQTSRAFWKARVSSWGMDTSSDMVQRTRIALQQQDTATG
frankia_YP_480878_ -----AGPTDRVLDVACGTGLVSRLFHG-RVGAVIGVDITEDMAAQARPHLDELVISPA
                GPTDRVL***C TG SR*F RV **G*D DM* R* L

                                190     200     210     220     230     240
pt_48155_      SARANYRVCHDALLHPNQAELEARQFGPPTLVFVDIGGNRNLSGVVLMLDWVLTRSVGV
frankia_YP_480878_ EELP-WPNASFDVVVCRQGVQFMRLPDAVREMOVVLRPGGRLILINLCAYGPDDRDEYFE
                * * * *D*** * * * ** *V V *G R * * * * * *

                                250     260     270     280     290     300
pt_48155_      EKRSSGERQPTRLVLKSQALARALSLFHTDNNRTLPESPENLASQEFCRRFWEDQLRQ
frankia_YP_480878_ VLR---LRNPVRRHFFLPEDMAKLVASSGCTDLRTER-----YVSIEDVVWSDNGAID
                R*P R ** *A ** RT **S E * W * *

                                310     320     330     340     350     360
pt_48155_      AQTATLPRHPLQASLVYSPISATQPICRYHNYSTCQKVETCPLDHRHCHLCQRPGHIALR
frankia_YP_480878_ ESAREAIREVYRS-----ASPEFSRLHSVHQRNGLFVDHMLFVIASGCKPGGDVA--
                * **R ** A* * R*H** * * * * * *C *G *A

                                370
pt_48155_      CPVLRADIVKPFLQK
frankia_YP_480878_ -----
    
```

Abb. 8: Vergleich der Aminosäuresequenz der Methyltransferase aus *Phaeodactylum tricornutum* (pt) und *Frankia* sp. (frankia). Schwarz: hydrophobisch (ACFGILMPVWY), Grün: hydrophil (NQST), Blau: basisch (HKR), Rot: sauer (DE), Cystein: C. *: Aminosäure der gleichen Gruppe, Grau: Aminosäuresequenz, die die den Werten der Mass Spec Analyse entsprechen. Die Prot IDs sind hinter den Proteinen angegeben. Die Methyltransferase von *P. tricornutum* hat eine Proteinidentität von 43% zum Protein von *Frankia* sp.

```

1          10          20          30          40          50          60
pt_1883_  -----MARVVKATGPTTRKGATETVPEERVEEETPFEAVESPSKDSNETQPSSMGDDN
pt_ACA60881_ MRRPRKVTPAVPAPAAATDSPAASASKEDEEFGGFSSDGEEPSGTAPPSPASSDDEG
          * V * **T ** * EE ** * * * D *

          70          80          90          100         110         120
pt_1883_  DSQ-----SEIESYKIDTDIDFKYNPNFFEDKKALESVLRN
pt_ACA60881_ DGKKTAKPLARSKNTSDEVSVIEKSVIDAEPHLSKSDGLDSVPRQDRVERKALMVVLRD
          D * D*D* * *KKAL**VLR

          130         140         150         160         170         180
pt_1883_  TMGFGDIVHKSQNEGLKTANDFLLISMSDINDLCKLLFATVYRARLRAFATWLRSQPD
pt_ACA60881_ VICVPLSVAAMLNNGIKSSDDFRLLTKEINDLCLRKMGSMHTKRILVFAKWMMHAPN
          **** * * N G*K* DF+L** DINDLC *L **** R* *FA W** P

          190         200         210         220         230         240
pt_1883_  NINITQEWITPVMQLEMQMKAQASPFGTSETN-KTDKSVSSLVDPDFDGTQKKWLAFRYS
pt_ACA60881_ SVDVAKLEFTASVLRFEEMTRAAASYDNVTTAAKAEKSATSLLEPFDDGSQKKWLTFRYG
          ** * E*T* V* *EM *A AS* * T K *KS**SL*P*PFDG*QKKWL*FRY

          250         260         270         280         290         300
pt_1883_  FEAWAGASGQSFDAQISHDSERYSRSEPTATYNDINDEPDSFKYDWNVKSVRNSNIFFML
pt_ACA60881_ FEAWAGASGSTFTACIAHHSDRYSKADPTGPHSTPRDVSDFALSPVNNITRNATIFYTL
          **** * . : * * * . : * * * * . : * * * . : * * * . : * * * . : *

          310         320         330         340         350         360
pt_1883_  KSLTSGGDWGLIEPEYEVSKNGRHWIALCAFYEGASQVGLTTEEARITILTISKYTGQSR
pt_ACA60881_ MSLTSAGDAWGLVEPHEHTKDRSAWISLCAFYEGTSQVGLTTEQARATVME SVYTGLSK
          SLTS*GDWGL*EP E *K GR AWI LCAFYEG SQVGLTTE AR T** S YTG S*

          370         380         390         400         410         420
pt_1883_  NFTFTKYVQKHLTGNNILARNKEAYTDSQKTNFFLRGIVDELMFAKAAAEANLNEWKFE
pt_ACA60881_ QFSFTKYVARHISANNALLRNKEGYSDAQKTNFFLKGITDPALLPYKATAEARLDDWNFN
          *F*FTKYV *H***NN*L*RNKE*Y*D QKTNFFL*GI DP L**KA AEA L *W F

          430         440         450         460         470         480
pt_1883_  RVVVTYMRQTAAKLTSKDGKDSRNIRQATGLSKNRNNKNNRRKRSEYQSQKGNKESGKGN
pt_ACA60881_ RVVNYMRTSATKLSKDRSDSRNVRQTKTTGRATGNQRGNDNKRSGSSNRPSNKGAEKPS
          RVV*YMR*T*A KL*SKD DSRN*RQ * N * **S* NK K**

          490         500         510         520         530         540
pt_1883_  NAPSTQLRKDIWDELSPKIDAIKAKRRASTDPR TAKRAKTSSTDNSNASVESYSPDLR
pt_ACA60881_ RPHKHVLPPELWEALTPAIRE SILSAKRSIAPPGREAKRAKSSD TDNSSSTVESYSQLPS
          * L **W* L*P I** I AKR * *R AKRAK*S TDNS* *VESYS *

          550         560         570         580         590         600
pt_1883_  S---MSTEIFKADDDKDLASGQPEAKDTPHLHLELEDTLKKPTYGAGTLFGRSADRVSNR
pt_ACA60881_ SKKPIRKHTCEDHVQVDSSTPETLLRDAPTDISPHVTTKKVFAGVLFGRYANRVS LNR
          S * * D * **D P * * KK*T*GAG LFGR A RVS*NR

          610         620         630         640         650         660
pt_1883_  MVCSSSEENKVPWRMSELRLADATIRRICKNRTRNPTGRSTWGEAAIDTGADTICIGSGY
pt_ACA60881_ MVRSGSHFDQAPWRKSDFR LNDATLVIRIQNRSRGKTPTNYGEAVIDTGADTVCGAGY
          MV S PWR S**RL DAT* RI NR*R ***GEA*IDTGADT*C*G GY

          670         680         690         700         710         720
pt_1883_  TVLAHTGRYVSLRGFHDGSDTLDRIPVVTAATAYDYDDGTTVILVLFHEALNLGPTQSTSL
pt_ACA60881_ SVLSYTGRSVSLRGFHDGSETFERIPVVTAATAYDYDDGTTVILVLFHEALNLGPTQSTSL
          *VL TGR VSLRGFHD G*T**RIPVVTAATAYDYDDGTTVILVLFHEALNLGPTQ*TSL

          730         740         750         760         770         780
pt_1883_  INLNQIRHAGHQTDIPKFLSQGKSLHGIE TL DGDYIPFELKGRSLLYSRVPTRHELEN
pt_ACA60881_ INLNQIRHAGHQTDIPKFLSQGKSLHGIE TL DGDYIPFELKGRSLLYSRVPTQHELDN
          INLNQIRHAGHQTDIPKFLSQGKSLHGIE T* DGDYIPFELKGR SLLYSRVPT HEL*N

          790         800         810         810         820         830
pt_1883_  CLHIDLTSQDPWDPNSKDWEDNEQRYTRHQRNARYTATDNADEENFYHGYFSLPDSKE
pt_ACA60881_ CQHIDLTCQDPWDPNSKDWEEAKYTRHRSRRACTYDTSVPVDILPDP---PLPVS PG
          C HIDLT DQPWDPNSKDW*NE *YTRHDR*R A YT * *D * LP S

          840         850         860         870         880         890
pt_1883_  FPVLPANNVMNPHDVVREIKYATARVSKSSPRDLVDVDRDKLRRILGHVPMEEVVDRTLEA
pt_ACA60881_ SVVPDFHNRVMNPRDIVREIKYATIGASISSPRVLDVDRDKLRRILGHVPMEEVVERTLTA
          *V* * N VMNP*D*VREIKYAT* *S SSPR LDVDRDKLRRILGHVPMEEVV*RTL A

```

```

          900      910      920      930      940      950
pt_1883_      TTQLAERSRGKMP LHRRFKTKFEQLRYRRLKCTLYSDTFKSTVKSSRGHTHTQGFVCGDSY
pt_ACA60881_ TTQLAERTGEMPLHRRYKTKFEQLRYRRLKCTLYSDTFKSSIKSSRGHTHTQGFVCGDSY
TTQLAER*G MPLHRR*KTKFEQLRYRRLKCTLYSDTFKS**KSSRGHTHTQGFVCGDSY

          960      970      980      990      1000     1010
pt_1883_      FVYHFLMKAESAADQGLASIQDIGIPAQLHTDNAKVELTSKWKKITSGHWIKVTVTEPY
pt_ACA60881_ FIYHYLMKAESAADQGLAEFIHNIGIPAQLHTDNAKVELTSKWKKITSSHWIKVTVTEPY
F*YH*LMKAES ADQGLA *I IGIPAQ*HTDNAKVELTSKWKKITSGHWIK VTVTEPY

          1020     1030     1040     1050     1060     1070
pt_1883_      SPWQNRCEHEFGAVRIQTRLVMEETTQCPEQLWDYAITVYVIVRNNTARKALNWTPLTVM
pt_ACA60881_ SPWQNRCEHEFGAARLHTRLVLETTQCPEQLWDYALAYVIVRNHTARKALAWITPLITAM
SPWQNRCEHEFGA*RI TRLV*ETT CPEQLWDYA* YV**VRN TARKAL W TP*T*TM

          1080     1090     1100     1110     1120     1130
pt_1883_      TGDTSDISELLDFEFYEPVQYFDNPEIKFPQAKAKVGRWLG IATNVGQAMCYVVLTDKGT
pt_ACA60881_ TGDTHDISEILVFEFFEPVQYFDNPDVKFPQNKAKVGRWLG IATNVGQALCYHILTDKGT
TGDT DISE*L FEF*EPVQYFDNP**KFPQ KAKVGRWLG IATNVGQA*CY *LTDKGT

          1140     1150     1160     1170     1180     1190
pt_1883_      VIARSTVTP LHKVDSTALQTS LTAFDAMIRDIYQPTDFAHSTKKQAASLR RDEAMKVARK
pt_ACA60881_ VITRSTVTP LQNLDSSALQALATFDATIR ELYQPSDFALGNKIKAPAFRR RDEAMKVARR
VI RSTVTP L *DS*ALQT L FDA IR* IYQP*DFA *K A* *RRDEAMKVAR*

          1200     1210     1220     1230     1240     1250
pt_1883_      TGEPEDPGV RNRHVLYDLNEGADHDQVEPGLSVDDY YGNDDKEKESGSSDLLV GSEVLLTK
pt_ACA60881_ SDDPDGDNTRNRHVLYDLNEGDDHIQLDPGLTVDDFF ENDS PDQDPTS-LIIGTDVLLTS
* *P D* RNRHVLYDLNEG DH QL*PGL*VDD** ND * S L**G**VLL*

          1260     1270     1280     1290     1300     1310
pt_1883_      GGIQHLGKVT KRDKNGQPKGSNETTNYVVEFNDGT EEEIHGYNALLDAVYKQVDDDGNEWY
pt_ACA60881_ GAVQRQGRVTKRDRDGT PVPND DDPGNFVVEFDDGT EEVHGYQALLDAVYKQVDDDGNEWY
G**Q G*VTK*D* G*P ** N*VVEF DGTEE*HGY*ALLDAVYKQVDDDGNEWY

          1320     1330     1340     1350     1360     1370
pt_1883_      TFEIDVDHQRRPRGGGRRTKGWFLRVK WANG EYTW EPLTSLKESNPYPVAKYAADNELMS
pt_ACA60881_ TFDIDVDHQKRPRGGGRRTKGWFLRVK WANG EFTW EPLTSLKESNPYPVAKYAADHLLS
TFDDIVD HQKRPRGGGRRT*GWFLRVK WANG E*TW EPLTSLKESNPYPVAKYAAD *LLS

          1380     1390     1400     1410     1420     1430
pt_1883_      EKAFSYWAPSVLTKADRWRIRAAKTRKKKNRYKYGIEVPRNV AHAYELDKQNGNHLWAEAI
pt_ACA60881_ EHAFSYWAPTVLKKADRWRIRAAKTRKKKNRYKYGIEVPRNV AHAYELDKQNGNHLWRDAI
EHAFSYWAP*VL KADRWRIRAAKTRKKKNRYKYGIEVPRNV*AHAYELDKQNGNHLW *AI

          1440     1450     1460     1470     1480     1490
pt_1883_      QKEMGT LQKMEFTTILSKGERAPDKYKRIPMWIIFDVKMDFRRKARLVAGGHVTD PPTDD
pt_ACA60881_ RKEMDTLESMTFTTIKDKGERAPSDYKRIPMWIIFDVKMDFRRKARLVAGGHVTD PDED
KEMDTL M TFTI KGERAP DYKRIPMWIIFDVKMDFRRKARLVAGGHVTD P ED

          1500     1510     1520     1530     1540     1550
pt_1883_      TYSSVASRESVRLGFLLASLNNLDLVSVDIGNAYVNADCREK VYAIAGPEFEFEFEGRTVI
pt_ACA60881_ TYSSVASRESVRLGFLLASLNNLDLVSVDIGNAYVNADCREK VFSIAGPEFGEHEGKVVL
TYSSVASRESVRLGFLLASLNNLDLVSVDIGNAYVNADCREKVF IAGPEF E EG*VVL

          1560     1570     1580     1590     1600     1610
pt_1883_      IAKALYGLKSSGAAWHSHLAQSLRTMGFVSSKADPDMWYRAAKRKDESEY YEYIISVDD
pt_ACA60881_ IAKALYGLKSSGAAWHSHLAQNLRFLGFVSSKADPDMWFRQAQLDKTEY YEYIISVDD
IAKALYGLKSSGAAWHSHLAQNLR *GFVSSKADPDMW*R A R D *EY YEYIISVDD

          1620     1630     1640     1650     1660     1670
pt_1883_      LTVVSENTRAIL EMLKNIPYTLKGG SAPETFLGATIGTYTFKDGTS AWYMSAQQYL TNAI
pt_ACA60881_ LTIVSADTKAILKALENIPYTLKGG SAPRTFLGATIGVHTFNDGTKAWYMSAKQYL TNAI
LT*VS TKAIL *L NIPYTLKGG SAP TFLGAT G TF DGT AWYMSA QYL TNAI

          1680     1690     1700     1710     1720     1730
pt_1883_      KNIEETLGLK LSTSNRIVTPLIPGYHPEVDTSAFLDDDRANFYMSLIGILLW TSELGRID
pt_ACA60881_ LNIEQTLG EKLPSSSRIVTPLPHGYHPELDTSGYLTDDR TNFYMSLIGILLW TSELGRID
NIE TLG KL *S*RIVTPLP GYHPE*DTS**L DDR N*YMSLIGILLW TSELGRID

          1740     1750     1760     1770     1780     1790
pt_1883_      ITQEVGLMSRFNAKPREGHYNAVLRMFSY LKRHLNSKLVCDPKMREFSQV KFS DPMWKEQ
pt_ACA60881_ ITQEVGLMSRFNARPRIGHYNAVLRMFGY LKRHLNSKLVCDPHTRDFSHIN FVNPSWKEQ
ITQEVGLMSRFNA*PR GHYNAVLRMF YLKRHLNSKLVCDPH R*FS * F P WKEQ

```

```

                1800      1810      1820      1830      1840      1850
pt_1883_       YPNAVEELPPAMPKPMGRSVQITVFVDAAHADCHVTRRSTTGILIFINGTPIRWYSKRQN
pt_ACA60881_  YPDAQEELPPDMPPPLGRAVQVSFVDAAHADCHVTRRSTTGILAFINGTPIRWYSKRQN
                YP A EELPP MP P*GR VQ**VFVDAAHADCHVTRRSTTGIL*FINGTPIRWYSKRQN

                1860      1870      1880      1890      1900      1910
pt_1883_       TVEGSTYGSFVAMRIASEMIIALRYNLRVLGVPLGPNVFCDNMSVVTSSSTIPSSVLK
pt_ACA60881_  TVEASTYGSFVAMRIASEMIIITLRYNLRVLGIPIDGPNVFCDNMSVVTSSATIPSSVLK
                TVE*STYGSFVAMRIASEMII LRYNLRVLG*P* GPNVFCDNMSVVTSSATIPSSVLK

                1920      1930      1940      1950      1960
pt_1883_       KKHNAISYHKVRECIASGTMRLAHEPTGSNLS DMLTKCLSGPQHKFLISHILF
pt_ACA60881_  KKHNAISYHKVRESIASGAMRIAHEPTGSNLADTLTKCLPGPQHKFLVRHILY
                KKHNAISYHKVRE IASG MRIAHEPTGSNL D LTKCL GPQHKFL*RHIL*
    
```

Abb. 9: Vergleich der Aminosäuresequenz der gagpol Polyproteine aus *Phaeodactylum tricornutum* (pt). Schwarz: hydrophobisch (ACFGILMPVWY), Grün: hydrophil (NQST), Blau: basisch (HKR), Rot: sauer (DE), Cystein: C. *: Aminosäure der gleichen Gruppe, Grau: Aminosäuresequenz, die den Werten der Mass Spec Analyse entsprechen. Die Prot IDs sind hinter den Proteinen angegeben. Zwischen beiden Proteinen besteht eine 66%iger Identität.

```

                1          10          20          30          40          50
Saccharina_japonica_BAF80876_  -----MEEGVKVWAAGG--PELWRKGSVSKRVPEAG-----KK
human_Q7Z406_                 MAAVTMSVPGRKAPPRPGVPVEAAQPFLFTPRGPGSAGGGPGSGTSPQVEW
guill_ENSG00000196535_       -----
pt_36403_                   -----
ostreo_CAL50197_             ---MTPSERIVESATDEQTRAAAFRARVEAQCCEAVRDEARRATEKAKELF

                60          70          80          90          100
Saccharina_japonica_BAF80876_  TAR--ITVVLDEGGTAEFVVSDEQDECADVKLRNVAG-----QAS
human_Q7Z406_                 TARRLVWVPSSELHGFEAAALRDEGEEEAEVVELAESGRRLRLPRDQIQRMN
guill_ENSG00000196535_       -----
pt_36403_                   -----
ostreo_CAL50197_             ERYDSSGATASEERATQMETRPEAPPATPVERSGVARSMSADAEEELVRAL

                110         120         130         140         150
Saccharina_japonica_BAF80876_  TLEGLGAEDLTSLTHLHEPTILYSLNQRYSDDLIIYTGVPILLAVNPFKR
human_Q7Z406_                 PPKFKAEDMAELTCLNEASVLHNLRERYYSGLIYTYSGLFQVVINPYKQ
guill_ENSG00000196535_       -----
pt_36403_                   -----
ostreo_CAL50197_             -----MDTVTRLFFLLSLVLLHEASQAFLGQMATRHGAMGRSIS-----
                * * T * * * S * * * * G A * *

                160         170         180         190         200
Saccharina_japonica_BAF80876_  VQLYTDIILAAAYRQDGERRHYDPEYDGTLPAPHVYAIADKAYRNMTPAPSNE
human_Q7Z406_                 LPIYTEAIVEMYR--GKKRHEVP-----PHVYAVTEGAYRSMQLQ----
guill_ENSG00000196535_       -----
pt_36403_                   -----
ostreo_CAL50197_             VERLKLEALKRETKDALTRVVVTSNDEDKDVENKINSTRRLSLEDEE

                210         220         230         240         250
Saccharina_japonica_BAF80876_  YEHRQSILVSGESGAGKTETCKIIVKYLAAILGS---KTGSTELGTIEQ
human_Q7Z406_                 -DREDQSILCTGESGAGKTENTKKVIQYLAHVASSPKGRKEPGVPGELER
guill_ENSG00000196535_       -----
pt_36403_                   -----
ostreo_CAL50197_             ARLAENLEYQRKNSACVRKACQEEKRLRKHLDEVRAEVENETAHMQKLK

                260         270         280         290         300
Saccharina_japonica_BAF80876_  QVLESNPILAEFGNARTVNRDNSSRFGKYIQIIFDGYGKLTGAQIKTFFLL
human_Q7Z406_                 QLLQANPILAEFGNAKTVKNDNSRFGKFIKINFDVAGYIVGANIETYLL
guill_ENSG00000196535_       -----
pt_36403_                   -----
ostreo_CAL50197_             STMADQPKLGRFDSSEIETSNDDS-----DGDNHRNKKLTLELLEH
                SDTQVAANILEEHESYIEKVRSELEELERAVESKSAMLRLEDGDQSTLEQ
                S * * * S * * * * LE
    
```

```

          310      320      330      340      350
Saccharina_japonica_BAF80876_ EKVRVVKHSAMERNYHIFYMLAAGASAEQRESWAMGDLEGHQFTSQSGCY
human_Q7Z406_ EKSRAIRQAKDECSFHIFYQLLGAGEQLKADLLEPCSHYRFLTINGPSS
guill_ENSG00000196535_ DKSLVSRQEAKIRELETRLEFER-----
pt_36403_ TRGQLLESQSNVTSMEAQLKELNG-----
ostreo_CAL50197_ ELEEVRAQLDQQRRLGTQLLEEQEQQ-----
          * * * * * Q L E

          360      370      380      390      400
Saccharina_japonica_BAF80876_ DRRDGVLDSDLYAELEIAFSVMGFEEENGKANIFRMVA AVLALGDVDFVER
human_Q7Z406_ SPGQ---ERELFQETLESRLRVLGF SHEEII SMLRMVSAVLQFGNIALKR-
guill_ENSG00000196535_ -----
pt_36403_ -----
ostreo_CAL50197_ -----

          410      420      430      440      450
Saccharina_japonica_BAF80876_ PDAGDEERLTDLSEPSRPRLEAAARLLDVSPERILTALTSRKINAGISNQ
human_Q7Z406_ -----ERNTDQATMPDNTAAQKLCRLGLGVTD FSRALLTPRIKIVGR-DY
guill_ENSG00000196535_ -----
pt_36403_ -----
ostreo_CAL50197_ -----

          460      470      480      490      500
Saccharina_japonica_BAF80876_ VTIYLTQEQSGHARDALAKAVYAAMFEWVVGRTNECIEAKQAEAVSEDRI
human_Q7Z406_ VQKAQTKEQADFALAEALAKATYERLFRWLVLRLNRALDRSPRQGAS----
guill_ENSG00000196535_ -----TQVKRLESLSARLKENMEK-----
pt_36403_ -----KVPDLKFKITEMRVKLESEEQRARKTAESE---
ostreo_CAL50197_ -----ARDTAEKATEALKTEVEQLKEEKIRCEADIE---
          * * * * * V E **R A*

          510      520      530      540      550
Saccharina_japonica_BAF80876_ FIGLLDIFGFEIFTNNYFEQFLINYANEVLQQQFNMFVFRQEQEYEREK
human_Q7Z406_ FLGILDIAGFEIFQLNSFEQLCINYNTEKQLQLFNHTMFVLEQEEYQREG
guill_ENSG00000196535_ -----LTEERDQRIAAENREKEQNKRLQR--
pt_36403_ -----ALDALKASNEQLTATLNEERIEKLNDAEQVK-
ostreo_CAL50197_ -----KSQALAEAVQLLQLAKETAREMSW
          S*E*L ** * K * *

          560      570      580      590      600
Saccharina_japonica_BAF80876_ IEWNFIIEFPDNDKCIELIDK--KPNGIIPTLDEQCLLGKSTDDRFAREM
human_Q7Z406_ IPWTFLDGFLDLQPCIDLERPANPPGLLALLDEECWFPKATDKSFVEKV
guill_ENSG00000196535_ -----QLRDTKEEMGELARKAEASR
pt_36403_ -----KERESIRYMQASVKLARTRI
ostreo_CAL50197_ NMMN-----AMTPQSSCQVSRLRSDIFDSAH
          S * * ** *

          610      620      630      640      650
Saccharina_japonica_BAF80876_ YKKEGHDHFQLAPKMRVEHKICVRHYAGKVVYSTEGIVEKNRDTLQQ--
human_Q7Z406_ AQEQGGHPKFORPRHLRDQADFSVLHYAGKVVDYKANEWLKMNDPLNDNV
guill_ENSG00000196535_ KKHLELGRS-----
pt_36403_ KNKFMDDGKTAIHTVFSPKDQPLC-----
ostreo_CAL50197_ NTPHESPIINDVRRLLFDSDPTPASEEEKAYYRLMMIEKAAKDADVRRAA
          * * ** * D*p *

          660      670      680      690      700
Saccharina_japonica_BAF80876_ -----EGTEFERNIWRKFWEE
human_Q7Z406_ AALLHQSTDRDLTAETIWKDVEGIVGLEQVSSLGDGPPGGRPRRGMFRTVQG
guill_ENSG00000196535_ -----
pt_36403_ -----
ostreo_CAL50197_ SETAAQNAEIRLRMRVDFMNRVGRSPSSTACSTPSRPASPLCMDYPIYQC

          710      720      730      740      750
Saccharina_japonica_BAF80876_ PSERVLGRF-----
human_Q7Z406_ LYKESLSRLMATLSNTNPSFVRCIVPNHEKRAGKLEPRLVLDQLRCNGVL
guill_ENSG00000196535_ -----
pt_36403_ -----
ostreo_CAL50197_ SQTASVINSLESLRTQLNFRAKQSDAQSEQKASWRAASTPREELRSKLDQ

          760      770      780      790      800
Saccharina_japonica_BAF80876_ -----
human_Q7Z406_ EGIRICRQGFPNRILFQEFRQRYEILTPNAIPKGFMDGKQACEKMIQALE
guill_ENSG00000196535_ -----
pt_36403_ -----
ostreo_CAL50197_ LVAEIRRAR-----

```

Abb. 10: Vergleich der Aminosäuresequenz des Myosins-ähnlichen Protein aus *Phaeodactylum tricornutum* (pt), Diatomee *Saccharina japonica* (Saccharina_japonica), *Homo sapiens* (human), Rotalge *Guillardia theta* (guill) und Grünalge *Ostreococcus tauri* (ostreo). Schwarz: hydrophobisch (ACFGILMPVWY), Grün: hydrophil (NQST), Blau: basisch (HKR), Rot: sauer (DE), Cystein: C. *: Aminosäure der gleichen Gruppe, Grau: Aminosäuresequenz, die den Werten der Mass Spec Analyse entsprechen. DICK: vorhergesagtes Signalpeptid durch SignalP's Hidden Markov Modelle, UNTERSTRICHEN: geschätztes Transitpeptiddomäne, KURSIV: reifes Protein. Die Prot IDs sind hinter den Proteinen angegeben. Ein Alignemnt ohne Gaps würde eine noch geringere Homologie innerhalb der Sequenzen ergeben. Das Myosin-ähnliche Protein von *P. tricornutum* hat zum Myosin von *O. tauri* eine 35%ige Identität.

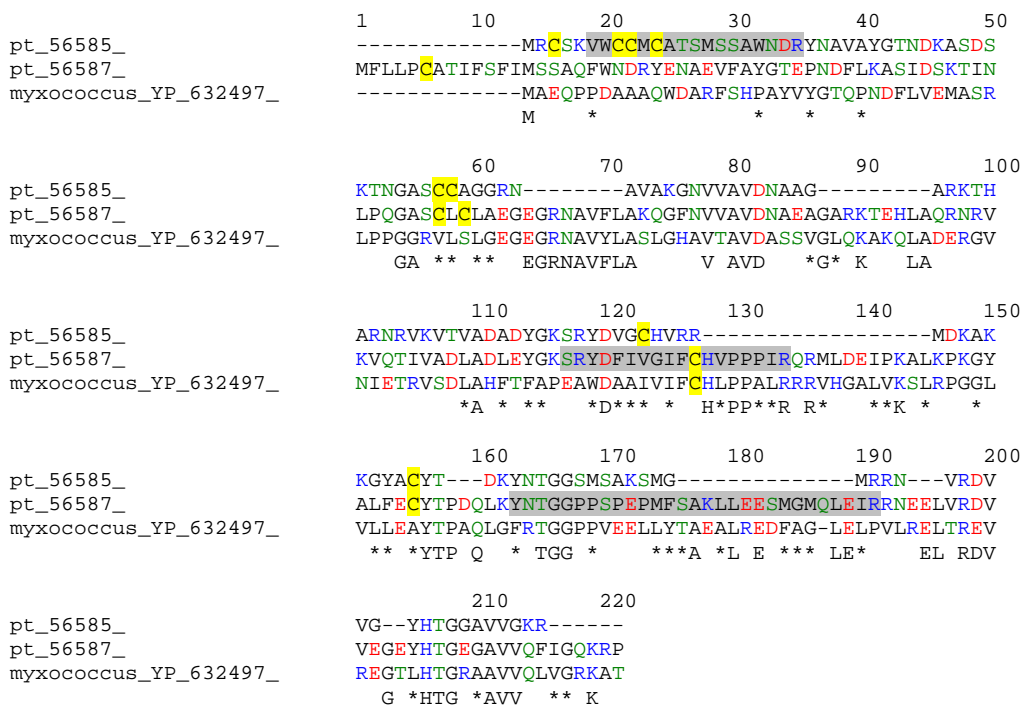


Abb. 11: Vergleich der Aminosäuresequenz der Thiopurin S-Methyltransferase aus *Phaeodactylum tricornutum* (pt) und Proteobakterium *Myxococcus xanthus* (myxococcus). Schwarz: hydrophobisch (ACFGILMPVWY), Grün: hydrophil (NQST), Blau: basisch (HKR), Rot: sauer (DE), Cystein: C. *: Aminosäure der gleichen Gruppe, Grau: Aminosäuresequenz, die den Werten der Mass Spec Analyse entsprechen. Die Prot IDs sind hinter den Proteinen angegeben. Die S-Methyltransferase von *P. tricornutum* hat eine 43%ige Identität zum Protein von *M. xanthus*.

Im ersten Spot (siehe Abbildung 4) sind laut Massen-Spektrographie (Mass Spec) zwei Proteine vorhanden (siehe Tabelle 1). Das Protein ist im 2D-SDS Gel etwa 30 kDa groß, wie auch das hypothetische Protein. Dieses reife Protein hat die zum 2D-SDS Gel passende Größe (etwa 30 kDa) und erfüllt die meisten Mass Spec Werte, zusätzlich ist das Protein auch plastidär. Bei dem Sequenzvergleich mit anderen Proteinen in der NCBI-Gendatenbank konnte es nicht eindeutig mit anderen

Proteinen zugeordnet werden. Die Protein Scores waren zu unsicher. Das zweite Protein, die NAD-abhängige Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase (EC 1.1.1.8) ist als mögliches Zielprotein der plastidären TrxF aufgrund der Lokalisation auszuschließen. Es hat als reifes Protein eine Größe von etwa 46 und 35 kDa (die zwei verschiedenen Größen beziehen sich auf die zwei verschiedenen Transkriptionsmöglichkeiten des Gens, siehe Tabelle 1 und Abbildung 6) und stimmt mit der ermittelten Größe (etwa 30 kDa) auf dem 2D-SDS Gel nicht überein (siehe Abbildung 5). Zusätzlich ist der Mass Spec Wert schon von dem hypothetischen Protein (siehe Tabelle 1) erfüllt. Diese NAD-abhängige Glycerol-3-Phosphate Dehydrogenase ist an der Glycerophospholipid Biosynthese beteiligt und katalysiert die Reduktion von Dihydroxyaceton Phosphat zu *sn*-Glycerol-3-Phosphat, in *Chlamydomonas reinhardtii* ist dieses Protein plastidär (Klöck und Kreuzberg 1989). Dieses Protein hat zwei Cysteingruppen (siehe Abbildung 6), dies entspräche der regulativen Cysteineinheit der FBPasen (C2, C3).

Im zweiten Spot wurden zwei Proteine identifiziert. Das erste cytosolische Protein, die Tyrosyl-tRNA Synthetase (TyrRS, EC 1.1.1.8) bindet an das 3' Ende der tRNA Tyrosin. Die TyrRS ist spezifisch für Tyrosin und verantwortlich für die Genauigkeit der Protein Synthese. TyrRS bindet das Tyrosin an die tRNA in zwei Schritten: der erste Schritt wird aus Tyrosin und ATP Tyrosyladenylat (Tyr-AMP) synthetisiert und an das Enzym gebunden. Im zweiten enzymatischen Schritt wird das Tyrosin vom Tyrosyladenylat auf das 3' Ende der tRNA übertragen und AMP wird wieder frei (Garcia *et al.* 1990). Die Größe des Proteins von etwa 86 kDa stimmt nicht mit der Größe des Proteinspots auf dem 2D-SDS Gel (etwa 40 kDa) überein (siehe Abbildung 5, 7 und Tabelle 1). Durch diesen Größenunterschied fällt dieses cytosolische Protein als mögliches Zielprotein weg. Das zweite cytosolische Protein, die Methyltransferase überträgt Methylgruppen auf Proteine, es hat zum 2D-SDS Gel die passendere Größe mit etwa 42 kDa (siehe Abbildung 5 und Tabelle 1).

Im vierten Spot sind zwei Proteine vorhanden, welche jeweils verschiedene Mass Spec Werte aufweisen (siehe Abbildung 5 und Tabelle 1). Dies bedeutet, daß beide Proteine gleichzeitig in diesem Spot vorhanden sein können. Das erste Protein, die gag-pol Polymerase (etwa 219 kDa) ist eine Kombination aus zwei Proteinen, welche als Gene in allen Retroelementen zu finden sind (Gao *et al.* 2003). Das *gag* Gen liegt am 5' Ende und kodiert strukturelle Proteine für die Form des Virus (Retroviren) oder für Virus ähnliche (Retrotransposons). Das am 3' Ende

liegende *pol* Gen kodiert meistens Enzyme wie die Reverse Transkriptase. Es kommt sehr häufig vor, dass die *gag* und *pol* Gene voneinander nicht getrennt sind, daher auch die theoretisch hohe Proteinmasse. Im *gag* Gen ist häufig ein Zink-Finger zu identifizieren und im *pol* Gen ist häufig eine Ähnlichkeit zu Proteasen zu erkennen (Gao *et al.* 2003). Die *gag-pol* Polymerase fällt als mögliches Zielprotein des Thioredoxin Typ F weg, weil es cytosolisch und viel zu groß gegenüber der Proteingröße auf dem Gel ist (siehe Abbildung 5, 9 und Tabelle 1). Das zweite Protein im vierten Spot ist die RUBISCO small Subunit mit etwa 15 kDa. Diese Größe stimmt mit der Größe des Proteins auf dem 2D-SDS Gel überein (siehe Abbildung 5). Die RUBISCO ist das am häufigsten vorkommende Protein in den Chloroplasten höherer Landpflanzen (Orellana und Perry 1992, 1995). Es wurde aber schon häufiger Untereinheiten der RUBISCO an Trx-Affinitätschromatographiesäulen gebunden (Buchanan und Balmer 2005, Motohashi *et al.* 2001). Es kann sein, dass die auf dem Plastidengenom kodierten Untereinheiten der RUBISCO von TrxF *in vivo* im Stroma der Plastiden direkt reguliert werden. Hierzu bedarf es aber weiterer Analysen.

Im fünften Spot kann ein plastidäres Protein identifiziert werden, welches ähnlich zum Myosin (class II heavy chain) ist, in der Grünlage *Ostreococcus tauri* und der Rotalge *Guillardia theta* sind auch Myosin-ähnliche Proteine zu identifizieren (siehe Abbildung 10). Die Aminosäuresequenz des Proteins clustert beim Blasten in der NCBI-Proteindatenbank nur mit Myosin. Außerdem clustert die Aminosäuresequenz dieses Proteins in der Nähe der Sequenz des Myosinkopfes vom nicht-muskulären Myosin Class II aus *Homo sapiens*. Das plastidäre Myosin-ähnliche Protein wurde auf membranständige Bereiche mit bioinformatischen TMHMM Vorhersagen getestet (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Krogh *et al.* 2001, Sonnhammer *et al.* 1998), aber es konnten keine membranintegrierten Bereiche identifiziert werden. Der Mass Spec Wert des Myosin-ähnlichen Proteins ist im Signal- und Transitpeptidbereichs (siehe Abbildung 10).

Im sechsten Spot gibt es nur ein Protein, Thiopurin S-Methyltransferase (EC 2.1.1.67), die eine passende Größe wie im 2D-SDS Gel aufweist (siehe Abbildung 5 und Tabelle 1). Thiopurine S-Methyltransferase (TPMT) sind cytosolische Proteine, welche die S-Methylierung von aromatischen und heterocyclischen Gruppen katalysieren. Zwar stimmen nur zwei Werte mit den Mass Spec Werten von diesem Protein überein, aber es konnten mit MS-FIT (<http://prospector.ucsf.edu/cgi->

bin/msform.cgi?form=msfitstandard) gegen NCBI Proteindatenbank keine anderen Proteine gefunden werden, so daß die Thiopurin S-Methyltransferase von *P. tricornutum* als Kandidat für eine Regulierung über cytosolische Thioredoxine gelten kann.

3. Diskussion

3.1 *In vitro* Reduktionstest

Das mittlere Redoxpotential ist unter anderem ein Maß dafür, wie schnell ein Protein reduziert werden kann. Je tiefer der mV-Wert ist, umso langsamer ist die Geschwindigkeit, bzw. um so höher muss die Konzentration des Reduktionsmittel (reduziertes DTT) sein. Bei *A. thaliana* wurden die mittleren Redoxpotentiale von TrxF und TrxM ermittelt (Collin *et al.* 2003). Dabei konnte gezeigt werden, daß das mittlere Redoxpotential von TrxF bei -351 mV und TrxM bei ungefähr -360 mV liegt. In *P. tricornutum* kann das TrxF durch wesentlich geringere Konzentrationen an Reduktionsmittel als TrxM vollständig reduziert werden. Für den RPP in höheren Landpflanzen ist das Thioredoxin ein wichtiges Regulationsprotein, da es bei Licht die Proteine reduziert und aktiviert, bzw. die durch Trx regulierbare GPDH des OPP deaktiviert. Das TrxM reduziert in *A. thaliana* die NADP-abhängige Malat Dehydrogenase (MDH), bzw. auch die GAPDH (Lemaire *et al.* 2007). Es wurde bis jetzt in Hinblick auf das Redoxpotential noch kein Vergleich von TrxF und TrxM aus *P. tricornutum* durchgeführt. Es kann für die Regulation des RPP in *P. tricornutum* sehr wichtig sein, daß die Thioredoxine unterschiedlich von der Ferredoxin/Thioredoxin Reduktase (FTR) reduziert werden können. In der RPP von *P. tricornutum* sind wahrscheinlich nur noch die FBPasen (C2 42456, C3 31451) als einzige regulierbare Proteine vorhanden.

Neben der einfachen Reduzierung des Thioredoxins durch DTT, kann das mittlere Redoxpotential durch definierte Verhältnisse von oxidiertem und reduziertem DTT bei verschiedenen pH Werten ermittelt werden. Ähnlich wie es zum Beispiel Michels *et al.* (2005) das mittlere Redoxpotential von der PRK aus *O. sinensis* ermittelt hat.

3.2 Sequenzanalyse der Zielproteine

Auf dem 2D-SDS-Gel (siehe Abbildung 5) sind mindestens 10 Proteine zu erkennen. Von diesen Proteinen konnten nur von 6 Proteinen Mass Spec Werte ermittelt werden (siehe Abbildung 5). Aus diesen Daten wurden bioinformatisch mittels PeptideSearch die möglichsten Proteine berechnet. Zur Berechnung lagen automatisch ermittelte Proteinsequenzen vor. So war darin auch die Präsequenz des Myosin-ähnlichen Proteins schon in den Proteinsequenzen enthalten, die einen Hit für die Mass Spec Werte ergab. Während des Transports der plastidären Proteine durch die vier Plastidenmembranen, werden die Präsequenzen abgetrennt. Im Stroma liegen dann die reifen Proteine ohne Präsequenz vor. Dies zeigt die Grenzen der Methode auf, wenn von Mass Spec Werten aus, Zielproteine ermittelt werden. Besser wäre eine N-terminale Ansequenzierung der Proteine, um dann die Zielproteine zu identifizieren. Trotzdem sind wahrscheinlich neue und unbekannte mögliche Zielproteine von TrxF in den Plastiden (RUBISCO sSU, hypothetisches Protein) und von Trx im Cytosol (Methyltransferase, Thiopurin S-Methyltransferase) gesammelt und identifiziert worden. Dabei muß aber berücksichtigt werden, daß alle Proteine an das mutierte TrxF der Affinitätschromatographiesäule binden können, die mindestens ein Cystein an der Proteinoberfläche haben. So auch das Myosin-ähnliche Protein, welches am C-terminalen Ende nur ein einziges Cystein aufweist. Die Myosin Proteine kommen bei vielen Organismen vor und lassen sich zurzeit in 18 verschiedene Gruppen einteilen (Thompson und Langford 2002). Jedes Myosin der 18 Gruppen (Furusawa *et al.* 2000) besitzt eine schwere Kette (heavy chain) mit einem in der Sequenz konservierten Kopfbereich, der generell N-terminal vorliegt. Es folgt dann eine alpha-helikale light-chain-binding Region mit einem C-terminalen Schwanz. Die Gruppen I und II sind evolutionär die ältesten Gruppen. Von der Gruppe II stammt wahrscheinlich die Gruppe XI ab (Thompson und Langford 2002), Gruppe XI ist auch in *A. thaliana* zu finden (Holweg und Nick 2004). Myosin übernimmt in der Zelle viele verschiedene Funktionen wie Cytokinese und Organellentransport, ebenso ist es für die Zellpolarisation (Yin *et al.* 2000) und Signal Transduktion (Bähler 2000) zuständig. Die Myosine der Gruppe I haben die Funktion als endocytische und exocytische Membranaustauscher, die Gruppe II ist eine Komponente des Kontraktilen Ringes für die Zellteilung und das Sarkomer in Muskelzellen. Myosin der Gruppe III ist in photorezeptorischen Zellen der Retina lokalisiert und übernimmt die Signal Transduktion (Montell und Rubin 1988). Die Myosine der Gruppen V und XI bewegen die Organellen in Tieren und Pflanzen. Die

Gruppe VI bewegt die Aktinfilamente (Wells *et al.* 1999). In Pflanzen sind nur die Gruppen VIII, XI und XIII gefunden worden (Holweg und Nick 2004). Die Funktion der anderen Gruppen ist bislang unbekannt (Thompson und Langford 2002). Bei Chromalveolaten, worunter auch *T. pseudonana* und *P. tricornutum* gehören, konnten neue Myosin Gruppen (XXII, XXIII und XXIV) eingeteilt werden (Foth *et al.* 2006). Plastidäre Myosin-ähnliche Proteine wie in *P. tricornutum* können auch in der Rotalge *Guillardia theta* gefunden werden; nur Myosine in Pflanzen, die an Chloroplasten außen assoziiert sind. Auf jeden Fall ist dieses plastidäre Protein kein mögliches Zielprotein, welches von Thioredoxin reguliert wird, da nur ein einziges Cystein am C-terminalen Ende vorhanden ist. Die genaue physiologische Funktion dieses Myosin-ähnlichen Proteins muß noch geklärt werden.

Die unspezifisch gebundenen Proteine müssen von den möglichen Zielproteinen aussortiert werden. Die möglichen Zielproteine müssen mindestens zwei Cysteine in der Aminosäuresequenz haben, welche in der Tertiärstruktur des Proteins einen Abstand unter 10 Å haben, damit sie eine intramolekulare Disulfidbrücke bilden können, die zur Regulation durch Thioredoxine notwendig ist. Um die möglichen Zielproteine als tatsächliche Zielproteine von Thioredoxin zu bestätigen, müssten diese Proteine rekombinant exprimiert und enzymatisch mit Thioredoxin getestet werden.

Bis jetzt ist nur theoretisch bekannt, daß die plastidären FBPasen (C2 42456, C3 31451) in *P. tricornutum* durch das TrxF reduziert werden können (Michels *et al.* 2005), da sie die notwendigen Cysteine vorhanden haben (siehe Kapitel 1 und 3) im Vergleich zur FBPase aus *Pisum sativum* (Ruelland und Miginiac-Maslow 1999). Die beiden anderen FBPasen (C1 42886, C4 54279) in *P. tricornutum* weisen an den entsprechenden Stellen keine Cysteine auf (siehe Kapitel 1). Diese vier plastidären FBPasen haben als reife Proteine eine Größe von 35 bis 38 kDa. Wie in Kapitel 3 beschrieben, könnten die plastidären FBPasen wahrscheinlich an den Thylakoiden assoziiert sein, wie auch andere Calvin Zyklus Proteine (Adler *et al.* 1993, Süß *et al.* 1993, Teige *et al.* 1998). Es wurden alle vier plastidären FBPasen auf membranständige Bereiche mit TMHMM Vorhersagen getestet (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), aber es konnten keine Bereiche identifiziert werden, die in der Membran als Anker dienen könnten, somit sollten alle vier Proteine löslich sein. Im Enzymassay (siehe Kapitel 3) konnten keine oder nur sehr schwache Enzymaktivitäten der FBPasen im Gesamtextrakt aus *P. tricornutum*

gemessen werden, wenn der Extrakt vorher zentrifugiert wurde. Im nicht-zentrifugierten Gesamtzellextrakt konnte eine bis zu 80% höhere Gesamtaktivität festgestellt werden. Der Gesamtzellextrakt von *P. tricornutum* wurde vor der Zugabe auf die Trx-Affinitätschromatographie zentrifugiert. Dies könnte erklären, daß keine FBPasen auf dem 2D-SDS Gel zu identifizieren sind.

Trx-Affinitätschromatographie ist eine probate Methode, um neue Zielproteine identifizieren zu können (Buchanan und Balmer 2005, Hisabori *et al.* 2005). Durch diese Methode wurden Proteingruppen (Peroxiredoxine, Acetyl CoA Carboxylase, RUBISCO Aktivase) als Zielproteine von Thioredoxin ermittelt, von denen man vorher nicht gewusst hatte, dass sie Trx-Zielproteine sind (Hisabori *et al.* 2005). Sehr häufig werden dabei die am Thioredoxin gebundenen Proteine als Zielproteine identifiziert und betitelt, ohne enzymatische Untersuchungen durchgeführt zu haben. Dies wird auch von Hisabori *et al.* (2005) erwähnt. Wenn bei einer FBPase-Affinitätschromatographie ausschließlich Thioredoxin Typ F gesammelt wurde (Buc *et al.* 1984), kann bei einer bekannten Proteininteraktion zwischen FBPase und Thioredoxin auf enzymatische Messungen abgesehen werden. Um aber in Diatomeen, hier *P. tricornutum*, einen ersten Einblick in die Redoxregulation von Proteinen durch Trx zu bekommen, ist eine Affinitätschromatographie ein guter Einstieg.

Kapitel 3 Regulation der Calvin Zyklus Enzyme über Transkriptionslevel und Aktivitäten der Fruktose-1,6-Bisphosphatasen von *Phaeodactylum tricornutum*

1. Einleitung

Die Fruktose-1,6-Bisphosphatasen (FBPase, EC 3.1.3.11) höherer Pflanzen ist ein Homotetramer mit vier Untereinheiten von etwa je 40 kDa (Marcus und Harrisch 1990). Die zwei plastidäre FBPasen (FBPC2 42456, FBPC3 31451) von *Phaeodactylum tricornutum* besitzen 2 Cysteine (Cys 153 und Cys 173, Nummerierung entsprechend der Sequenz der FBPase von *Pisum sativum*) mit einem Abstand von etwa 20 Aminosäuren, im Gegensatz zur cytosolischen FBPase. Durch gerichtete Mutagenese (Jacqout *et al.* 1995, 1997) und durch kristallographische Analyse (Villeret *et al.* 1995, Chiadmi *et al.* 1999) konnte gezeigt werden, daß genau diese beiden Cysteine die regulatorische Einheit für eine Reduktion über das Thioredoxin Typ F (TrxF) sind (Sahrawy *et al.* 1997). Die cytosolische und die plastidären FBPasen sind durch verschiedene Systeme strikt reguliert (Martin *et al.* 2000). So wird die cytosolische FBPase durch AMP und durch Fruktose-2,6-Bisphosphat (F2,6BP) allosterisch gehemmt (Stitt 1990a, 1990b), kann aber durch Trx nicht aktiviert werden. Die plastidären FBPasen sind nicht sensitiv gegen AMP und F2,6BP, können aber redoxreguliert werden (Martin *et al.* 2000). So ist es möglich die cytosolische und die plastidäre FBPase hinsichtlich der enzymatischen Aktivität bei verschiedenen pH-Werten, Mg^{2+} -Konzentrationen und verschiedene Substratkonzentrationen zu unterscheiden. So zeigte die cytosolische FBPase bei alkalischen pH-Werten eine enzymatische Reaktion, aber nicht bei neutralem pH-Wert (Gomori 1943, Nel und Terblanche 1992). Die cytosolischen und die plastidären Formen der FBPasen kann man durch Ionen-Austausch Chromatographie, aber nicht durch Größenausschlußchromatographie trennen (Martin *et al.* 2000). Die vier plastidären FBPasen von *P. tricornutum* können in zwei Gruppen unterteilt werden. Die Enzyme der ersten Gruppe (FBPC1 42886, FBPC4 54279) besitzen keine Cysteine in der konservierten Region. FBPasen der zweiten Gruppe (FBPC2 42456, FBPC3 31451) besitzen in der konservierten Region zwei Cysteine, welche durch Thioredoxin Typ F (TrxF) reduziert und aktiviert werden können (siehe Kapitel 1).

Die enzymatischen Aktivitäten der FBPasen und anderer Calvin Zyklus Enzyme sind nicht nur auf Proteinebene reguliert, auch die Transkriptionsraten sind in Pflanzen teilweise lichtabhängig reguliert. So hat der Promotor für die RUBISCO eine Bindestelle für die Transkriptionsfaktoren GT-1 (Lam und Chua 1990, Sarokin und Chua 1992) und GT-2 (Gilmartin *et al.* 1992). Diese Faktoren sind für die Lichtsensivität des Promotors verantwortlich. Bei Hafer und Reis konnten im Promotor für das Gen der FBPase auch eine DNA Bindestelle für den GT-1 Transkriptionsfaktor gefunden werden (Lloyd *et al.* 1991b). So ist die FBPase zumindest bei höheren Landpflanzen in der Transkriptionsrate lichtreguliert. Auch andere Enzyme des Calvin Zyklus sind in der Transkriptionsrate durch das Licht reguliert. So sind die kleine kernkodierte Untereinheit von der RUBISCO (DeRocher *et al.* 1993, Fritz *et al.* 1993, Wolter *et al.* 1988), die große Untereinheit der auf dem Plastidengenom kodierte RUBISCO in *P. tricornutum* (Wawrik *et al.* 2002), die kernkodierte GAPDH-A bei Mais (Quigley *et al.* 1988) und bei *Arabidopsis thaliana* (Shih *et al.* 1992), die kernkodierte SBPase und FBPase von Weizen (Raines *et al.* 1988, 1992), die kernkodierte Aldolase von Reis (Tsutsumi *et al.* 1994) und von der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* (Pelzer-Reith *et al.* 1995) und die PRK von Weizen (Lloyd *et al.* 1991a) in der Transkriptionsrate lichtreguliert. Wie Martin *et al.* (2000) beschreibt, ist nur sehr wenig über die Transkriptionsraten von Enzymen aus dem Calvin Zyklus bekannt, bzw. untersucht worden. Durch die Transkriptionsmenge von Genen des Calvin Zyklus und durch die anschließende Translation der mRNA, kann unter anderem die Menge des jeweiligen Enzyms reguliert werden. Mit Hilfe der quantitativen RealTime-PCR (qPCR) kann man schon mit sehr niedriger mRNA, bzw. cDNA Konzentration Transkripte verschiedener Gene erkennen. Durch die von Pfaffl *et al.* (2001, 2002) entwickelte mathematische Berechnung der mRNA Konzentration, ist es einfacher geworden, die Daten der qPCR genauer auszuwerten.

2. Ergebnisse

2.1 Überexpression von FBPC3

Die Gene der Fructose-1,6-Bisphosphatasen (FBPC1-C4) aus *P. tricornutum* wurden in verschiedene Überexpressionsvektoren (pET23d(+), pQE30, pTYB2, pET32a(+)) ligiert, und in verschiedenen *E. coli* Stämmen (BL21 (DE3), BL21GOLD (DE3), Rosetta (DE3), Rosetta-gami, M15[pREp4]) exprimiert. Bei dem Vektor pET32 ist ein Thioredoxin von *Arabidopsis thaliana* an der Multiple Cloning Site angefügt, damit das angehängte Protein löslich wird. Dieses Thioredoxin wird durch enzymatischen Verdau mit Enterokinasen anschließend abgetrennt. Dieser enzymatische Verdau fragmentierte aber gleichzeitig auch die FBPC3. Bei der Expression der FBPasen wurden die Proteine immer als Inclusionbodies in der Zelle abgelagert. Die Expression wurde durch Unterschiede in der Codon-usage zwischen *P. tricornutum* und *E. coli* erschwert. Es stellte sich heraus, daß für manche Codons von *P. tricornutum* nicht immer die benötigten tRNAs in der *E. coli* Zelle vorhanden waren. Durch fehlende tRNAs für „seltene“ Codons kann entweder die Translation abgebrochen werden oder das Protein wird falsch gefaltet. Dies wird damit erklärt, dass der Translationskomplex am Anfang weniger stabil ist und durch selten verwendete Codons (low-usage codons) auseinander dissoziieren kann (Goldman *et al.* 1995). Wenn nun vor dem zu exprimierenden Protein für *E. coli* Zellen lesbare Nukleotidsequenzen (etwa 60 Nukleotide) N-terminal vorgesetzt werden, bleibt unter anderem der Translationskomplex stabil und das Protein wird in *E. coli* exprimiert (Goldman *et al.* 1995, Kleber-Janke und Becker 2000). Außerdem können G/C-reiche Nucleotidregionen am 5´ Ende des Gens eines rekombinanten Proteins eine Expression in *E. coli* verhindern, während A/T-reiche Nucleotidsequenzen am 5´ Ende eine Expression in *E. coli* begünstigen (Tang *et al.* 2000). Bei dem Vektor pET28a(+) kann N- und C-terminal dem Protein ein HIS-Tag angehängt werden. Durch die Multiple Cloning Side wurden dem Protein bewusst zusätzliche Nukleotide/Aminosäuren angefügt, welche aber keine Codon-Usage Probleme in *E. coli* Stämmen verursachen. Das rekombinante Protein Fructose-1,6-Bisphosphatase C3 (FBPC3, 31451) im Vektor pET28d(+) mit N- und C-terminalen HIS Tag (40,64 kDa) ließ sich ausschließlich mit der Antarctic Express RIL *E. coli* (Stratagene) nach Herstellerangaben überexprimieren (siehe Abbildung 2 und 3). Etwa nur 30% der

FBPC3 waren löslich, die anderen FBPasen (C1, C2, C4) lagerten sich immer als Inclusionbodies in der Zelle ab.

```

1      10      20      30      40      50      60      70      80      90
MGSSHHHHHSSGLVPRGSHMASMTGGQQMGRGSEFELRRQACGRTSLKRFMTEVSLLNPEIEELTTLFGAIETACKAIANLVKRSQLPS

100     110     120     130     140     150     160     170     180
SDTLGLQGEINVQGEDQKKLDVIANDILKRALRFTGRLGVLASEEEDTPVDLMPRDPSTKKVLIDEGEKYVAVFDPLDGSSNVDADIPTG

190     200     210     220     230     240     250     260     270
TIIGIYEHDETCKIDPDALDEDRTQEENLCLANTLQPGTNLVAAAYCLYSSSTFLVLTGAGTYGFTLDETIGEFVLSHPNIKIPECSSI

280     290     300     310     320     330     340     350     360
MSFNEANTPSWDRPLQDTFAKWRTGTGKSGKKFSSRYIGSMVGDVHRTLLYGGVFGYPGDKKNPNGKLRLLYEGAPMSFIMEQAGGLSTT

370     380     390     400
GTQVRMEISPDTVHQRPVLIIMGSRQDVVEEVMDAYKLEHHHHHH

```

Abb. 2: Aminosäuresequenz der rekombinanten FBPC3 (31451) von *P. tricornutum* im Vektor pET28d(+). Die regulativen Cysteine sind gelb unterlegt. *KURSIV*: Multiple Cloning Site, **Schwarz**: HIS-Tag, **NORMALDRUCK**: reifes Protein.

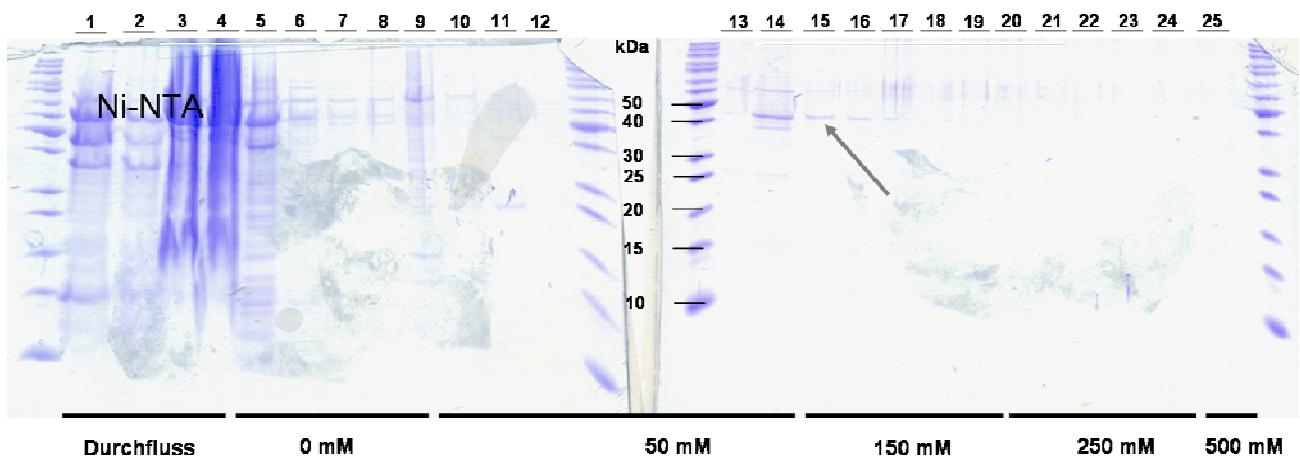


Abb. 3: Aufreinigung vom rekombinanten FBPC3 (31451) über eine Ni-NTA Agarose Säule (QIAGEN). Die Fruktose-1,6-Bisphosphatase C3 (40,64 kDa) wurde mit Imidazol (mM) von der Nickelsäule gelöst. Von Slot 1 bis 4 wurde der Durchfluss aufgetragen. Von Slot 5 bis 9 wurden Proteinfractionen aufgetragen, die mit Waschpuffer gelöst wurden. Von Slot 10 bis 14 wurden Proteinfractionen aufgetragen, die mit Elutionspuffer und 50 mM Imidazol gelöst wurden. Von Slot 15 bis 19 wurden Proteinfractionen aufgetragen, die mit Elutionspuffer und 150 mM Imidazol gelöst wurden, hier eluierte das rekombinante FBPC3 (grauer Pfeil). Von Slot 20 bis 24 wurden Proteinfractionen aufgetragen, die mit Elutionspuffer und 250 mM Imidazol gelöst wurden. Im Slot 25 wurde die Proteinfraction aufgetragen, die mit Elutionspuffer und 500 mM Imidazol gelöst wurde. In der Mitte ist die Proteingröße (kDa) angegeben.

Die lösliche, rekombinante FBPC3 wurde über eine Ni-NTA Säule aufgereinigt. Es konnten etwa 25 mg FBPC3 aus 24 Liter *E. coli* Kultur in LB-Medium aufgereinigt und aufkonzentriert werden.

2.2 *In vitro* Reduktion

In den Plastiden wird die FBPase durch das Thioredoxin F reduziert (Martin *et al.* 2000). *In vitro* kann die FBPase durch reduziertes DTT reduziert werden. Durch die Chemikalie AMS (4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid), welche sich an die reduzierten Cysteine bindet, kann die reduzierte FBPase im reduzierten Zustand „fixiert“ werden, da AMS nach der chemischen Bindung nicht mehr löslich ist. AMS kann sich an reduzierte Cysteine binden, wenn sie zueinander einen Abstand von etwa 10 Å haben (Motohashi *et al.* 2001, 2003). Wenn sich AMS an das Protein bindet, wird das Protein schwerer (pro gebundenes AMS an das Protein etwa 0,5 kDa, es bindet nur ein AMS pro Cystein). Die Cysteine der Thioredoxine, bzw. auch der plastidären FBPasen weisen genau diesen Abstand in der Tertiärstruktur auf. Bei der *in vitro* Reduktion der rekombinanten FBPC3 mit reduziertem DTT und anschließender Fusion mit ASM lässt sich erkennen, dass das Protein erst bei 500 µM DTT vollständig reduziert vorliegt (siehe Abbildung 4). Dadurch laufen reduzierte und oxidierte Proteine in zwei Banden untereinander. Die FBPC3 ist zumindest als Monomer diesbezüglich wohl korrekt gefaltet.

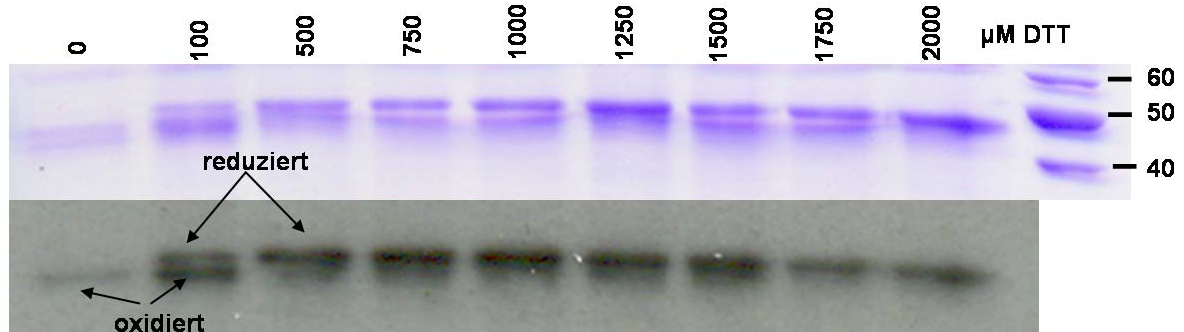


Abb. 4: *In vitro* Reduktion von der rekombinanten FBPC3. Reduktionslevel von FBPC3 erkennbar auf SDS-Gel (oben) und auf Western-Blot gegen HIS Tag (unten). FBPC3 ist bei 500 µM DTT vollständig reduziert. Unter der reduzierten Proteinbande ist eine weitere Bande zu sehen, welche evtl. von leicht degradierten FBPC3 stammt. Beim Übergang von 100 zu 500 µM DTT nimmt die Bande der oxidierten FBPase drastisch ab und die Bande des reduzierten Proteins nimmt stark zu.

2.3 Enzymassay von Gesamtzellextrakt aus *Phaeodactylum tricornutum*

Die Plastiden, wie auch die Mitochondrien von *P. tricornutum* lassen sich beim Aufbrechen der Zellen sehr schlecht isolieren. Daher wurde für die enzymatischen Assays der Gesamtextrakt der *P. tricornutum* untersucht und so in Kauf genommen, daß im Enzymassay die cytosolische FBPase (23247) durch ihre enzymatische Reaktion die ermittelten Aktivitäten der plastidären FBPasen (C1 42886, C2 42456,

C3 31451, C4 54279) beeinflusst. Der pH-Wert spielt bei der *in vitro* Aktivierung der plastidären FBPasen durch TrxF eine besondere Rolle. Deswegen wurde zur Reduzierung der plastidären FBPasen von *P. tricornutum* der pH-Wert in den Präinkubationsansätzen bei 7,5 gewählt. Damit der Cofaktor Mg^{2+} nicht inhibierend wirkt, wurde in den Präinkubationsansätzen eine Mg^{2+} Konzentration von nur 2,5 mM gewählt. Da das Substrat (Fruktose-1,6-Bisphosphat) eine Verunreinigung bis zu 4% von anderen Fruktosen beinhaltet, wurde in den Präinkubationsansätzen kein Substrat zur Aktivierung dazugegeben. Diese anderen Fruktosen können durch die gekoppelte Enzyme (PGI, Phosphoglucose Isomerase, GPDH Glucose-6-Phosphat Dehydrogenase) im Reaktionsansatz enzymatisch umgesetzt werden (siehe Abbildung 5). Die Temperatur spielt ebenfalls eine Rolle für die Enzymaktivität der cytosolischen und der plastidären FBPasen. Die cytosolische FBPase verträgt keine tiefen Temperaturen zwischen 0°C und 12°C, wenn anschließend bei 22°C ein Enzymassay gemessen wird. Nur wenn vor der Messung die cytosolische FBPase mindestens 40 Minuten sich auf etwa Raumtemperatur (RT) einstellen konnte, war eine normale Enzymaktivität wieder erreicht. In diesem Ansatz wird das durch die FBPase umgesetzte Fruktose-6-Phosphat zuerst durch die PGI in Glukose-6-Phosphat isomerisiert. Durch die Anwesenheit von $NADP^+$ kann die GPDH Glukose-6-Phosphat in Gluconat-6-Phosphat katalytisch umsetzen. Die Reduktion der $NADP^+$ zu NADPH verhält sich stöchiometrisch 1:1 mit der Dephosphorylierung von Fruktose-1,6-Bisphosphat zu Fruktose-6-P.

In dem Gesamtzellextrakt von *P. tricornutum* werden alle fünf vorhandenen FBPasen gemessen, die cytosolische FBPase (23247), die zwei plastidären FBPasen (C1 42886, C4 54279) und die zwei anderen plastidären FBPasen (C2 42456, C3 31451), welche jeweils zwei Cysteine in ihren regulativen Zentren haben (siehe Kapitel 1). Die FBPasen im Gesamtzellextrakt haben schon eine Grundaktivität (siehe Abbildung 6), diese kann eventuell zum einem daher kommen, da noch Fruktose-1,6-Bisphosphat, Fruktose-6-Phosphat oder Glucose-6-Phosphat im Extrakt vorhanden war, zum anderem FBPase oder die gekoppelten Enzyme (PGI und GPDH) die Fruktose-6-Phosphat oder Glucose-6-Phosphat verwerteten. Wenn der Zellextrakt zentrifugiert oder über eine Sephadex G25 Säule (Amersham) entsalzt wurde, war keine Enzymaktivität der FBPasen von *P. tricornutum* im Überstand oder im Durchfluss mehr zu messen (siehe Abbildung 10). Es wurden alle FBPasen auf Löslichkeit mit bioinformatischen TMHMM Vorhersagen getestet

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (Krogh *et al.* 2001, Sonnhammer *et al.* 1998), aber es konnten keine membranintegrierten Bereiche identifiziert werden.

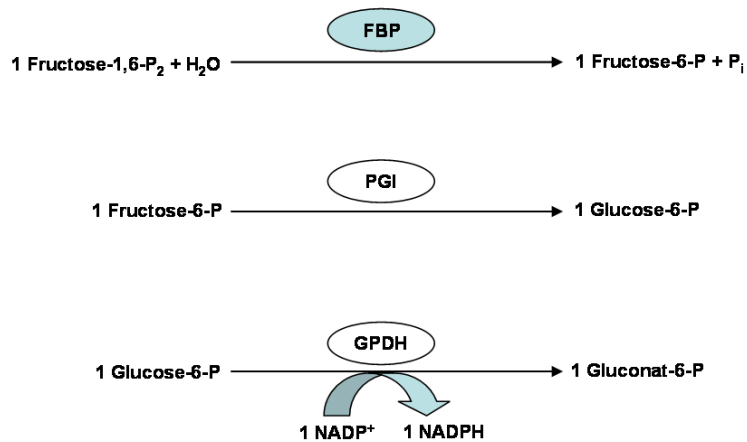


Abb. 5: Reaktionsschema des Enzymassays mit der Fructose-1,6-Bisphosphatase. Bei der enzymatischen Reaktion der FB Pase von Fructose-1,6-Bisphosphat zu Fructose-6-Bisphosphat wird nach zwei weiteren enzymatischen Reaktionen NADP^+ zu NADPH reduziert. Dies kann zeitgleich bei 340 nm im Photometer gemessen werden (Kelly *et al.* 1982, Nishizawa *et al.* 1982). FBP Fructose-1,6-Bisphosphatase, PGI Glucose-6-phosphate Isomerase, GPDH Glucose-6-phosphate Dehydrogenase.

Die Aktivität der FB Pasen nimmt mit zunehmender Substratkonzentration ab (siehe Abbildung 6), dies deutet auf eine Hemmung des Produktes hin. Die höchste Aktivität haben die FB Pasen zusammen bei 200 μM Substrat (siehe Abbildung 6 und 7) und pH 8,0 (siehe Abbildung 9). Bei pH 7 ist ein 20%iger und pH 9 sogar ein 40%iger Aktivitätsverlust zu beobachten.

Bei der Aktivitätskurve der FB Pasen auf Fructose-1,6-Bisphosphat nach Lineweaver/Burk kann V_{\max} und der K_M aus der Geradengleichung (siehe Abbildung 7) errechnet werden. Der y-Achsenabschnitt ist $1/V_{\max}$ mit 1044,2 daraus ergibt sich dann V_{\max} mit etwa 0,0010 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg}$ Gesamtzellproteine). K_M ist der Schnittpunkt der Geraden bei der x-Achse mit $-1/K_M$, dies ergibt dann ein K_M von 10,77 μM Substrat, bzw. $V_{\max}/2$ bei etwa 0,005 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \text{mg}$ Gesamtzellproteine). Bei der Aktivitätskurve (Abbildung 6) ist eine leichte sigmoide Steigung zu erkennen, dies kann auf allosterische Enzyme hindeuten. Die gesamten FB Pasen haben eine optimale Enzymaktivität bei 10 mM Mg^{2+} und pH 8,0 (Abbildung 8). Außerdem kann die Aktivität der FB Pasen im Gesamtzellextrakt von *P. tricornutum* durch reduziertes DTT gesteigert oder durch oxidiertes DTT minimiert werden (siehe Abbildung 10).

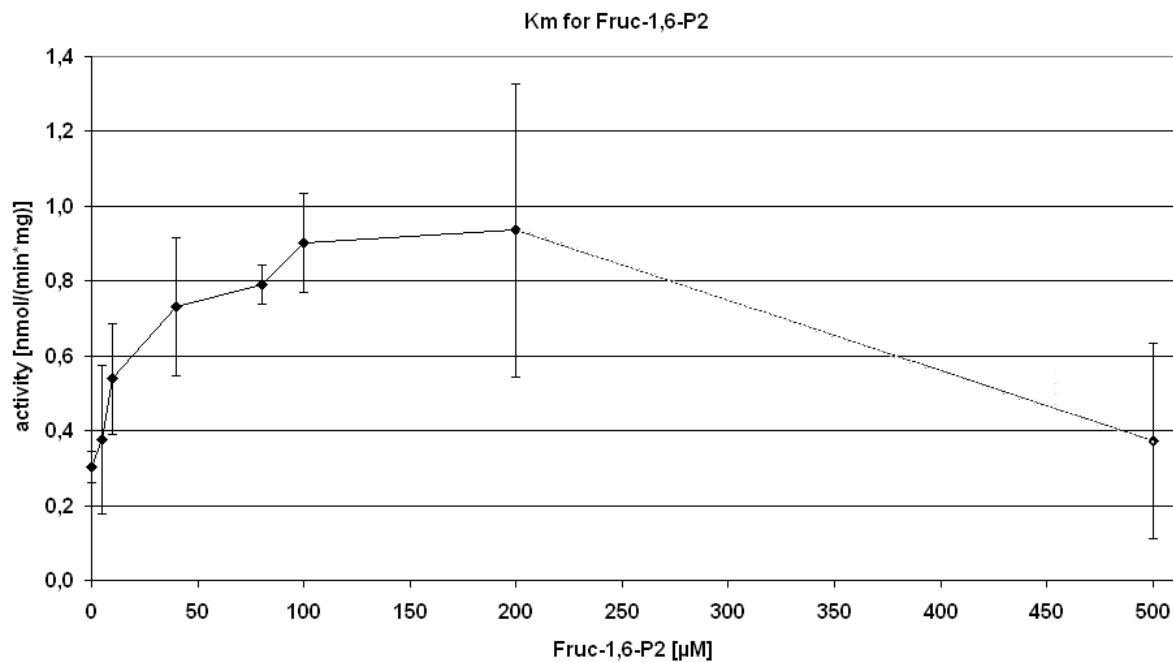


Abb. 6: Enzymatische Aktivität der FBPasen im Gesamtzellextrakt von *Phaeodactylum tricorutum*. Die niedrigen Aktivitätseinheiten resultieren aus der Berechnung der Aktivität, bezogen auf die Gesamtproteinkonzentration. Jede Messung wurde dreimal wiederholt ($n=3$), die Balken sind Standardabweichungen.

Die Behandlung erfolgte mit 50 mM DTT. Dies deutet darauf hin, daß einige FBPasen reduzierbar sind, wahrscheinlich die vorhergesagten FBPC2 und FBPC3. Bei der rekombinanten FBPC3 konnte dies durch die *in vitro* Reduktion gut gezeigt werden (Abbildung 4).

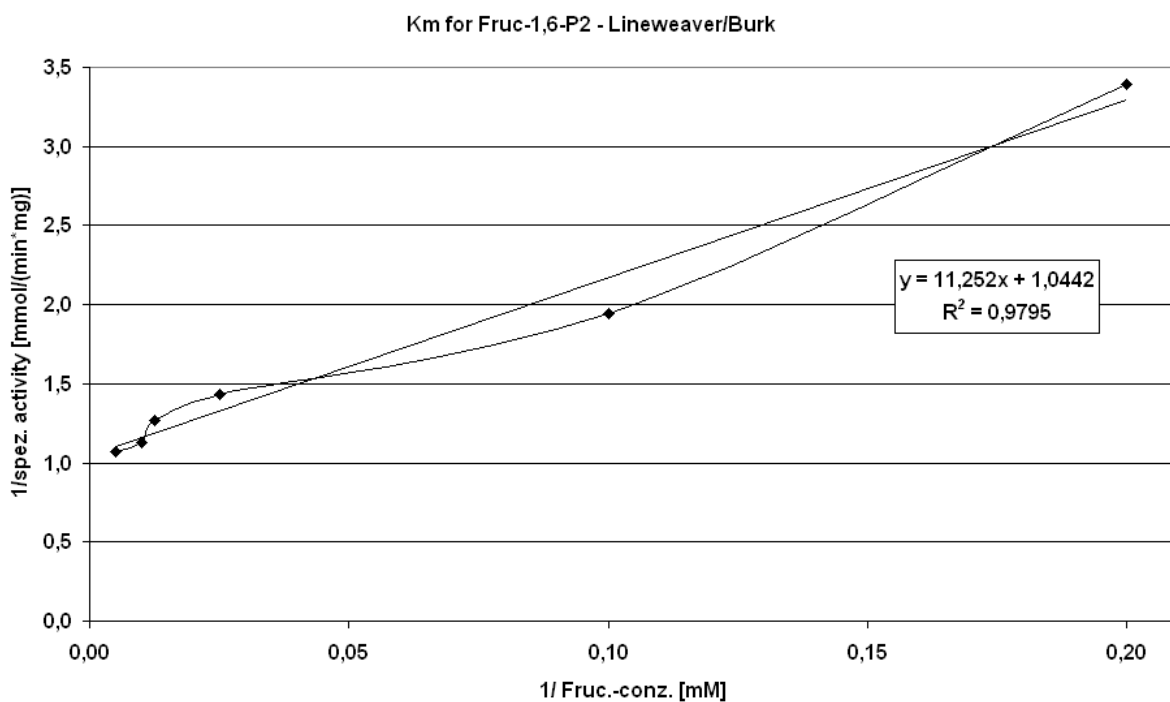


Abb. 7: Enzymatische Umsetzung von Fructose-1,6-Bisphosphat durch Fructose-1,6-Bisphosphatasen aus dem Gesamtzellextrakt von *Phaeodactylum tricornutum* als Lineweaver/Burk Berechnung (siehe Abb. 6). Jede Messung wurde dreimal wiederholt (n=3).

Wurden die FBPasen (C1, C2, C3, C4 und die cytosolische FBPase) nicht mit DTT reduziert, (Abbildung 10), war ein Aktivitätsverlust von fast 90% zu beobachten. Die plastidären FBPasen können durch Ca^{2+} inhibiert werden (Charles und Halliwell 1980), ähnlichen inhibierenden Effekt konnte auch bei dem Gesamtzellextrakt gemessen werden (Abbildung 10). Dort fiel die Aktivität um fast 60% ab, wenn die FBPasen mit 20 mM Ca^{2+} und gleichzeitig mit 50 mM reduziertem DTT behandelt wurden. Wenn der Überstand des Gesamtzellextraktes nach einer 20 minütigen Zentrifugation (20000 x g) mit 50 mM reduziertem DTT inkubiert und die Enzymaktivität gemessen wurde, fiel die Gesamtaktivität um etwa 80% ab (Abbildung 10).

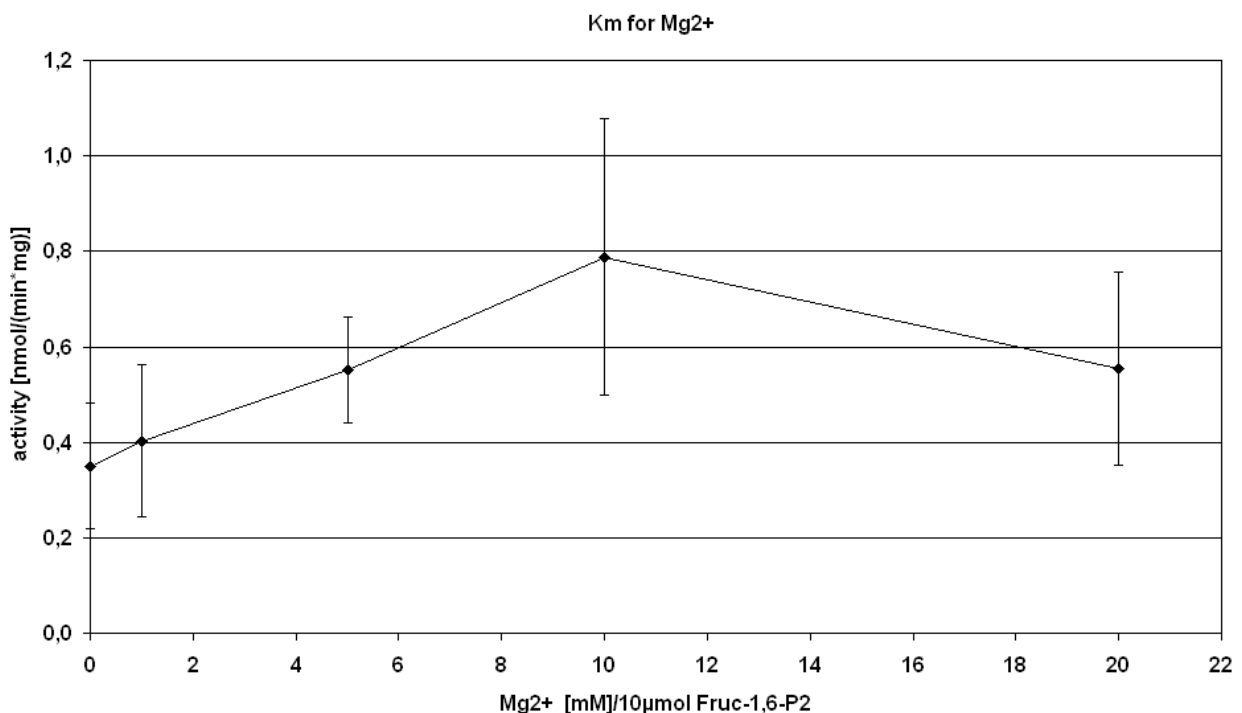


Abb. 8: Enzymatische Umsetzung von Fructose-1,6-Bisphosphat durch die FBPasen aus dem Gesamtzellextrakt von *Phaeodactylum tricornutum* bei verschiedenen Mg^{2+} Konzentrationen. Jede Messung wurde dreimal wiederholt (n=3), die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar.

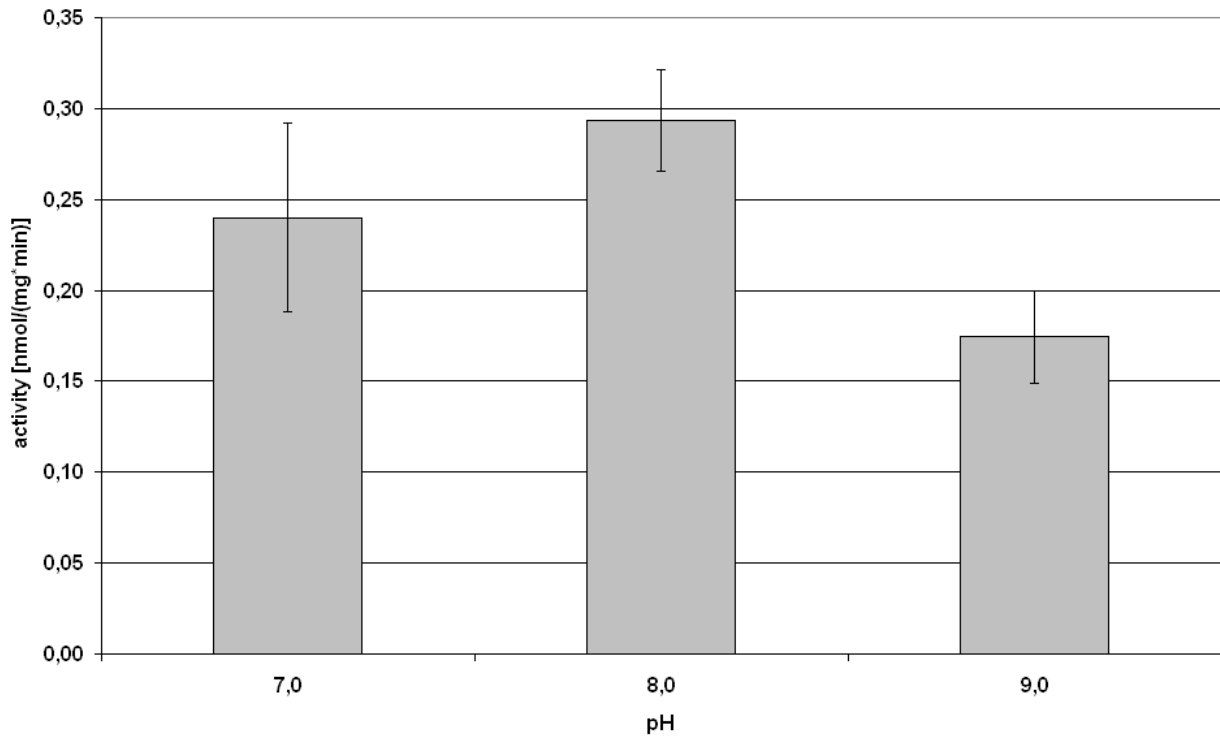


Abb. 9: Effekt der Enzymaktivität der Fructose-1,6-Bisphosphatasen aus dem Gesamtzellextrakt von *Phaeodactylum tricornutum* auf verschiedene pH Werte. Jede Messung wurde dreimal wiederholt ($n=3$), die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar.

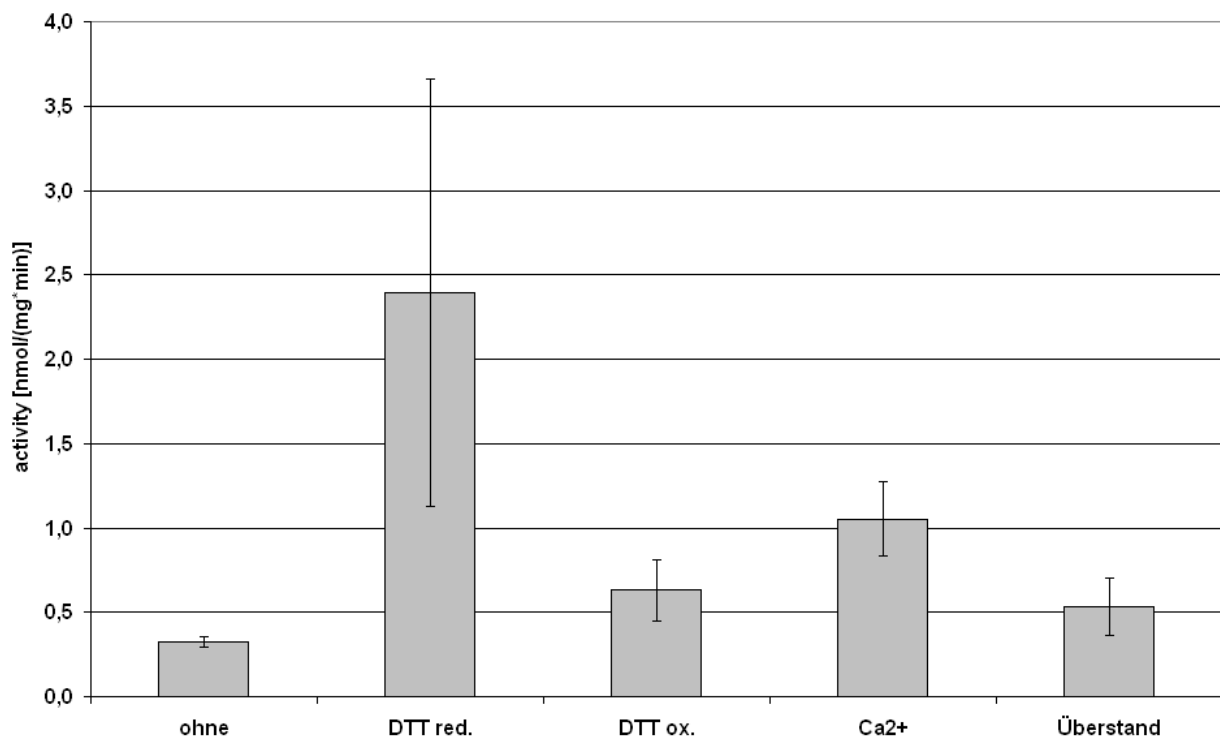


Abb. 10: Effekt der Enzymaktivität der Fructose-1,6-Bisphosphatasen (FBPase) aus dem Gesamtzellextrakt von *Phaeodactylum tricornutum* auf reduziertes und oxidiertes DTT, auf den Inhibitor Ca^{2+} für plastidäre FBPsasen und aus dem Überstand von zentrifugierten Gesamtzellextrakt. Jede Messung wurde dreimal wiederholt ($n=3$), bzw. sechsmal ($n=6$) bei der Behandlung mit reduziertem DTT. Die Fehlerbalken stellen Standardabweichungen dar.

2.4 Gentranskription Analyse der Calvin Zyklus Enzyme mit der Real-Time PCR

Proteine können unter anderem über die Transkriptionsrate des jeweiligen Gens reguliert werden (Martin *et al.* 2000). Um diesen möglichen Regulationsmechanismus von Enzymen in *P. tricornutum* zu untersuchen, wurden die mRNA bei verschiedenen Tageszeiten aus der *P. tricornutum* isoliert und per Transkriptase in cDNA umgeschrieben. Liegt für ein Gen viel cDNA vor, wurde die mRNA viel transkribiert. Damit verschiedene Gene in der Transkriptionsrate miteinander verglichen werden können, werden sie zu einer Transkriptionsrate eines Haushaltsgens (endogene Kontrolle) verrechnet. Saut *et al.* (2007) konnte zeigen, daß die endogene Kontrolle RPS (Ribosomales Bindeprotein) aufgrund der konstanten Transkriptionsrate (siehe Abbildung 14) als Haushaltsgen besonders gut eignet als Referenz-Gen zur Berechnung herangezogen zu werden. Es wurden die veröffentlichten Primer benutzt. Die Primer für die Real-Time PCR wurden auf ihre Efficiency getestet und nach Pfaffl (2001) ausgewertet (Tabelle 1). Die dazugehörenden Primer sind in Material und Methoden aufgeführt.

Tab. 1: Werte der Efficiency Berechnungen nach Pfaffl (2001). Die Protein Identitätsnummer (Prot ID) wird in der Tabelle angegeben; Prot IDs, welche mit Schrägstrich (/) angeben sind, haben verschiedene Splicevarianten der transkribierten mRNA.

Gen	Prot ID	Efficiency	Gen	Prot ID	Efficiency
FBPase	23247	1,878	PGL	31882	1,957
FBPC1	42886	1,969	PGDH	54663	1,999
FBPC2	42456	2,173	TKL	22135	2,140
FBPC3	31451	2,036	FTR	50907	2,131
FBPC4	54279	2,315	Trx F	46280	2,060
TKL	50819	1,980	Trx M	51357	1,912
TAL	20779	1,823	NTR	51055	1,950
TAL	50313	2,245	Trx H	56471	2,155
SBPase	9583	2,202	Trx H	48539	1,935
TAL	28222	2,176	RPS	10847	1,968
GPDH	54663	2,265	GAPDH	51128/51129	1,903
GPDH	22916	2,369			

Die obigen Efficiency Werte (Tabelle 1) wurden zur Berechnung der Transkriptionsraten der zu untersuchenden Gene nach Pfaffl *et al.* (2002) herangezogen.

Es wurden *P. tricornutum* Kulturen zu Datenerhebung gewählt, welche einen Tag- und Nacht Rhythmus von 16 zu 8 Stunden hatten. Es wurden zwei Werte bei Dunkelheit (4 Stunden vor Belichtung und 5 Minuten vor Belichtung) und zwei Werte bei Belichtung (4 Stunden und 8 Stunden seit Belichtungsbeginn) erhoben. Es wurden Proben aus drei unabhängig gewachsenen Kulturen herangezogen und gemessen. Die Werte bei 8 Uhr (5 min vor Belichtung) wurden zur Berechnung nach Pfaffl (2001) als Referenzwert 1 gesetzt und alle anderen Daten beziehen sich in ihrer Relation (relative Real-Time PCR) auf diesen Wert. Die Fehlerbalken in den einzelnen Diagrammen (siehe Abbildung 11, 12, 13, 14) sind Standardabweichung aus den drei berechneten Transkriptionswerten. Es wurden ausgesuchte Gene von dem reduktiven Pentose Phosphatweges (RPP) (FBPC1: 42886, C2: 42456, C3: 31451, C4: 54278, TKL: 50819, TAL: 20779, 50313) und von dem oxidativen Pentose Phosphatweges (OPP) (SBPase: 9583, TAL: 28222, GPDH: 22916, 54663, PGL: 31882, PGDH: 54663, 45333/26934, TKL: 22135) auf ihre Transkriptionsrate hin untersucht.

Aus Abbildung 11 ist keine allgemeine regelmäßige Zunahme oder Abnahme der Transkriptionsraten der plastidären Enzyme des RPP zu erkennen in Bezug auf Belichtung (weißer Balken) oder Dunkelheit (schwarzer Balken). Die cytosolische FBPase (23247) wurde als Vergleich zu den plastidären FBPasen in ihrer Transkriptionsrate zusätzlich untersucht.

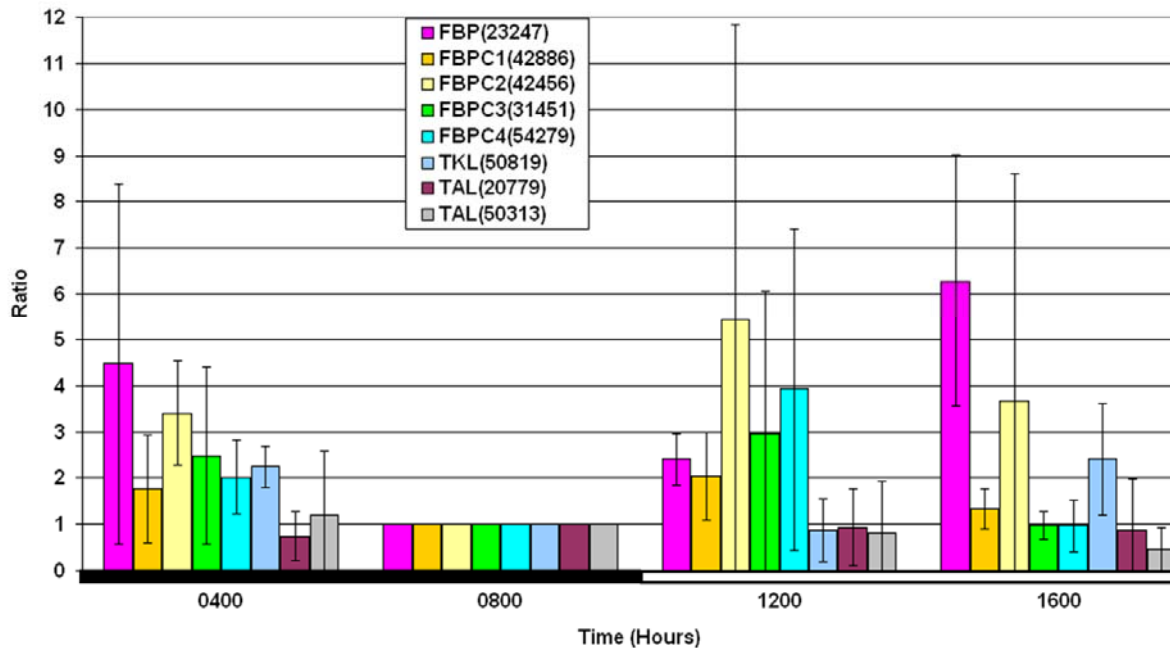


Abb. 11: Relative Genexpression von Calvin Zyklus Enzymen aus dem RPP analysiert mit der RT-PCR. Es wurden drei unabhängige Proben ($n=3$) bei verschiedenen Tag- (Zeitachse weiß) und Nacht-Zeiten (Zeitachse schwarz) geerntet. Die Probe um 8 Uhr morgens wurde als Referenzwert auf eins gesetzt und alle anderen Proben in ihrer relativen Expressionsrate beziehen sich auf den Referenzwert (Pfaffl 2001, Pfaffl *et al.* 2002). Die cytosolische FBPase gehört zur Glukoneogenese und wurde als Kontrast zu den plastidären FBPase mitbearbeitet. Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen.

Einige transkribierte Gene haben sehr große Standardfehlerbalken. Um 12 Uhr sind die Transkriptionsvarianzen der Gene am unregelmäßigsten, so ergeben sich hohe Fehlerbalken (siehe Abbildungen 9). Um 4 Uhr haben nur die Gene der FBPC2 (42456), der FBPC4 (54279) und der Transketolase (TKL, 50819) kleine Fehlerbalken. Diese Gene haben eine höhere Transkriptionsrate als um 8 Uhr. Um 12 Uhr haben nur die Gene der FBPase (23247) und FBPC1 (42886) einen kleinen Fehlerbalken. Diese Gene haben eine höhere Transkriptionsrate als um 8 Uhr. Um 16 Uhr haben die Gentranskriptionsraten der FBPC2 (42456), FBPC3 (31451), FBPC4 (54279) und der (TKL, 50819) kleine Fehlerbalken. Die meisten Gene haben eine kleinere Transkriptionsrate als um 8 Uhr, abgesehen von der TKL. Dieses Gen für die plastidäre TKL hat um 4 Uhr und um 16 Uhr die höchste Transkriptionsrate.

Bei den cytosolischen Enzymen des OPP (siehe Abbildung 12) ist keine gleichmäßige Zu- oder Abnahme der Transkriptionsraten in Bezug auf Belichtung (weißer Balken) oder Dunkelheit (schwarzer Balken) zu erkennen. Um 12 Uhr sind die Transkriptionsvarianzen der Gene am unregelmäßigsten und ergeben daher sehr

hohe Fehlerbalken (siehe Abbildungen 12). Um 4 Uhr haben die Transkriptionsraten der Gene der Seduheptulose-1,7-Bisphosphatase (SBPase, 9583), der TAL (28222), der Phosphogluconat Lactonase (PGL, 31882), der Gluconat-6-Phosphat-Dehydrogenase (GPDH, 54663) und der TKL (22135) kleine Standardfehler. Nur die SBPase hat eine kleinere Transkription als um 8 Uhr, die anderen Gene haben eine leicht höhere Transkriptionsrate als um 8 Uhr. Um 12 Uhr haben die Transkriptionsraten der Gene der SBPase, der PGL und der TKL kleine Standardfehler. Alle drei Gene haben eine 2 bis 3 fache höhere Transkriptionsrate als um 8 Uhr. Um 16 Uhr haben die Transkriptionsraten der Gene der SBPase, der GPDH (22916), der PGL und der 6-Phospho-Gluconolacton Dehydrogenase (PGDH, 45333/26934) kleine Fehlerbalken. Die Transkriptionsraten dieser Gene sinken gegenüber den Transkriptionsraten um 12 Uhr und sind teilweise unterhalb der Rate von 8 Uhr. Das Gen für die PGDH (45333/26934) kann mit zwei verschiedenen Möglichkeiten transkribiert werden. Einmal kann die PGDH (26934) im Cytosol lokalisiert sein oder im periplastidären Raum (pps, periplastidic space) (45333). Da die Primer für die Real-Time PCR in der Nukleotidsequenz des reifen Proteins ansetzen, kann zwischen beiden Formen hier nicht unterschieden werden. Um 12 Uhr ist die Standardabweichung aller Transkriptionswerte am größten, ähnlich wie bei den Transkriptionsraten der Gene des RPP (siehe Abbildung 11).

Bei den Enzymen Ferredoxin/Thioredoxin-Systems ist keine gleichmäßige Zu- oder Abnahme der Transkriptionsraten in Bezug auf Belichtung oder Dunkelheit zu erkennen (Abbildung 13). Um 12 Uhr sind die Transkriptionsvarianzen der Gene am unregelmäßigsten und ergeben daher sehr hohe Fehlerbalken (Abbildung 13). Um 4 Uhr haben die Transkriptionsraten der Gene der Thioredoxin Typ M (TrxM, 51357), der NADP abhängige Thioredoxin Reduktase (NTR, 51055), der cytosolischen Trx Typ H (TrxH, 56471) und der vermutlich periplastidären TrxH (48539) (Kapitel 1) kleine Standardfehler (Abbildung 13).

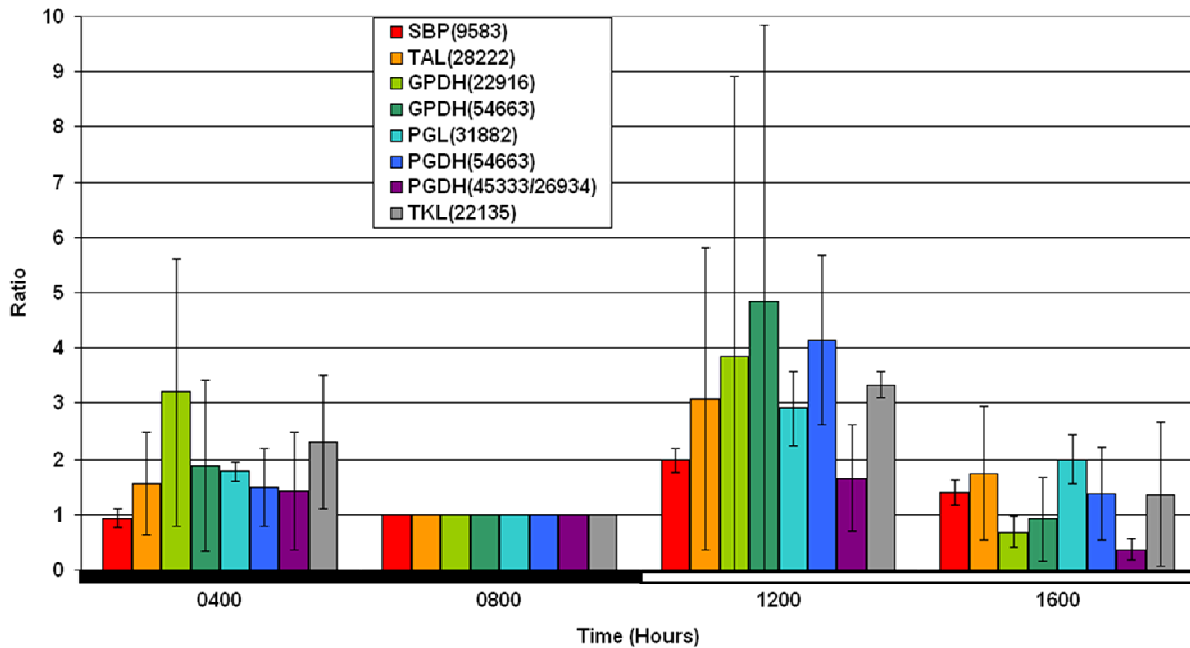


Abb. 12: Relative Genexpression von Calvin Zyklus Enzymen aus dem OPP analysiert mit der RT-PCR. Es wurden drei unabhängige Proben ($n=3$) bei verschiedenen Tag- (Zeitachse weiß) und Nacht-Zeiten (Zeitachse schwarz) geerntet. Die Probe um 8 Uhr morgens wurde als Referenzwert auf eins gesetzt und alle anderen Proben in ihrer relativen Expressionsrate beziehen sich auf den Referenzwert (Pfaffl 2001, Pfaffl *et al.* 2002). Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen.

Nur die NTR und die periplastidäre TrxH haben eine kleinere Transkriptionsrate als um 8 Uhr. Um 12 Uhr haben nur die Gene der NTR und der periplastidären TrxH eine Transkriptionsrate mit kleinem Standardfehler. Die NTR hat eine 2-fach höhere Transkriptionsrate als um 8 Uhr, die periplastidäre TrxH hat eine kaum höhere Transkriptionsrate als um 8 Uhr. Um 16 Uhr haben die Transkriptionsraten der Gene der Ferredoxin Thioredoxin Reduktase (FTR, 50907), der NTR und der beiden TrxHs kleine Standardfehler. Die FTR hat eine ähnliche Transkriptionsrate wie um 8 Uhr, die periplastidäre TrxH hat eine Transkriptionsrate unterhalb von der von 4 Uhr.

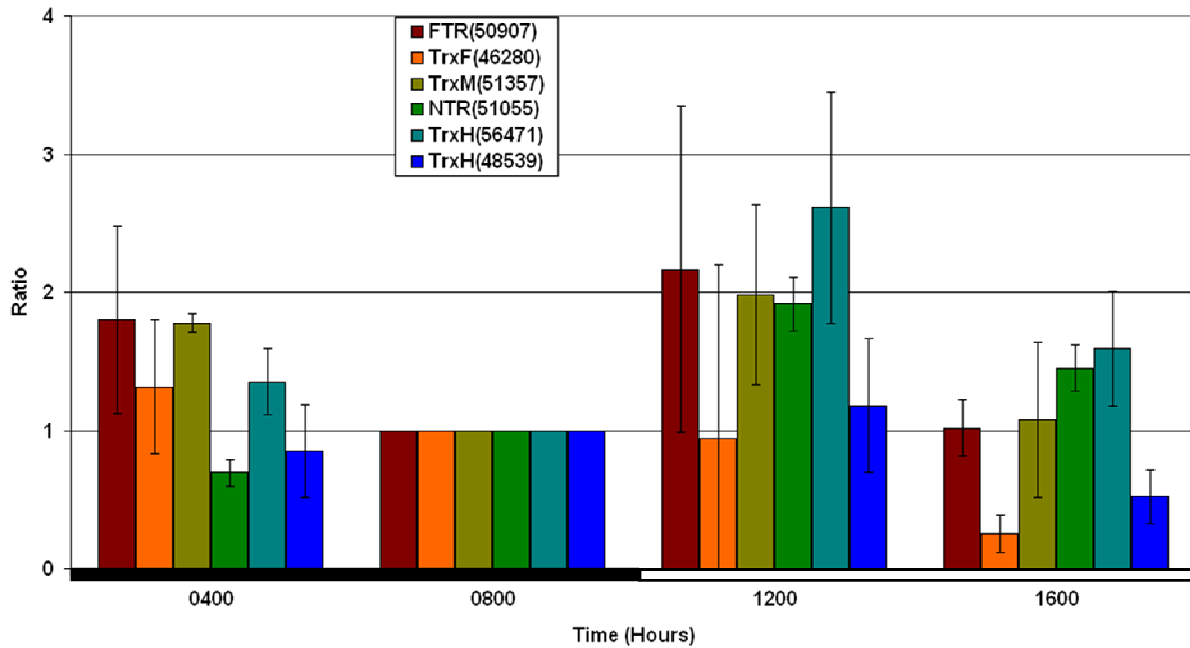


Abb. 13: Relative Genexpression von Thioredoxinen und deren Reduktasen analysiert mit der RT-PCR. Es wurden drei unabhängige Proben ($n=3$) bei verschiedenen Tag- (Zeitachse weiß) und Nacht-Zeiten (Zeitachse schwarz) geerntet. Die Probe um 8 Uhr morgens wurde als Referenzwert auf eins gesetzt und alle anderen Proben in ihrer relativen Expressionsrate beziehen sich auf den Referenzwert (Pfaffl 2001, Pfaffl *et al.* 2002). Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen.

Da die einzelnen Transkriptionsraten der Genen, aufgeschlüsselt nach Uhrzeiten, keine eindeutige Tendenz zeigen, ob sie in der Dunkelheit oder bei Licht höhere oder niedrigere Transkriptionsraten haben, wurden von den gesamten Genen die Mittelwerte der Ct Werte berechnet, ohne mit den Transkriptionsraten der endogenen Kontrolle verrechnet zu werden (Abbildung 15). Bei dieser Aufschlüsselung der Transkriptionsraten der Genen der RPP und OPP Enzymen und der Ferredoxin/Thioredoxin-Systeme nach maximalen und minimalen Transkriptionswerten (Abbildung 15), sind diese Enzyme in ihrer Ct Value wesentlich höher (über 25), als ihre Referenz-Gene RPS (Siaut *et al.* 2007) und GAPDH. Nach der Definition von Siaut *et al.* (2007) sind Gene schwach exprimiert, wenn ihre Ct Werte über 25 liegen. Stark exprimierte Gene haben einen Ct Werte unter 25.

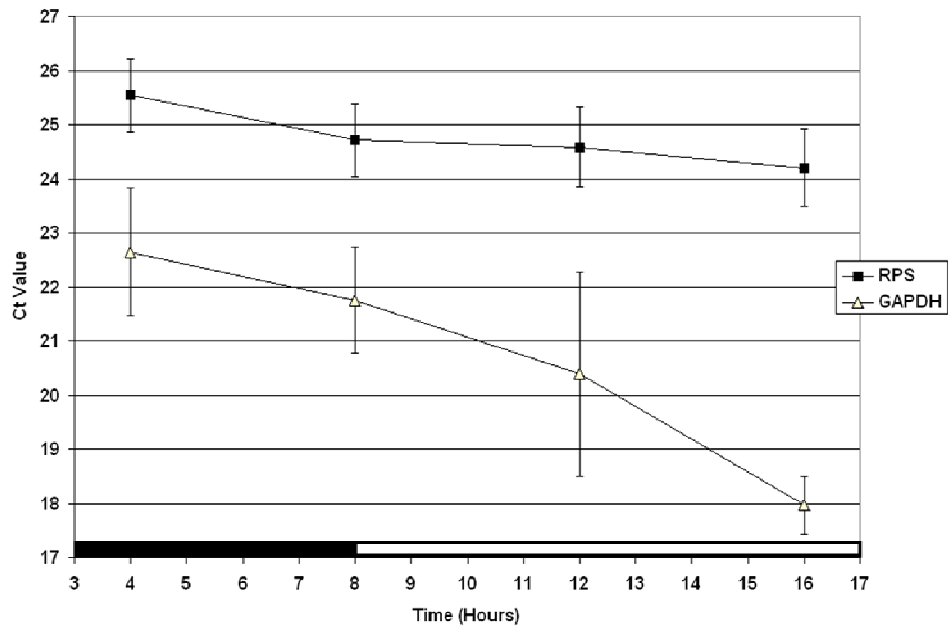


Abb. 14: Expressionslevel von Haushaltsgenen RPS (10847) und GAPDH (51128/51129). Die GAPDH wird mit doppelter ID angegeben, weil die Primer cDNA zweier verschiedene Gene amplifizieren können. Es wurden drei unabhängige Proben (n=3) bei verschiedenen Tag- (Zeitachse weiß) und Nacht-Zeiten (Zeitachse schwarz) geerntet. Alle Gene wurden mit RPS (Siaut *et al.* 2007) als endogene Kontrolle in der relativen Expression berechnet (Pfaffl 2001, Pfaffl *et al.* 2002). Die Fehlerbalken sind Standardabweichungen.

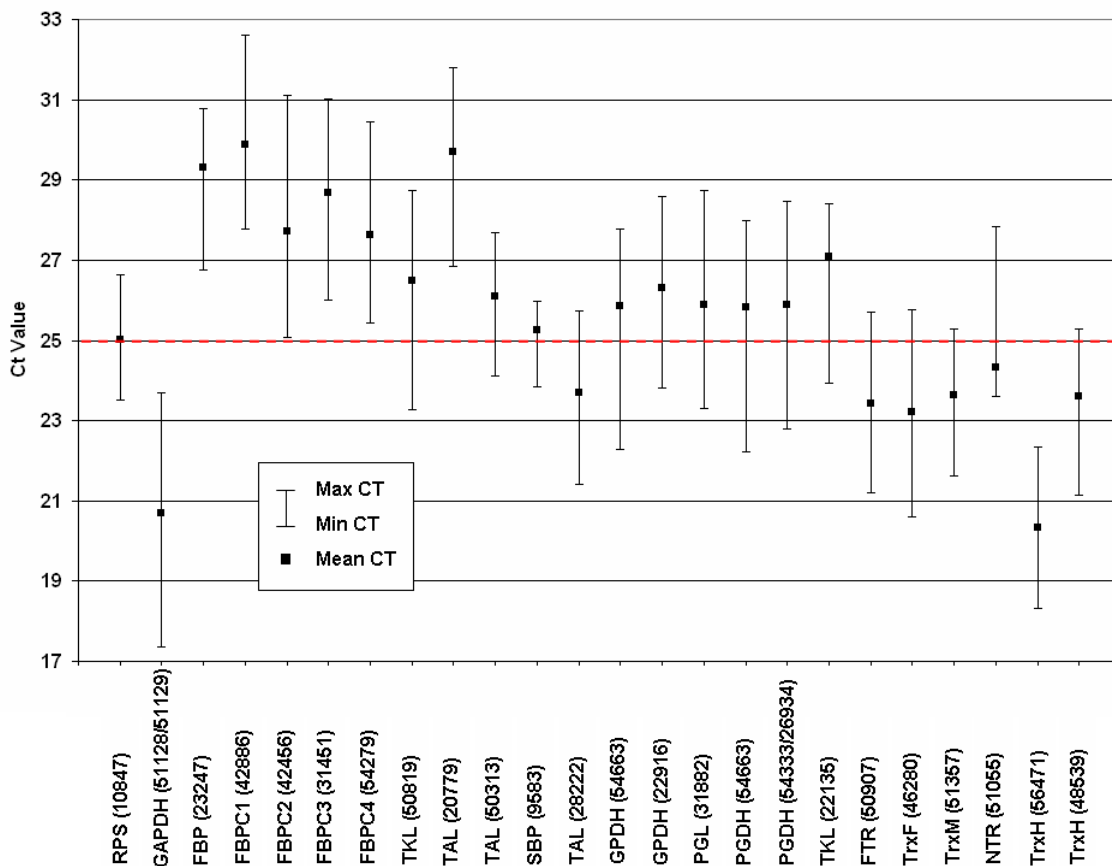


Abb. 15: Expressionslevels der RPP und OPP Gene, sowie der Thioredoxine und Thioredoxin Reduktasen. Es sind die Ct Werte der Gentranskription von allen erhobenen Zeitpunkten angegeben,

welche alle auf den gleichen threshold sich beziehen. Sie wurden alle zusammen genommen und der Mittelwert (Mean CT) aufgetragen. Die maximale (Max CT) und die minimale (Min CT) Transkriptionsrate (keine Fehlerbalken) wurden ebenso aufgetragen. Die rote Linie ist die Trennung zwischen stark exprimierten Gene (<25 Ct Value) und schwach exprimierten Gene (>25 Ct Value) (Siaut *et al.* 2007).

Haushaltsgene haben nur eine kleine Varianz in ihrer Transkriptionsrate (siehe Abbildung 15) (Siaut *et al.* 2007), wenn die zu untersuchenden Gene ähnliche Varianzen in der Transkriptionsrate wie die Haushaltsgene haben, werden sie eher gleichmäßig transkribiert. Eine große Ct Wert Differenz in der Transkriptionsrate deutet auf regulierte Transkription des Gens hin. Bei den Genen der RPP und OPP Enzymen sind die Varianzen der Transkription ähnlich klein wie die der endogenen Kontrollen (siehe Abbildung 15). Außerdem sind die Transkriptionsraten der Gene der RPP und OPP Enzyme über eine Ct Value von 25, d.h. sie sind schwach transkribierte Gene. Die Gene der Thioredoxine und deren Reduktasen sind nach Siaut *et al.* (2007) stark transkribiert. Ebenso sind ihre Varianzen der Transkription ähnlich klein, wie die der Haushaltsgene, d.h. sie sind auch konstitutiv transkribiert.

3. Diskussion

3.1 Enzymassay

Obwohl die rekombinante FBPC3 *in vitro* reduziert werden konnte, war das Protein enzymatisch nicht aktiv. Dies könnte zuerst an einer falschen Faltung des Proteins liegen, aber die Cysteine der regulatorischen Einheit waren in der Tertiärstruktur im richtigen Abstand zueinander, da sie eine intramolekulare Disulfidbrücke bilden konnten. Auffällig war aber auch, dass nicht nur die FBPC3 Inclusionbodies bildete, sondern auch die anderen plastidären FBPasen (C1: 42886, C2: 42456, C4: 54279) komplett nur als Inclusionbodies in der Zelle ausfielen. Kann dies eventuell ein Hinweis darauf sein, daß die FBPasen mit anderen Calvin Zyklus Proteine stabile Komplexe bilden (Süss *et al.* 1993)? Häufig haben die Enzyme des Calvin Zyklus membranintegrierte Bereiche im Thylakoid (Teige *et al.* 1998).

Die FBPase liegt bei Pflanzen als Homotetramer (Marcus und Harrisch 1990) vor. Es kann sein, daß die vier plastidären FBPC1-C4 unter sich ein Heterotetramer bilden, so wie die GAPDH-A und GAPDH-B untereinander ein A₂B₂-Heterotetramer bilden können (Martin *et al.* 2000). Der Enzymassay von dem Gesamtzellextrakt aus *P. tricornutum* gibt nicht die einzelnen Werte der jeweiligen FBPase aus dem Plastiden

wieder. Außerdem kann in diesen Messungen die cytosolische FBPase auch enzymatisch mitreagieren. Von der cytosolischen FBPase abgesehen, ist aber das enzymatische Zusammenwirken der vier plastidären FBPasen in dem Stroma wichtig. So können sich die zwei Gruppen (Gruppe 1: C2 und C3 gegen Gruppe 2: C1 und C4) der FBPasen gegenseitig in ihrer Aktivität ergänzen. Gruppe 1 ist wohl reduzierbar, zumindest die FBPC3 (Abbildung 3), und kann theoretisch durch das TrxF reduziert und aktiviert werden. Die plastidären FBPasen werden hauptsächlich durch TrxF reduziert (Hermoso *et al.* 1999, Martin *et al.* 2000), aber nur schlecht durch TrxM (Nishizawa und Buchanan 1981). So bindet bei einer FBPase-Affinitätschromatographie Säule nur TrxF (Buc *et al.* 1984). Die FBPasen der Gruppe 2 können nicht durch Trx reduziert werden, da ihnen die notwendigen Cysteine fehlen (Kapitel 1). Dass die beiden Gruppen eine unterschiedliche Reaktion auf Reduktionsmittel haben, zeigt Abbildung 8. Durch Reduktionsmittel kann die Gesamtaktivität um mehr als 70% gegenüber oxidierten FBPasen angehoben werden. Ein Indiz für die Aktivierbarkeit der FBPase Gruppe 1 durch Thioredoxin ist u.a. durch den *in vitro* Reduktionstest von der rekombinanten FBPC3 gezeigt worden. Die Art von Reduzierung (durch TrxF oder durch DTT) der FBPasen zeigt den Unterschied zwischen der plastidären, aktivierbaren FBPase und der cytosolischen und nicht durch DTT oder TrxF aktivierbaren FBPase (Nel und Terblanche 1992). Wenn der Gesamtzellextrakt nicht mit Reduktionsmitteln behandelt wird, ist die Aktivität bezogen zu der reduzierten Probe um mehr als 85% geringer. Eine gewisse Grundaktivität ist auch bei oxidierten FBPasen vorhanden (Jacquot *et al.* 1997). Wenn die FBPasen mit dem zweiwertigen Ion Ca^{2+} inkubiert werden, sinkt die Enzymaktivität um fast 60% gegenüber den reduzierten FBPasen. Ebenfalls vollständig inhibierend wirkt bei den plastidären FBPasen in Spinat das Ca^{2+} schon mit einer Konzentration von 500 μM (Charles und Halliwell 1980). Dies zeigt, dass in dem Enzymassay auch wirklich die plastidären FBPasen gemessen wurden (Kelly *et al.* 1982). Dass Ca^{2+} die FBPase so stark inhibieren kann, wird dadurch erklärt, daß das freie Ca^{2+} in den Chloroplasten ebenfalls einen regulativen Einfluss auf die FBPase in Abhängigkeit der Belichtung hat (Nel und Terblanche 1992). Bei der plastidären FBPase konnte gezeigt werden, daß sie nicht durch 2 mM AMP inhibiert werden wie die cytosolischen FBPasen in Pflanzen (Buchanan *et al.* 1971, Preiss *et al.* 1967, Tejwani 1983), sondern eher nur durch das Ferredoxin/Thioredoxin System reguliert werden (Buchanan *et al.* 1979, Marcus *et al.*

1988, Martin *et al.* 2000). Auch der Cofaktor Mg^{2+} kann bei zu hoher Konzentration *in vitro* inhibierend auf die FBPase wirken, normalerweise bewirkt der Cofaktor eine Konformationsänderung bei der FBPase, so dass sich das Substrat besser an das Enzym anlagern kann (Meunier *et al.* 1981). Ein zu großer Temperaturunterschied während der enzymatischen Messung wirkt sich auf die cytosolische FBPase inhibierend aus. Der plastidären FBPase scheint ein großer Temperaturunterschied keine Rolle zu spielen (Weeden und Buchanan 1983). Um den enzymatischen Umsatz der FBPasen zu ermitteln, wurde die Reduktion von $NADP^+$ zu $NADPH$ photospektrometrisch gemessen (Kelly *et al.* 1982, Nishizawa *et al.* 1982) (Abbildung 5).

Nach Zentrifugation des Gesamtzellextrakts konnte im Überstand nur noch eine 20%ige Aktivität gemessen werden. Dies bedeutet, daß die vermeintlich löslichen FBPasen sich dann größtenteils im Pellet befinden. Entweder können die FBPasen in den Plastiden mit anderen Proteinen des Calvin Zyklus Komplexe gebildet haben (Süss *et al.* 1993) oder sie binden komplexiert über ein anderes Protein an die Thylakoidmembran (Teige *et al.* 1998). Der optimale pH Wert von 8,0 (Abbildung 7) liegt im gleichen Bereich wie bei plastidären FBPasen aus anderen getesteten Organismen, diversen Algen (*Chlamydomonas reinhardtii*) und aus *Spinacia oleracea* (Fujita und Freese 1979, Nel und Terblanche 1992, Nishizawa und Buchanan 1981). Es konnte gezeigt werden, daß das reduzierte TrxF von Spinat die beste Aktivierungsrate bei pH 7,5 hat und die Aktivierungsrate schon bei pH 8,0 wieder abnimmt (Nel und Terblanche 1992). Deswegen wurde zur Reduzierung der plastidären FBPasen von *P. tricornutum* der pH-Wert in der Präinkubationsansätzen bei 7,5 gewählt. Der K_M von den vier plastidären FBPasen aus *P. tricornutum* mit 10 μM entspricht in etwa der K_M von 6 μM bei einer vollständig reduzierten plastidären FBPase aus *Spinacia oleracea* (Cadet und Meunier 1988, Gontero *et al.* 1984a, 1984b). Mit den plastidären FBPasen, besonders der durch Ferredoxin/Thioredoxin System regulierten, konnte gezeigt werden, daß eine *in vitro* Aktivierung durch DTT (Pradel *et al.* 1981), Mg^{2+} und Fruktose-1,6-Bisphosphat nicht so effektiv ist, als eine Aktivierung durch TrxF (Gontero *et al.* 1984a und 1984b). Die *in vitro* Aktivierung der FBPase nur durch DTT ist recht langsam, wenn nun gleichzeitig Mg^{2+} und das Substrat (falls Ca^{2+} gleichzeitig anwesend ist) dazugegeben wird, verkürzt sich die Aktivierungszeit der FBPase mit DTT (Nel und Terblanche 1992). Das Substrat (Fruktose-1,6-Bisphosphat) selber ist in zu hoher

Konzentration von etwa 2 mM für die cytosolische FBPase inhibierend (Taketa und Pogell 1965), nicht aber für plastidäre FBPasen (Zimmermann *et al.* 1976).

Insgesamt sollte die Enzymkinetik der plastidären FBPasen aus aufgereinigten Plastiden (Murata *et al.* 1979) von *P. tricornutum* wiederholt werden. Vielleicht sind dann die einzelnen plastidären FBPasen über eine Ionen-Austausch Chromatographie zu trennen (Martin *et al.* 2000).

3.2 Transkriptionsraten der Enzyme von RPP und OPP und der Thioredoxine

Von wichtigen Enzymen des reduktiven Pentose Phosphatweges (FBPase, TKL und TAL) und des oxidativen Pentose Phosphatweges (SBPase, TAL, GPDH, PGL, PGDH und TKL) von der *Phaeodactylum tricornutum* wurde die Transkriptionsrate des jeweiligen Gens untersucht. Hier fällt auf, daß die Enzymgene keine Änderung in der Transkriptionsrate haben, wenn *P. tricornutum* belichtet wird oder nicht. Die SBPase von *Thalassiosira pseudonana* hatte auch bei anderen Kulturbedingungen mit Starklicht und Schwachlicht, sowie bei verschiedenen Stickstoff-Ressourcen keine signifikante Transkriptionsänderung (Parker und Armbrust 2005). Die hohen Fehlerbalken der Standardabweichung sind bei den Werten von 12 Uhr am größten. Dies deutet auf große Transkriptionsratenänderung im Kern hin. Dagegen hat die endogene Kontrolle, die RPS, bei diesen Zeiten sehr niedrige Schwankungen (Siaut *et al.* 2007). Ähnlich hohe Schwankungen in der Transkriptionsrate, wie die Enzyme der RPP und OPP, hat die große Untereinheit der RUBISCO von *P. tricornutum* (Wawrik *et al.* 2002); hier ist aber klar zu erkennen, daß die RUBISCO in ihrer Transkriptionsrate lichtgesteuert ist. Im Übergang vom Dunkeln zur Lichtphase nimmt die Transkriptionsrate zu und fällt dann wieder ab. Im Gegensatz zu den kernkodierten Genen der RPP und OPP, ist die RUBISCO auf dem Plastidengenom kodiert. Dieses Plastidengenom stammt von dem aufgenommenen Cyanobakterium in der ersten Endocytobiose ab. Es muß weiter untersucht werden, ob 4 Stunden nach Belichtungsanfang eine Ummodifizierung der Transkriptionsraten der verschiedenen benötigten Gene stattfindet. Die Enzyme der OPP und RPP werden durch verschiedene Systeme (siehe Kapitel 1) teilweise reguliert. Die FBPasen der RPP können teilweise durch die TrxF, evtl. auch durch TrxM reguliert werden. Es wurde deshalb auch die Transkriptionsraten der TrxF und M und deren Reduktase untersucht, ebenfalls wurden zwei TrxH (eine cytosolische und eine im pps, siehe Kapitel 1) und deren Reduktase als Kontrolle zur plastidären

Trx-System untersucht. Es konnte auch hier festgestellt werden, daß diese Regulorenzyme eine konstante Transkriptionsrate haben, egal ob sie im Cytosol oder im Plastid lokalisiert sind.

Bei der Auftragung der Transkriptionsraten der Enzyme des RPP und OPP, sowie der Regulatorproteine nach den Ct Werten (Siaut *et al.* 2007), verrechnet mit den Efficiency Werten (Pfaffl 2001, Pfaffl *et al.* 2002) (siehe Abbildung 13) lässt sich klar ablesen, daß die Calvin Zyklus Enzyme in Hinblick zu den endogenen Kontrollen (RPS, bzw. GAPDH) ähnlich kleine Transkriptionsraten haben. Dies bedeutet, daß die RPP und OPP Enzyme wie die Haushaltsgene konstant und lichtunabhängig transkribiert werden. Dies bestätigt nun auch die Ergebnisse von Parker und Armbrust (2005) mit der SBPase aus *Thalassiosira pseudonana*. Dort wurde aber noch angenommen, daß die SBPase im Plastid lokalisiert ist und physiologisch zur RPP, und nicht zur OPP gehört (siehe Kapitel 1). Durch die endocytobiotische Aufnahme eines Cyanobakterium in einer heterotrophe Wirtszelle (Keeling 2004, Keeling *et al.* 2004), wurden viele Gene vom cyanobakteriellen Genom in den Genom des Wirtszellenkerns transferiert (Martin und Schnarrenberger 1997). Einige plastidäre Gene (GAPDH, FBA, TPI, FBPase und SBPase), die ursprünglich von dem aufgenommenen Cyanobakterium stammen, wurden durch die Wirtszelle ersetzt (Bhattacharya *et al.* 2007, Keeling 2004, Keeling *et al.* 2004). Die „neuen“ Calvin Zyklus Enzyme sind wie die cytosolischen Iso-Enzyme kaum noch in der Transkriptionsrate lichtgesteuert, sondern nur noch über anaerobe Bedingungen (Kennedy *et al.* 1992, Martin *et al.* 2000, Sachs 1994).

Im Allgemeinen läßt sich aussagen, daß die Enzyme des Calvin Zyklus nicht auf der Ebene der Gene durch die Transkriptionsrate reguliert werden, sondern eher auf der Ebene der Proteine. Dies zeigt sich auch, daß einmal die FBPC3 durch DTT reduziert werden kann, bzw. der FBPase Assay in der Aktivität ebenfalls durch DTT an Aktivität zunimmt. Oesterhelt *et al.* (2007) diskutieren sogar, daß die plastidären FBPasen nachts nicht vollständig ihre Aktivität verlieren dürfen, weil sonst dem OPP wichtige Triosezucker fehlen. Bei *P. tricornutum* und *T. pseudonana* ist der cytosolische OPP auch auf Triosezucker aus dem Plastid angewiesen.

Diskussion

Der reduktive Pentose Phosphatweg (reductive Pentose Phosphate Pathway, RPP) ist in den Plastiden und der oxidativer Pentose Phosphatweg (oxidative Pentose Phosphate Pathway, OPP) im Cytosol bei *Phaeodactylum tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana* lokalisiert (siehe Kapitel 1), sehr wahrscheinlich auch bei *Odontella sinensis* (Michels *et al.* 2005). Diese räumliche Anordnung, bzw. Trennung des RPP und OPP unterscheidet sich zu Landpflanzen (Martin *et al.* 2000). Der physiologische Vorteil dieser Aufteilung in den Diatomeen kann der Substrat- und Produkt-Gradient von Triosephosphatzucker (D-Glycerinaldehyd-3-Phosphat, 3-PGA) sein, da dadurch nur eine geringe Produkthemmung im Stroma an der RUBISCO (Portis *et al.* 1986, Portis 1990) vorliegen kann. Dieser Triosephosphatzucker wird sofort über die 4 plastidären Hüllmembranen mittels Triosephosphat-Translokator nach außen ins Cytosol geschleust (Eicks *et al.* 2002, Wilhelm *et al.* 2006, Wittpoth *et al.* 1998). Die RUBISCO ist für den gesamten Calvin Zyklus das wichtigste Enzym und macht bis zu 50% der im Stroma vorkommenden Enzyme aus (Kapralov und Filatov 2007). Durch die hohe Proteinkonzentration wird die langsame kinetische Reaktion der RUBISCO ausgeglichen (Roy und Andrews 2000). Es fixiert stromales CO₂ (Read *et al.* 1994), aber nur wenn es in ausreichender Konzentration gegenüber O₂ vorliegt (Roy und Andrews 2000). Um eine optimale Carboxylierungsrate von RUBISCO in den Diatomeen-Plastiden zu erhalten, müssen alle inhibierenden Faktoren, wie 3-PGA, minimiert sein und eine hohe CO₂-Konzentration vorliegen (Roberts *et al.* 2007). Trotzdem kann die Oxygenase Aktivität der RUBISCO nicht gänzlich verhindert werden (Roberts *et al.* 2007). Die Diatomeen assimilieren das gelöste CO₂ aus dem Wasser. Das Kohlendioxid hat in Wasser einen geringen Diffusionskoeffizient, welches sich auf die Aufnahme in die Diatomeen auswirkt (Roberts *et al.* 2007). Daher sind in den Diatomeen verschiedene Aufkonzentrierungsreaktionen (Kohlenstoff Konzentrationsmechanismen, C concentrating mechanisms, CCM) des CO₂ vorhanden, um eine kontinuierlich hohe CO₂-Konzentration um die RUBISCO zu erreichen (Kroth *et al.* 2007, Roberts *et al.* 2007). So können Diatomeen aktiv CO₂ und HCO₃⁻ aufnehmen (Giordano *et al.* 2005) und in der Zelle akkumulieren (Rotatore und Colman 1992). In Diatomeen existiert u.a. die β -Carboanhydrase (β -CA) (Tanaka *et al.* 2005), welche CO₂ in HCO₃⁻ umwandelt und im CCM involviert sind (Satoh *et al.* 2001). Nur eine β -

Carboanhydrase ist in den Plastiden von *P. tricornutum* lokalisiert (Satoh *et al.* 2001), in *T. pseudonana* fehlt sie (Kroth *et al.* 2007). Neben der β -CA sind noch α -CA vorhanden, welche alle eine Präsequenz haben. Teilweisen sind sie u.a. im periplastidären Raum lokalisiert (Szabo und Colman 2007). Der periplastidäre Raum (periplastidic space, pps) ist zwischen der zweiten und dritten plastidären Membran lokalisiert (Kroth 2002) und ist das ehemalige Cytosol der in der zweiten Endocytobiose aufgenommene Rotalge durch eine eukaryotische Wirtszelle (Keeling *et al.* 2004). Wenn Fusionsproteine zwischen Präsequenzen (Signal- und Transitpeptid eines Proteins) und eGFP punktförmige Fluoreszenzen im, bzw. an den Plastiden erzeugen, werden als „blob like structure“ bezeichnet (Kilian und Kroth 2005). Diese „blob like structures“ könnten auch im periplastidären Raum lokalisiert sein (Gould *et al.* 2006b).

Im Gegensatz zu *T. pseudonana*, konnte nur in *P. tricornutum* eine PGDH (6-Phospho-Gluconolacton Dehydrogenase) auf dem Genom identifiziert werden (siehe Kapitel 1). Bei der enzymatischen Reaktion dieses Enzyms würde im pps CO_2 freigesetzt. Dieses CO_2 könnte dann durch eine α -CA in HCO_3^- umwandelt und so kann der Kohlenstoff durch einen CCM aufkonzentriert werden. Im Cytosol würde das durch die PGDH im OPP freigesetzte CO_2 frei diffundieren und evtl. durch CA in HCO_3^- umwandelt. So könnten alle enzymatisch freigesetzten CO_2 wieder recycelt werden. Die Diatomeen wenden verschiedene Mechanismen an, um das CO_2 und HCO_3^- in der Zelle in einer hohen Konzentration vorhanden zu haben. Dies könnte evtl. auch ein evolutiver Grund sein, weswegen der RPP (CO_2 fixierender Teil) und OPP (CO_2 abgebender Teil) getrennt lokalisiert sind. Die Carboanhydrasen können wahrscheinlich durch Thioredoxin reguliert werden (Marchand *et al.* 2006). Dies würde indirekt über die CO_2 Konzentration die RUBISCO und dadurch auch den gesamten Calvin Zyklus in der Aktivität regulieren können.

Ob der RPP und OPP gleichzeitig ablaufen, bzw. reguliert werden, konnte in dieser Arbeit nur teilweise nachgewiesen werden (Kapitel 1). Es sind viele Regulatorprotein-Systeme vorhanden, wie sie auch in höheren Pflanzen vorkommen zum Beispiel Ferredoxin/Thioredoxin-System, Glutaredoxine und Glutathion. Diese sind in beiden Diatomeen *T. pseudonana* und *P. tricornutum* vorhanden. In *P. tricornutum* sind neben zwei vermutlich durch Thioredoxin F regulierbaren (Jacquot *et al.* 1997, Hermoso *et al.* 1999) plastidären FBPasen noch zwei nicht regulierbare plastidäre FBPasen (siehe Kapitel 1) vorhanden (in *T. pseudonana* sind nur zwei

vermutlich nicht-regulierbar plastidäre FBPasen vorhanden). Nur in *T. pseudonana*, aber nicht in *P. tricornutum*, konnte noch zusätzlich ein Gen für ein CP12 ähnliches Protein identifiziert werden (Boggetto *et al.* 2007). Das CP12 Protein kann nur in einem Arm Disulfidbrücken bilden (siehe Kapitel 1) und scheint dadurch enzymatisch nicht zu funktionieren. In den Diatomeen *T. pseudonana* und *P. tricornutum* sind die PRK, GAPDH durch das Thioredoxin F oder Thioredoxin M nicht aktivierbar. Dadurch ist der plastidäre RPP in beiden Diatomeen wahrscheinlich nur teilweise regulierbar, bzw. im Dunkeln deaktivierbar, das Ferredoxin/Thioredoxin-System scheint zur Regulierung des Calvin Zyklus eine untergeordnete Rolle zu spielen (Wilhelm *et al.* 2006). Die FBPasen in der Erbse und der Rotalge *Galdieria sulphuraria* haben auch im oxidierten Zustand noch eine sehr geringe Grundaktivität (Jacquot *et al.* 1997, Reichert *et al.* 2003). Eine komplette Deaktivierung des RPP im Plastid hätte zur Folge, daß keine Triosephosphatzucker in das Cytosol transportiert werden können (Oesterhelt *et al.* 2007). Ob im Dunkeln der plastidäre RPP in den Diatomeen *P. tricornutum* und *T. pseudonana*, bzw. auch in *O. sinensis* eine gewisse Grundaktivität besitzt, müsste weiter untersucht werden. Eine Regulation des RPP über die Gentranskription konnte nicht bestätigt werden. Zwar ist die Gentranskription der RUBISCO bei *P. tricornutum* diurnal gesteuert (Wawrik *et al.* 2002), die restlichen kernkodierten Gene der RPP und auch der OPP werden konstitutiv transkribiert (siehe Kapitel 3), so auch die cytosolische SBPase (Seduheptulose-1,7-bisphosphatase) bei *T. pseudonana* (Parker und Armbrust 2005). Hier könnte weiter nach genetischen Ursachen gesucht werden, die verantwortlich sind, daß die Transkription für die Gene der RUBISCO diurnal gesteuert ist und die Gene der restlichen Enzyme des Calvin Zyklus konstitutiv transkribiert werden. Vielleicht gibt es einen Zusammenhang mit den kernkodierten, konstitutiv transkribierten Genen und den auf dem Plastidengenom kodierten, diurnal transkribierten Genen. Teilweise wurden ursprünglich plastidär kodierte Gene auf dem Genom der Wirtszelle durch homologe Gene des Wirtes ersetzt (Wilhelm *et al.* 2006). Der cytosolische OPP ist in den Diatomeen *P. tricornutum* und *T. pseudonana* nicht regulierbar und somit dauerhaft aktiv. In langen Dunkelphasen können Diatomeen durch Oxidation von Fettsäuren ATP für Stoffwechselwege (z.B. Glukoneogenese) gewinnen (Armbrust *et al.* 2004). Der OPP regeneriert die NADPH als Reduktionsmittel, bzw. als e/H-Überträger. Hier wären Transkriptionsanalysen mit Microarray unter verschiedenen

Kultivierungsbedingungen sinnvoll. So könnten evtl. verschiedene Transkriptionslevels von Calvin Zyklus Enzymen aufgeschlüsselt werden.

Bei dem Schutz der Algenzellen vor Sauerstoffradikalen reduzieren Peroxiredoxine (Prx) ROS (Reactive Oxygen Species). Bei den Prx in *P. tricornutum* ist möglicherweise ein horizontaler Gentransfer zwischen Bakterien und Diatomeen zu erkennen, da das im ER lokalisierte Prx (22388) nur mit bakteriellen Prx clustert, bzw. das mitochondriale Prx (56580) nur mit humanen Prx vergleichbar ist (siehe Kapitel 1). Zumindest konnten in höheren Landpflanzen bei Enzymen des Calvin Zyklus horizontale Gentransfers erkannt werden (Martin und Schnarrenberger 1997), bzw. auch in Dinoflagellaten (Nosenko *et al.* 2006). Dieser horizontale Gentransfer in *P. tricornutum* bedeutet aber auch, daß unter Umständen Regulatorproteine erworben werden, welche neue Regulationsmechanismen entstehen lassen können. Das die Prx mit der „2 Cystein“ Gruppe in *P. tricornutum* und *T. pseudonana* nicht existiert, kann damit zusammenhängen, dass die für die Regulation notwendigen TrxX (Thioredoxin X) wahrscheinlich auch nicht vorhanden sind (siehe Kapitel 1). Diese Peroxiredoxine und Thioredoxine sind vermutlich erst in Grünalgen und Pflanzen entstanden, bzw. sind evtl. später bei den Rotalgen oder Diatomeen sekundär verloren gegangen.

Für die Nutzbarkeit der Diatomeen gibt es viele sinnvolle und aber auch nicht-sinnvolle Möglichkeiten. Unter anderem wurde im Zuge der aktuellen Erderwärmung von verschiedenen Firmen vorgeschlagen (Kintisch 2007), daß durch Düngung von Eisen oder Harnstoff in arktischen Meergewässern eine Algenblüte, speziell die der Diatomeen hervorgerufen werden soll (Assmy *et al.* 2007, Boyed *et al.* 2007, Buessler *et al.* 2008, Petkewich 2008). Dadurch erhofft man sich, daß das in der Atmosphäre vorhandene CO₂, bekannt u.a. auch als eines der Treibhausgase, fixiert wird und auf dem Meeresgrund ausfällt (Buessler *et al.* 2008, Smetacek *et al.* 2004). Eine zu simple Idee für eine komplexe Problematik, denn es sind noch nicht alle Mechanismen für den Kohlenstoffkreislauf in Diatomeen bekannt (Kroth *et al.* 2007) und es sind noch nicht die ökologischen Langzeitfolgen in den entsprechenden Gewässern untersucht worden (Buessler *et al.* 2008). Es konnte aber gezeigt werden, daß die Diatomeen und andere Algen mit dem gebundenen Kohlenstoff zum Meeresboden sinken (Kintisch 2007), sie können aber auch unter Umständen im biologischen Nahrungskreislauf der Meere vorhanden bleiben (Kintisch 2007).

Außerdem sind für eine Algenblüte mehrerer Faktoren erforderlich als es nur durch Zugabe von Eisen oder Harnstoff hervorgerufen wird (Allen *et al.* 2005).

Eine andere industrielle Anwendung von Diatomeen, speziell der *P. tricornutum*, ist eine Filterung von industriellen Abgasen. Eine Firma arbeitet in Zusammenarbeit mit dem Fraunhofer-Institut (Stuttgart, Deutschland) daran, daß die Diatomeen in speziellen Tanks dauerhaft wachsen und gleichzeitig durchgeleitete Abgase filtern. Die überschüssigen Algen können als Ausgangsmaterial dienen, um daraus 100%igen Biodiesel gewinnen zu können (Chisti 2007, Otsuki 2001).

Zusammenfassung

Diatomeen (Kieselalgen) sind einzellige, photoautotrophe Organismen, die in vielen aquatischen Standorten vorkommen. Diatomeen-Plastiden sind wahrscheinlich durch sekundäre Endocytobiose entstanden, der Aufnahme einer eukaryotischen Alge in eine eukaryotische Wirtszelle. Der Endosymbiont wurde im Laufe der Evolution zum Zellorganell reduziert. Die Sequenzen der Genome der Diatomeen *Phaeodactylum tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana* sind komplett bekannt.

In dieser Arbeit konnten Gene für Enzyme des Calvin Zyklus und für das Ferredoxin/Thioredoxin-System identifiziert und bioinformatisch die Lokalisation der jeweiligen Proteine vorhergesagt werden. Durch Fusion von Präsequenzen an GFP und anschließender Expression in *P. tricornutum* konnte gezeigt werden, dass in den Plastiden u.a. vier Fruktose-1,6-Bisphosphatasen, eine Phosphogluconat Lactonase, eine Ferredoxin/Thioredoxin Reduktase, sowie Thioredoxine F, M und Y lokalisiert sind. Eine 6-Phospho-Gluconolacton Dehydrogenase und ein Thioredoxin H sind wahrscheinlich im periplastidären Raum lokalisiert. Die Seduheptulose-1,7-Bisphosphatase, eine Fruktose-1,6-Bisphosphatas, eine NADPH abhängige Thioredoxin Reduktase und ein Thioredoxin H sind dagegen im Cytosol lokalisiert. Für *P. tricornutum* und *T. pseudonana* konnte gezeigt werden, dass der reduktive (RPP) in den Plastiden und der oxidative Pentose Phosphatweg (OPP) im Cytosol lokalisiert sind. Aufgrund der Lokalisation ist die Seduheptulose-1,7-bisphosphatase wahrscheinlich in den OPP physiologisch eingegliedert. In den Plastiden wurde die Seduheptulose-1,7-bisphosphatase vermutlich durch die Transaldolase in dem RPP enzymatisch ersetzt. In *P. tricornutum* begrenzt sich die Regulation des plastidären RPP durch das Thioredoxin F nur noch auf die Fruktose-1,6-Bisphosphatase. Von den vier Isoformen sind wahrscheinlich zwei über die Cysteine im regulativen Zentrum regulierbar. Die Kinetik der Fruktose-1,6-Bisphosphatasen im Gesamtzellextrakt von *P. tricornutum* entspricht anderen plastidären Fruktose-1,6-Bisphosphatasen von höheren Pflanzen. Es konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionen der kernkodierte Gene des OPP und des RPP nicht diurnal gesteuert sind. Durch eine Thioredoxin-Affinitätschromatographie konnten mögliche Zielproteine gesammelt und durch Massen Spektrometrische Analysen identifiziert werden.

Summary

Diatoms are unicellular, photoautotrophic organisms, which can be found in all aquatic habitats. Diatom plastids probably evolved by secondary endocytobiosis, the uptake of a eukaryotic alga into another eukaryotic host cell. In the course of evolution the endosymbiont was reduced to a cell organelle. The genome sequences of the diatoms *Phaeodactylum tricornutum* and *Thalassiosira pseudonana* recently have been sequenced.

The genes encoding enzymes of the Calvin cycle and the Ferredoxin/Thioredoxin-system were identified, and the localisation of the respective proteins was predicted by bioinformatic tools. Fusion of the respective presequences to GFP and the subsequent expression of the constructs in *P. tricornutum* demonstrated that the four Fructose-1,6-bisphosphatases, one Phosphogluconat Lactonase, one Ferredoxin/Thioredoxin Reductase, and the Thioredoxins F, M and Y are localised in the plastids. One 6-Phospho-Gluconolactone Dehydrogenase and one Thioredoxin H are possibly localised in the periplastidic space. The Seduheptulose-1,7-bisphosphatase, one Fructose-1,6-bisphosphatase, one NADPH-dependent Thioredoxin Reductase and one Thioredoxin H are localised in the Cytosol. It was shown for *P. tricornutum* and *T. pseudonana* that the oxidative pentose phosphate pathway (OPP) is relocated to the cytosol. As a result of this transfer, the Seduheptulose-1,7-bisphosphatase is possibly physiologically integrated in the OPP. In *P. tricornutum* the regulation of the plastidic RPP via Thioredoxin F is limited to the Fructose-1,6-bisphosphatase. Two of the four isoforms can be probably regulated via the cysteine residues in the regulative centre. The kinetic properties of the Fructose-1,6-bisphosphatases in the crude cell extract of *P. tricornutum* is similar to other plastidic Fructose-1,6-bisphosphatases of higher plants. It was demonstrated that the transcription levels of nuclear encoded genes of the OPP and RPP are not changing during by the diurnal cell cycle. Some possible target proteins of Thioredoxin have been collected by a Thioredoxin affinity chromatography and identified by mass spectrometric analyses.

Material und Methoden

1. Sequenzanalyse und Genannotierung

Es wurden öffentlich zugängliche Sequenzen von US Department of Energy Joint Genome Institute (JGI, <http://www.jgi.doe.gov/>) gescreent vom Genom Sequenzierungsprojekt für die Diatomeen *Phaeodactylum tricornutum* v2.0 (<http://genome.jgi-psf.org/Phatr2/Phatr2.home.html>) (Bowler *et al.*, in preparation) und *Thalassiosira pseudonana* v3.0 (<http://genome.jgi-psf.org/Thaps3/Thaps3.home.html>) (Armbrust *et al.* 2004) von sekundären Endosymbionten Algen für Sequenzhomologien, wobei die BLAST Algorithmen angewendet wurde (Altschul *et al.* 1997). Die Treffer von Sequenzen wurden auf Präsequenzen, bestehend aus Signal- und Transitpeptid, mit dem Programm SignalP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) (Bendtsen *et al.* 2004) hin untersucht. Für die Vorhersage von der Trennsequenz zwischen des Signal- und Transitpeptide wurden die Ergebnisse von SignalP's Neuronal Networks (NN) (Nielsen *et al.* 1997) oder das Hidden Markov Model (HMM) (Nielsen *et al.* 1998) verwendet. Für Vorhersagen für chloroplastidäre Transitpeptid ähnliche Domänen wurde das Programm TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) (Emmanuelsson *et al.* 2000, 2007) angewendet. Falls eine Länge von mehr als 10 Aminosäuren zwischen der vorhergesagten Trennsequenz von dem Signalpeptid und der Region des reifen Proteins homolog zu anderen Proteinen anderer Organismen existierte, wurde auch ein schwach vorhergesagtes Transitpeptid ähnliche Domäne akzeptiert. Die Enzyme des Calvin Zyklus wurden in ihrer Lokalisation so angeordnet, wie die Gene, deren Präsequenzen durch SignalP, TargetP und durch die Lokalisation mittels eGFP-Fluoreszenz ermittelt wurden. Alle Proteine von *P. tricornutum* oder von *T. pseudonana* wurden noch mal bei NCBI gegen andere schon bekannte Proteine geprüft (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>). Mögliche Transkriptionsanfänge für ein Gen wurden mit Netstart (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetStart/>) geprüft, alle Methionine innerhalb einer Open Reading Frame (ORF), welche bei der Berechnungseinstellung „Vertebraten“ unter der Wahrscheinlichkeit von 0,5 lagen, wurden generell als Transkriptionsanfang eines Genes ausgeschlossen.

2. Standard PCR

Es wurden Standard Klonierungsmethoden angewendet (Sambrook *et al.* 1989). Die Polymerasen Ketten Reaktion (polymerase chain reaction, PCR) wurde durchgeführt mit einem Master Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland), wobei die rekombinante Pfu Polymerase (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben verwendet wurde. Alle in dieser Arbeit verwendeten Präsequenzen, bestehend aus Signal- und Transitpeptiden, basieren auf cDNA und nicht auf genomischer DNA von *Phaeodactylum tricornutum*.

Designt wurden die Primer mit der Software DNASTAR 5.02 Lasergene Unterprogramm PrimerSelect, dabei wurde darauf geachtet, daß die Primer keine Selbstdimere, bzw. Haipins bilden konnten. Alle verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Thermo-Electron GmbH (Ulm, Deutschland) bezogen. Die Nukleotidsequenzen werden immer in der 5' zu 3'-Richtung und in der Reihenfolge zuerst upstream, dann downstream angegeben. Unterstrichene Nukleotide in den Primern sind eingeführte Schnittstellen für verschiedene Restriktionsendonukleasen.

Das Thioredoxin Typ F (TrxF) und die Fruktose-1,6-Bisphosphatase C3 (FBPC3) wurden aus cDNA amplifiziert mit den in Tabelle 1 aufgeführten Primern. Es wurden Amplifikation aus der cDNA vorgenommen, um das ganze Gen (Signal- und Transitsequenz mit reifem Protein) in den Vektor pGEM-T (Promega GmbH, Mannheim, Deutschland) (für Blue-White Screening auf IPTG- (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und X-Gal- (5-Brom-4-chlor-3-indoxyl- β -D-galctosid, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und Ampicillin-LB-Platten, Sambrook *et al.* 1989) zu ligieren.

Tab. 1: Oligonukleotidsequenz (Primer) für die Amplifikation des Thioredoxin Typ F aus cDNA (Präsequenz und Protein) und Fruktose-1,6-Bisphosphatase (FBP) aus cDNA (Präsequenz und Protein). Die Nukleotidsequenzen werden immer in der 5' zu 3'-Richtung und in der Reihenfolge zuerst „upstream“, dann „downstream“ angegeben. Unterstrichene Nukleotide in den Primern sind eingeführte Schnittstellen für verschiedene Restriktionsendonukleasen. Die Protein Identity (Prot ID) wird als ID in der Tabelle angegeben.

Gen	ID	Nukleotidsequenz	Produktgröße (bp)
Trx F	46280	GTAGTCCACTTACGA <u>ATTCG</u> GATACAATGATGCAACAAC GATTTGGTTGATTGGTTTC <u>GTCGAC</u> GCATCGT	595
FBPC3	31451	CGTCAGTTGTGTCCGTTTACCGA TATTTAGTCGATGCCAAAGTTTTTATAGG	1289

Das komplette Gen wurde in den pGEM-T Vektor nach Herstellerangaben ligiert und in XL1-Blue *E. coli* Zellen transformiert. Das reife Protein des TrxF und der FBP wurden aus dem pGEM-T Vektor amplifiziert mit den in Tabelle 2 aufgeführten Primern und in den Überexpressionsvektor pET28a(+) ligiert. Das reife Protein TrxM wurde direkt aus cDNA amplifiziert und auch in den Überexpressionsvektor pET28a(+) mit dem Rapid Ligation Kit (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) ligiert.

Tab. 2: Oligonukleotidsequenz (Primer) für die Amplifikation des Thioredoxin Typ F aus pGEM-T (reifes Protein), Typ M aus cDNA (reifes Protein) und Fruktose-1,6-Bisphosphatase (FBP) aus pGEMT (reifes Protein). Die Nukleotidsequenzen werden immer in der 5' zu 3'-Richtung und in der Reihenfolge zuerst „upstream“, dann „downstream“ angegeben. Unterstrichene Nukleotide in den Primern sind eingeführte Schnittstellen für verschiedene Restriktionsendonukleasen. Die Protein Identity (Prot ID) wird als ID in der Tabelle angegeben.

Gen	ID	Nukleotidsequenz	Produktgröße (bp)
Trx F	46280	AAAGTACATATGCCGCCTTTGACCTTGTC CATCGTCG <u>CCCCGGG</u> ATCCTAAC	382
Trx M	51357	CCACGGC <u>CATATGATGGCAGTTG</u> CCGCCGACTCGAGAGCACC	392
FBPC3	31451	CAAACGGC <u>GCTAGCACCGAG</u> CGATGCCCTCGAGTTTATAGG	1054

Es wurden Amplifikation aus den obigen pGEM-T Vektoren vorgenommen, um das reife Gen (ohne Signal- und Transitsequenz) in den Überexpressionsvektor pET28a(+) (Novagen/Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Deutschland) zu ligieren. Unterstrichene Stellen in der Nukleotidsequenz sind Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen.

3. Mutagenese PCR

Das im Vektor pET28a(+) ligierte Protein TrxF wurde durch die Mutagenese PCR so in seinem aktivem Zentrum (WCGPCK) in der Aminosäuresequenz verändert (C2S), daß das zweite Cystein (Nukleotidsequenz: TGC) zu Serin (Nukleotidsequenz: TCC) ummutiert wurde und sich das aktive Zentrum zur Aminosäuresequenz WCGPSK änderte. Dies wurde durch eine Nukleotid-Punktmutation erzielt und mit den in Tabelle 3 aufgeführte Primerpaar durchgeführt.

Tab. 3: Oligonukleotidsequenz (Primer) für die Amplifikation des Thioredoxin Typ F und Typ M aus pGEM-T oder cDNA. Die Nukleotidsequenzen werden immer in der 5' zu 3'-Richtung und in der Reihenfolge zuerst „upstream“, dann „downstream“ angegeben. Unterstrichene Nukleotide in den Primern sind eingeführte Schnittstellen für verschiedene Restriktionsendonukleasen. Die Protein ID (Prot ID) wird als ID in der Tabelle angegeben.

Gen	ID	Nukleotidsequenz	Mutation
Trx F	46280	GGTGCGGACCC <u>TCCA</u> AGGTCATTGC GCAATGACCTT <u>GGAG</u> GGTCCGCACC	C2S

Für die Mutagenesen PCR wurde das QuikChange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene Cloning Systems, Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande) nach den Herstellerbedingungen benutzt.

4. Plasmidkonstrukte

Es wurden Standard Klonierungsmethoden angewendet (Sambrook *et al.* 1989). Die Polymerasen Ketten Reaktion (polymerase chain reaction, PCR) wurde durchgeführt mit einem Master Cycler Gradient (Eppendorf, Hamburg, Deutschland), wobei die rekombinante Pfu Polymerase (MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland) gemäß den Herstellerangaben verwendet wurde. Alle in dieser Arbeit verwendeten Präsequenzen, bestehend aus N-terminalen Signal- und Transitpeptiden, basieren auf cDNA und nicht auf genomischer DNA von *Phaeodactylum tricornutum*. Präsequenzen von Proteinen von *P. tricornutum* wurden durch die PCR amplifiziert mit den Primerpaaren aus Tabelle 4, wobei 5 bis 8 Basenpaare upstream vom Start Codon zusätzlich amplifiziert wurden, um den Start der Translation zu erleichtern (Kozak 1987). Um das Konstrukt der Präsequenz aus *P. tricornutum* TrxF:eGFP (46280) zu produzieren, wurde das verbesserte grün fluoreszierende Protein (eGFP, enhanced green fluorescent protein) zwischen den Schnittstellen der Restriktionsendonucleasen EcoRI und BamHI vom *P. tricornutum* Transformationsvektor pPha-T1 (GenBank AF219942, Zaslavskaja *et al.* 2000) eingefügt. Für die Konstrukte von FBPC1:eGFP (42886), FBPC2:eGFP (42456), FBPC3:eGFP (31451), FBPC4:eGFP (54279), PGL:eGFP (38631), FBP:eGFP (23247), SBP:eGFP (9583), NTR:eGFP (51055), TrxH:eGFP (56471), FTR:eGFP (50907), TrxM:eGFP (51357), TrxY:eGFP (33356), TrxO:eGFP (31720), PGDH:eGFP (45333) und TrxH:eGFP (48539) (siehe für Primerpaare Tabelle 1)

wurden zuerst die Präsequenzen durch die Standard-PCR mit der Pfu-Polymerase amplifiziert, um „blunt ends“ zu bekommen.

Tab. 4: Die Primerpaare sind in der Reihenfolge upstream zu downstream und in der 5' zu 3'-Richtung angegeben. Unterstrichene Nukleotidsequenzen sind Erkennungssequenzen von Restriktionsendonukleasen. Die Präsequenzen wurden mit unmodifizierten Primern amplifiziert, außer für die TrxF.

Gen	Protein ID	Nukleotidsequenz	Produktgröße (bp)
FBPC1	42886	CAGGGTAAAATGGAGAAATGG AACGTCGGAACAGCATCG	545
FBPC2	42456	CGTAGCTCTCGGAGTATGAAGATT CGTCAGCGTCACACCAGTG	215
FBPC3	31451	CCGACAATCATGATGTTTTAT GAGAGTGACTCCAGTTGTGT	205
FBPC4	54279	AGAAACAATAGCAATGGGTAGAGGCGTCATC AGAACTTTGCACCGGCCCTCCAC	273
PGL	38631	CCATTTCTCTGGATAAGGGC TTTATGCGCCAAAAGTTGTAGAA	158
FBP	23247	TCCGCAAACCATGTCCGATAAG CACCATACTGCCACATAGCG	743
SBP	9583	TCGGTCTAATAAACAAAGATGCC ATCTCCGAAGTCGTTTTTGTG	289
NTR	51055	GATCTCGTAGTTATTGGAGGCGGAT CTTGCGGACCGACTCGTGTAG	206
TrxH	56471	CTTATCATCATGGTGAAACATCTGGA AGCCGTAAAGTCGACCACAACAA	95
FTR	50907	GCATCAATTGGAAAGATGAAAGTA CATCTCTTTTCGCCATATACACAGTA	134
TrxF	46280	GTAGTCCACTTACGAATTCGATAACAATGATGCAACAAC CCCGCACTGGCCATGGTCTGGTCA	272
TrxM	51357	GCAGCGATCTGAATTCCAATGTA AAACACCATGACGGTTTCTGACT	326
TrxY	33356	CACCACCACAATATGAGGTCTTTA CCACAGTACCCCTCCGAT	140
TrxO	31720	ACATTCCTCACTCACATGTCAACG CGTGAAGTAACAGACCGTTTTGGAG	176
PGDH	45333	ATACTCATGTTTCCTCACAATCCTAC GTTTATCTCGTTGGTGGAAAGTGTT	89
TrxH	48539	CTAAGGACAATCAAGTAGCG GGTAGCCGAGAAATCAATG	284

Nach dem Verdau des Vektors pPha-T1-eGFP mit der Restriktionsendonuklease *Stu*I und Dephosphorylierung durch die Antarctic Phosphatase und mitgeliefertem Puffer (New England Biolabs GmbH, Frankfurt, Deutschland), wurden die Präsequenzen Amplifikate in den Vektor inframe und vor dem eGFP mit dem Rapid Ligation Kit (MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland) ligiert. Alle Plasmidkonstrukte wurden vom 5'-Ende mit dem Primer (GCTTCAATTTGCTGGATGT) ansequenziert, um zu kontrollieren, dass das Insert korrekt ligiert wurde. Für mehr Details siehe auch Gruber *et al.* (2007).

5. Vektortransformation

Vektortransformationen von *Phaeodactylum tricornutum* wurden durchgeführt mit dem Bio-Rad Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), abgedichtet mit der 1350 psi rupture disks wie folgt beschrieben durch Apt *et al.* (1996) und vor kurzem noch detaillierter beschrieben bei Kroth (2007). Für die Selektion und Kultivierung von *P. tricornutum* Transformanten wurde 75 µg/ml Zeocin (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) zum Festmedium zugegeben.

6. Mikroskopie

Die *Phaeodactylum tricornutum* Zellen wurden durch ein Olympus BX51 Epifluoreszenz Mikroskop (Olympus Europe, Hamburg, Deutschland) beobachtet, welches mit einem Nikon DXM1200 Digitalkamera System (Nikon GmbH, Düsseldorf, Germany) ausgerüstet war. Die Nomarski's Differential Interferenz Kontrast Beleuchtung (DIC, Nomarski's differential interference contrast) wurde gebraucht, um das transmittierte Licht zu sehen. Die Chlorophyll Autofluoreszenz und die grüne eGFP Fluoreszenz der Transformanten wurden aufgetrennt durch den Spiegel mit der Einheit UMWSG2 (Olympus), bzw. durch das Filterset 41020 (Chroma Technology Corp, Rockingham, VT, USA). Multikanal-Fluoreszenzbilder wurden aufgenommen und bearbeitet mit der Software LUCIA (Nikon) und modifiziert mit Software IrfanView 4.10 (<http://www.irfanview.net/>), AxioVision 4.6 (<http://www.zeiss.de/AxioVision>, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Götting, Deutschland) und ImageJ v1.37 mit dem Plugin RGB-Gray merge (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Der Maßstab wurde größenkalibriert durch das Stage-Mikrometer.

7. Phylogenie- und Sequenzanalyse

Entweder wurden die phylogenetischen Untersuchungen von Proteinensequenzen mittels der Software MEGA Version 4.0 (Kuma *et al.* 2004) unter Anwendung der Maximum Parsimony (MP) Berechnung (Eck und Dayhoff 1966, Fritsch 1977) (PGDH, NTR) oder mit der Berechnungsmethode von Maximum Likelihood (Prx, FBP, SBP, PGL, TrxH, Prx) durchgeführt. Für die Bootstrap Analysen wurden 100 Replikationen durchgeführt, Werte unter 50% werden nicht dargestellt. Die Protein Identifikationsnummern (Prot ID), GenBank Nummern der einzelnen Proteine stehen in Klammern direkt nach den Proteinen in den Stammbäumen, bzw. in den Sequenzvergleichen. Die Alignments wurden mit ClustalW gemacht (<http://align.genom.jp>) Für das Alignment wurde das Phylip Format verwendet, da dies das notwendige Format für die folgenden Schritte ist. Bei den Alignments wurden die meisten „Gap´s“ (Lücken) gelöscht, um soweit wie möglich nur homologe Bereiche miteinander zu vergleichen. Diese veränderten Alignments in Phylip Format wurden dann für die Phylogenie Analysen verwendet. Die phylogenetischen Bäume sind online mit dem Programm PhymI (<http://atgc.lirmm.fr/phymI/online.html>) hergestellt worden. Als Matrizenmodell wurde WAG gewählt (Wheland und Goldman 2001). Das Parsimony-Prinzip versucht einen Baum zu finden, der mit den wenigsten Substitutionen auskommt, um die Unterschiede in den Sequenzen zu erklären. Es wird für alle möglichen Bäume ein Score berechnet, um dann den Baum mit den besten Score auszuwählen - the maximum parsimonia tree. Ziel der Berechnung von phylogenetischen Bäumen mit der Maximum Likelihood Methode ist es, den Baum zu finden, der am wahrscheinlichsten die Verwandtschaft der Sequenzdaten wiedergibt.

Die Proteine wurden auf folgende Homepages geblastet und gefunden:

Pubmed: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>)

NCBI: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>)

JGI: (http://genome.jgi-psf.org/tre_home.html),

(<http://genome.jgi-psf.org/Auran1/Auran1.home.html>),

(<http://genome.jgi-psf.org/Phatr2/Phatr2.home.html>),

(http://genome.jgi-psf.org/Phyra1_1/Phyra1_1.home.html),

(http://genome.jgi-psf.org/Physo1_1/Physo1_1.home.html),

(<http://genome.jgi-psf.org/Thaps3/Thaps3.home.html>),

(http://genome.jgi-psf.org/Poptr1_1/Poptr1_1.home.html),

(<http://genome.jgi-psf.org/Chlre3/Chlre3.home.html>),
 (<http://genome.jgi-psf.org/Aspni1/Aspni1.home.html>),
 (http://genome.jgi-psf.org/Phypa1_1/Phypa1_1.home.html),
 (<http://genome.jgi-psf.org/Ostta4/Ostta4.home.html>),
 (http://genome.jgi-psf.org/Ost9901_3/Ost9901_3.home.html),
 (http://genome.jgi-psf.org/finished_microbes/anava/anava.home.html),
 (http://genome.jgi-psf.org/draft_microbes/nospu/nospu.home.html)

und andere Homepages:

(<http://www.ciliate.org/>), (<http://www.plantgdb.org/AtGDB/>),
 (<http://www.plantgdb.org/OsGDB/cgi-bin/blastGDB.pl>),
 (<http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp/>),
 (http://www.ebi.ac.uk/2can/genomes/eukaryotes/Guillardia_theta.html),
 (<http://genomics.msu.edu/galdieria/about.html>),
 (http://www.ensembl.org/Saccharomyces_cerevisiae/index.html),
 (<http://www.yeastgenome.org/>).

Abkürzungen der Proteine sind: Fruktose-1,6-Bisphosphatase (FBP), Seuheptulose-1,7-Bisphosphatase (SBP), 6-Phospho-Gluconolacton Dehydrogenase (PGDH), NADPH abhängige Thioredoxin Reduktase (NTR), Thioredoxin Typ H (TrxH), Peroxiredoxin (Prx) und Phosphogluconat Lactonase (PGL). Abkürzungen für die Organismen in den Stammbäumen sind wie folgt: *Alexandrium tamarense* (alexa), *Amphidinium carterae* (amphi), *Anabaena variabilis* (ana), *Arabidopsis thaliana* (at), *Aspergillus* sp. (asp), *Aureococcus anophagefferens* (aureo), *Bigelowiella natans* (big), *Brassica* sp. (brassica), *Campylobacter* sp. (campylo), *Candida albicans* (candida), *Chlamydomonas reinhardtii* (chlarei), *Cyanidioschyzon merolae* (cyam), *Cyanophora paradoxa* (cyano), *Emiliania huxleyi* (emi), *Euglena gracilis* (eug), *Galdieria sulphuraria* (gald), *Glaucozystis nostochinearum* (glauco), *Griffithsia okiensis* (griff), *Guillardia theta* (guill), *Hordeum vulgare* (hordeum), *Isochrysis galbana* (iso), *Karenia brevis* (kareni), *Lactuca sativa* (lactuca), *Laminaria digitata* (lami), *Magnaporthe grisea* (magna), *Mesostigma viridae* (meso), *Microcystis aeruginosa* (microcyst), *Musa* sp. (musa), *Neurospora crassa* (neuro), *Nodularia spumigena* (nodularia), *Nostoc punctiforme* (nostoc), *Oryza sativa* (indica cultivar-group) (orin), *Oryza sativa* (japonica cultivar-group) (orja), *Oryza sativa* (orsa), *Ostreococcus tauri* (ostreo), *Phaeodactylum tricornutum* (pt), *Physcomitrella patens*

(physcomi), *Phytophthora infestans* (phyti), *Phytophthora ramorum* (phyr), *Phytophthora sojae* (phys), *Pisum sativum* (pisu), *Plasmodium falciparum* (plas), *Populus trichocarpa* (popu), *Rhodobacterales Bacterium* (rhodobact), *Saccharomyces cerevisiae* (sacch), *Schizosaccharomyces pombe* (schizosa), *Solanaum tuberosum* (sola), *Spinacia oleracea* (spin), *Streptomyces coelicolor* (strepto), *Sulfurimonas denitrificans* (sulfu), *Synechocystis* sp. (synecho), *Tetrahymena thermophila* (tetra), *Thalassiosira pseudonana* (thaps), *Thermus aquaticus* (thermu), *Tortula marginata* (totula), *Trichodesmium erythraeum* (tricho), *Triticum aestivum* (tri), *Trypanosoma cruzi* (trypa), *Ustilago maydis* (ustil), *Wolinella succinogenes* (woline), *Yarrowia lipolytica* (yarrow), *Zea mays* (zea).

Es wurden bewusst in den phylogenetischen Stammbäumen keine Mammalia aufgenommen, bzw. Pilze nur dann, wenn die zu untersuchenden Proteine als „Outgroup“ positioniert wurden.

Für die Sequenzanalysen wurden die Software ClustlX v1.8 (<http://www-igbmc.u-strasbg.fr/BioInfo/>) (Thompson *et al.* 1997) und GeneDoc v2.6002 (<http://www.psc.edu/biomed/genedoc>) (Nicholas *et al.* 1997). Es wurden N- und C-terminal Aminosäuren entfernt, um eine genaue Homologie innerhalb der Proteine zu bekommen, bzw. um unwichtige Aminosäuren auszublenden.

8. Bakterienstämme

Stamm	Genotyp	Referenz/Hersteller
XL1-Blue	recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r)]	Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande
XL10-GOLD	Tet ^r Δ(mcrA)183 Δ(mrcCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte [F' proAB lacI ^q ZΔM15 Tn10 (Tet ^r) Amy Cam ^r]	Stratagene Europe, Amserdam, Nierdelande
Rosetta (DE3)	F' ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) gal dcm (DE3) pRARE (Cam ^R)	Novagen/Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Deutschland
Arctic Express (DE3) RIL	<i>E. coli</i> B F' ompT hsdS _B (r _B ⁻ m _B ⁻) dcm ⁺ Tet ^r gal λ (DE3) endA Hte [cpn10 cpn60 Gent ^r] [argU ileY leuW Str ^r]	Stratagene Europe Amsterdam, Niederlande

9. Plasmide

Plasmid	Beschreibung	Referenz/Hersteller
pGEM-T	Blue-White Screening	Promega, Mannheim Deutschland
pET28a(+)	Histidin-Tag (N- und C- terminal)	Novagen/Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Deutschland

10. Antikörper

Antikörper	Hersteller
Penta His HRP Conjugate Kit	QIAGEN, Hilden, Deutschland

11. Proteine

Proteine	Hersteller
Glukose-6-Phosphat-Dehydrogenase	Roche, Mannheim, Deutschland
Phosphoglukose Isomerase	Roche, Mannheim, Deutschland
Fruktose-1,6-Bisphosphatase	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland

12. Kulturbedingungen von *Phaeodactylum tricornutum*

Phaeodactylum tricornutum (Stamm UTEX 646, beziehbar bei UTEX Culture of Algae, University of Texas, TX, USA) wurde kultiviert in Provasoli's angereichertem Seewasser (Starr *et al.* 1993), wobei "Tropic Marin" Salz (16,6 g/l) (Dr. Biener GmbH, Wartenberg, Deutschland) gebraucht wurde, 50% Konzentration verglichen mit natürlichem Seewasser. Die Zellen wuchsen in Flüssigkulturen unter ständigem Schütteln (120 rpm) bei 22°C mit einer 16-stündigen Beleuchtung bei 75 $\mu\text{E}/(\text{m}^2 \times \text{s})$. Festmedium beinhaltete 1,2% (w/v) Bacto Agar (BD, Sparks, MD, USA).

13. Überexpression von Thioredoxin Typ F

Die transformierten *E. coli* Zellen wurden in Mg-LB Medium mit Chloramphenicol (CAM, mit 0,034 mg/L) für die Rosetta (DE3) *E. coli* (Novagen/Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Deutschland) und Kanamycin (KAN, 0,050 mg/L) für den pET28a(+) Vektor (Novagen/Merck Biosciences GmbH, Schwalbach, Deutschland) angezogen.

Da das Thioredoxin Typ F und M aus *Phaeodactylum tricornutum* verschiedene Codon-Usages in der Nukleotidsequenz hat, welche in *E. coli* nicht oder nur selten vorkommen, wurde N-terminal dem zu überexprimierendem, reifen Protein der HIS-Tag und die Multiple Cloning Side (MCS) vom Vektor, bzw. auch C-terminal ein HIS-Tag eingefügt. Dadurch wurde erst das Protein löslich (Goldman *et al.* 1995, Kleber-Janke und Becker 2000). Die Überexprimierung von TrxF und TrxM in Rosetta (DE3) erfolgte nach der Methode von Sambrook *et al.* (1998) und nach Herstellerangaben. Beide Proteine hatten eine optimale Überexpression bei 1 mM IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid) Endkonzentration und 5 Stunden Inkubationszeit mit 30°C.

14. Aufreinigung von überexprimierten Proteinen aus *E. coli*

Der Lysispuffer, um Thioredoxin F (Trx F) aus den *E. coli* Zellen mittels FRENCH Pressure Cell (SLM Aminco Inc., Rochester, USA) (3x mit 75 MPa) aufzuschließen (10 ml pro 5 g *E. coli* Pellet), bestand aus 50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0) und 300 mM NaCl, 20% (v/v) Glycerol und Proteaseninhibitor „Complete EDTA-free“ (Roche, Mannheim, Deutschland) nach Herstellerangaben.

10 ml von der Ni-NTA Agarose (QIAGEN, Hilden, Deutschland) wurden in eine leere Econo-Pac Säule (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gepackt und durch einen groben Filter abgeblockt. Die Flußrate wurde mittels einer Peristaltikpumpe (Minipuls 2, ABiMED, Gilson International B.V. Deutschland, Bad Camberg, Deutschland) auf maximal 2 ml/min begrenzt. Alle Flüssigkeiten für alle Chromatographien wurden mit sterilem dd. H₂O angesetzt und nach dem Lösen aller Chemikalien nochmals durch einen Membranfilter (Cellulosemischester, 0,2 μ m Filterdurchmesser, Whatman-Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) über eine Wasserstrahlpumpe gefiltert und entgast. Die Ni-NTA Agarose Säule wurde nach Herstellerangaben equilibriert (Protokoll 13, S.83-84, Puffer S. 114; QIAGEN QIAexpressionist Manual 2003), ohne Proteaseninhibitor „Complete EDTA-free“

(Roche), Glycerol. Das *E. coli* Lysat wurde zuerst für 15 min mit $5'000 \times g$ bei 4°C zentrifugiert, um die Zellfragmente abzupelletieren. Danach wurde der Überstand für 45 min mit $100'000 \times g$ bei 4°C zentrifugiert, um alle nicht löslichen von den löslichen Proteinen zu trennen. Anschließend wurde der Überstand mit einer Flußrate von 0,5 ml/min mittels Peristaltikpumpe über die Ni-NTA Agarose Säule bei Raumtemperatur (RT, $22^{\circ}\text{-}23^{\circ}\text{C}$) aufgetrennt. Dabei binden sich die überexprimierten Proteine durch den N- und C-terminalen HIS-Tag an die Nickel-Ionen. Die Proteine TrxF (Wildtyp und Mutante) und TrxM wurden mit einem Stufengradienten von Imidazol von der Säule gewaschen. Der Gradient war 0 mM und 50 mM zum Waschen der Säule, 150 mM zum Eluieren der Säule und 250 mM Imidazol zum reinigen der Säule. Alle Puffer, Lösungen und Säulengebrauch wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Durchläufe mit den enthaltenen Proteinen wurden mit Proteaseninhibitor „Complete EDTA-free“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) nach Herstelleranweisung versehen, einer Volumenaufkonzentrierung mit VivaSpin 20, für Proteine mit mehr als 5 kDa (Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) durch Zentrifugation ($5'000 \times g$, 4°C) unterzogen und bei 8°C bis zur nächsten Verwendung gelagert. Da die Aufreinigung von TrxF (Wildtyp oder Mutante) und TrxM über die Ni-NTA Agarose Säule sich immer gleich verhielt, wurde alternativ zum qualitativen Proteinnachweis durch Polyacrylamidgelelektrophorese ein rein qualitativer Proteinnachweis nach Bradford (1976) durchgeführt. Dazu wurden 10 μl der zu testenden Proteinlösung mit 100 μl Bradford-Lösung (5% v/v) 100%-iges Ethanol, 10% (v/v) 85%-ige Phosphorsäure und 0,01% (w/v) Coomassie Brilliant Blue G250 versetzt. Nach 5 min bei RT zeigte eine Blaufärbung das Vorhandensein von Proteinen an. Die Farbintensität korrelierte mit der Proteinkonzentration. Als Negativkontrollen wurden 10 μl von den jeweiligen Puffern mit der Bradford-Lösung versetzt.

15. Auftrennung von Thioredoxin Typ F mit hydrophobischer Interaktionschromatographie (HIC)

Die Aufreinigung des TrxF durch die HIC geht auf die Methode von Hisabori *et al.* (2005) (Motohashi *et al.* 2001, Hosoya-Matsuda *et al.* 2005), zurück, das Aufreinigungsprotokoll wurde komplett übernommen. Es wurde allerdings mit nur 0,5 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei TrxF und TrxM gearbeitet, nicht mit 1,0 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

16. Bindung des Thioredoxin F (C2S) an CNBr-aktivierte Sepharose 4B und Sammeln von Zielenzymen aus *Phaeodactylum tricornutum*

Das Sammeln der Zielproteine des TrxF in *Phaeodactylum tricornutum* durch die AFC geht auf die Methode von Hisabori *et al.* (2005) zurück, das Aufreinigungsprotokoll wurde komplett übernommen, nur die Inaktivierung der Bindestellen vom CNBr-aktivierte Sepharose 4B durch Glycin wurde hinzugefügt. Nachdem das TrxF an die Matrix gebunden war, wurde mit 10 ml 0,2 M Glycin (pH 8,0) für 2 Stunden bei RT die Batch-Säule rotieren gelassen. Anschließend wurde für 2 min mit 100 x g bei RT zentrifugiert und der Überstand verworfen. Daraufhin wurde auf die Säule 10 ml 0,1 M NaHCO₃ (pH 8,3), 0,5 M NaCl, 10 mM reduziertes DTT (Dithiothreitol) (frisch angesetzt) dazugegeben. Danach wurde wie bei Hisabori *et al.* 2005 (Motohashi *et al.* 2001, Hosoya-Matsuda *et al.* 2005) weitergearbeitet. Die Proteine aus *P. tricornutum* wurden frisch geerntet (15 min, 5'000 x g, 4°C) und mit 10 ml eiskaltem Schockmedium (50 mM Tris-HCl (pH 8,0), Proteaseninhibitor „Complete EDTA-free“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) resuspendiert. Zum Aufbruch (3x) der Zellen wurde die FRENCH Pressure Cell (SLM Aminco Inc., Rochester, USA), eine auf Eis vorgekühlte 20K-Zelle (SLM Aminco Inc., Rochester, USA) und ein Druck von 75 MPa verwendet. Der Druck wurde zum Aufbrechen kontinuierlich gehalten und alle Proben und Arbeiten wurden bei 4°C, auf Eis durchgeführt. Die aufgebrochenen *P. tricornutum* Zellen wurden für 15 min mit 5'000 x g bei 4°C abzentrifugiert. Der Überstand wurde auf Eis bis zur weiteren Verwendung gelagert.

17. Proteinfällung

Proteine von *P. tricornutum* ließen sich am besten mit 4x Volumen an eiskaltem 100%-igem Aceton für 1 Stunde bei -20°C fällen. Danach wurden die gefällten Proteine im Aceton für 10 min bei 5'000 x g mit 4°C zentrifugiert. Der Acetonüberstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet mit eiskaltem 70%-igem EtOH vorsichtig gewaschen. Anschließend wurde für 10 min bei 5'000 x g mit RT zentrifugiert. Der EtOH Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet getrocknet.

18. Proteinsequenzierung

Die Zielproteine (siehe Sammeln von Target-Proteinen des TrxF mittels Affinitätschromatographie) wurden zur Massen-Spektrometrische Analyse zu Dr. rer. nat. Toru Hisabori (Tokyo Institute of Technology, Japan) und zu Dr. Naomi Hosoya-Matsuda (Kanagawa University Hiratsuka, Japan) per Post gesendet. Mit Maldi TOF TOF wurden die durch Trypsin verdauten Proteine mittels 2D-SDS-Page aufgetrennt, bzw. mit Carbamidoethyl (C) fixiert. Durch einen Trypsin-Verdau der Proteine im 2D-SDS Gel und anschließender Stabilisierung durch Carbamidomethyl sind die Massen der Proteinfragmente im MALDI-TOF TOF ermittelt worden.

19. *In vitro* Reduktionstest

Es wurden die rekombinanten unmutierten Proteine TrxF, TrxM und FBPC3 (jeweils ungefähr 30 µg in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0)) getestet, welche Konzentration von reduziertem DTT nötig war, die Proteine vollständig zu reduzieren. Diese Methode wurde von Hosoya-Matsuda *et al.* (2005) übernommen (Motohashi *et al.* 2001, 2003). Es wurde hierfür von Invitrogen das ASM (4-acetamido-4'-maleimidylstilbene-2,2'-disulfonic acid, disodium salt) benutzt. Wenn die Proteine auf dem SDS-Gel nicht eindeutig zu erkennen waren, wurde ein Western-Blot vom jeweiligen Protein gemacht und gegen den HIS-Tag ein Antikörper eingesetzt.

20. Überexpression von Fructose-1,6-bisphosphatase C3

Um den Vektorkonstrukt pET28a(+):FBPC3 in transformierten *E. coli* Zellen überexprimieren zu können, wurde nach Herstellerangaben gearbeitet (siehe Manual Arctic Express RIL, Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande). Da das FBPC3 (31451) aus *Phaeodactylum tricornutum* Codon-USages in der Nucleotidsequenz hat, welche in *E. coli* nicht oder nur selten vorkommen, wurde N-terminal dem zu überexprimierendem, reifen Protein der His Tag und die Multiple Cloning Side (MCS) vom Vektor, bzw. auch C-terminal ein His Tag gesetzt. Dadurch wurde erst das Protein löslich (siehe Goldman *et al.* 1995, Kleber-Janke *et al.* 2000). Das Protein hatte eine optimale Überexpression bei 0,5 mM IPTG (Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid) Endkonzentration bei 24 Stunden Inkubationszeit mit 12°C.

21. Aufreinigung von überexprimierten FBPC3 aus *E. coli*

Aufreinigung von *Phaeodactylum tricornutum* Fructose-1,6-bisphosphatase C3 (FBPC3) aus *E. coli* Arctic Express (DE3) RIL (Stratagene Europe, Amsterdam, Niederlande). Der Lysispuffer, um Fructose-1,6-bisphosphatase C3 (FBPC3) aus den *E. coli* Zellen mittels FRENCH Pressure Cell aufzuschließen, bestand aus 50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0) und 300 mM NaCl, 20% (v/v) Glycerol, 2% (v/v) Triton X-100 und Proteaseninhibitor „Complete EDTA-free“ (Roche, Mannheim, Deutschland).

10 ml von der Ni-NTA Agarose (QIAGEN, Hilden, Deutschland) wurden in eine leere Econo-Pac Säule (BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland) gepackt und durch einen groben Filter abgeblockt. Die Flußrate wurde mittels einer Peristaltikpumpe (Minipuls 2, ABiMED, Gilson International B.V. Deutschland, Bad Camberg, Deutschland) auf maximal 2 ml/min begrenzt. Alle Flüssigkeiten für alle Chromatographien wurden mit sterilem dd. H₂O angesetzt und nach dem Lösen aller Chemikalien nochmals durch einen Membranfilter (Cellulosemischester, 0,2 µm Filterdurchmesser, Whatman-Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland) über eine Wasserstrahlpumpe gefiltert und entgast. Die Ni-NTA Agarose Säule wurde nach Herstellerangaben equilibriert (Protokoll 13, S.83-84, Puffer S. 114; QIAGEN QIAexpressionist Manual 2003), ohne Proteaseninhibitor „Complete EDTA-free“ (Roche), Glycerol oder Triton X-100. Das *E. coli* Lysat wurde zuerst für 15 min mit 5'000 x g bei 4°C zentrifugiert, um die Zellfragmente abzupelletieren. Danach wurde der Überstand für 45 min mit 100'000 x g bei 4°C zentrifugiert, um alle nicht löslichen von den löslichen Proteinen zu trennen. Anschließend wurde der Überstand mit einer Flußrate von 0,5 ml/min mittels Peristaltikpumpe über die Ni-NTA Agarose Säule bei Raumtemperatur (RT, 22°-23°C) aufgetrennt. Dabei binden sich die überexprimierten Proteine durch den N- und C-terminalen HIS-Tag an die Nickel-Ionen. Die FBPC3 wurde mit einem Stufengradienten von Imidazol von der Säule gewaschen. Der Gradient war 0 mM und 50 mM zum Waschen der Säule, 150 mM zum Eluieren der Säule und 250 mM Imidazol zum reinigen der Säule. Alle Puffer, Lösungen und Säulengebrauch wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

22. Entsalzung von FBPC3

Damit das Protein FBPC3 nach der Aufreinigung mit der Ni-NTA Agarose Säule von dem Elutionspuffer (50 mM NaH₂PO₄ (pH 8,0), 300 mM NaCl, 150 mM Imidazol) entsalzt werden konnte, wurde das jeweilige Protein nach

Herstellieranweisung auf der Säule Sephadex G-25M PD-10 Columns (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) auf 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) umgepuffert. Zu den aufkonzentrierten Proben wurde wieder mit Proteaseninhibitor „Complete EDTA-free“ (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) nach Herstellieranweisung und mit 20% (v/v) Glycerol versehen und bis zur nächsten Verwendung bei 8°C gelagert.

23. Konzentrationsmessung von Proteinen

Zur Konzentrationsbestimmung der Proteine wurde die Methode nach Bradford (1976) gewählt, durchgeführt mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce/Perbio Science Deutschland GmbH, Bonn, Deutschland) laut Herstellieranweisung. Es wurde die Absorption bei 562 nm mit dem Photometer Ultraspec 2100pro UV/Visible Spectrophotometer (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) gemessen und mit der Software Swift II Quantification Version 2.00 (Biochrom Ltd./Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) ausgewertet.

24. Enzymatische Assay der FBPC3

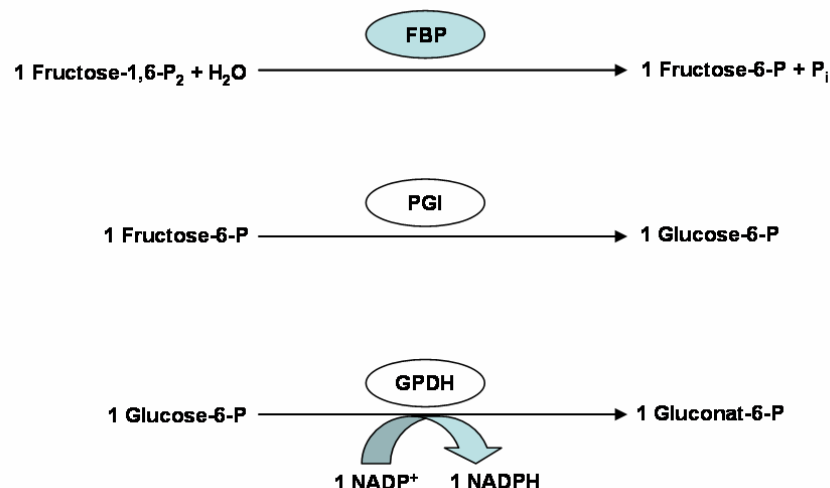


Abb. 1: Reaktionsschema des Enzymassays mit der Fructose-1,6-bisphosphatase nach Kelly *et al.* (1982) spectrophotometrisch bei 340 nm gemessen. Die im Kreis geschriebenen Enzyme sind in der Reihenfolge: FBP Fructose-1,6-bisphosphatase, PGI Glucose-6-phosphate Isomerase, GPDH Glucose-6-phosphate Dehydrogenase.

Da die aufgereinigte FBPC3 keine enzymatische Reaktion zeigte (abgesehen vom *in vitro* Reduktionstest), wurden die FBP aus dem Gesamtzellextrakt der *P. tricornutum* nach der Methode von Kelly *et al.* (1982) in ihrer Aktivität

spectrophotometrisch gemessen. Dabei wird für jedes Produkt (Fruktose-6-Phosphat) von der Fruktose-1,6-Bisphosphatase durch gekoppelte Enzyme (siehe Abbildung 1) stöchiometrisch 1:1 in NADPH umgesetzt, welches bei 340 nm im Photometer gemessen wird.

Das Gesamtzellextrakt aus *P. tricornutum* wurde mit 5 mM reduziertes DTT, 5 mM EGTA, 5 mM EDTA, Complete EDTA-free (nach Herstellerangaben), 5% (v/v) Glycerol und 0,5% (v/v) Triton X-100 in 100 mM Tricine-KOH (pH 7,5) mittel French Press bei 3-fachen Aufbrechen bei 75 MPa aufgeschlossen. Der Zellextrakt wurde anschließend nicht zentrifugiert. Jeweils 97,5 µl Gesamtzellextrakt wurden zur Vorinkubation für die Reduzierung der FBP mit 10 mM reduziertem DTT (DTTred.), 2,5 mM Mg²⁺ und 1 mM EDTA für 20 min bei 25°C reduziert. Es wurde beobachtet, daß die FBP sich am besten bei pH 7,5 reduzieren lassen (Nel und Terblanche 1992) und die meiste Aktivität schon nach 20 min Reduzierung erreicht wurde (Nishizawa und Buchanan 1981). Aus diesem Inkubationsansatz wurden dann 100 µl zu 900 µl Assayansatz (50 mM Tricine-KOH (pH 7, 8 und 9) dazugegeben und bei 20°C mit 340 nm der Umsatz von NADP⁺ zu NADPH gemessen. In dem Assayansatz war noch 1 mM reduziertes DTT, Mg²⁺ in verschiedene mM Konzentrationen (siehe dazu den jeweiligen Untertitel in den Abbildungen), verschiedene Konzentrationen in µM von Fructose-1,6-Bisphosphat-Na₃ Salz (Sigma-Adrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland), 1 mM EDTA, 0,2 mM NADP⁺, 1 U GPDH (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland), 2 U PGI (Roche). Gestartet wurde der Reaktionsansatz nicht mit dem Substrat, sondern mit dem vorher aktivierten Gesamtzellextrakt. Denn in dem Substrat waren noch 2% Fruktose-6-Phosphat von vorneherein vorhanden, die durch PGI und GPDH vorher schon umgesetzt werden mussten. Die Enzymaktivitätsmessung wurde mit Quarzküvetten durchgeführt, dabei wurde die Software Swift II Reaction Kinetics Version 2.00 (Biochrom Ltd./Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) zur Kontrolle des Photometers Ultraspec 2100pro UV/Visible Spectrophotometer (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) benutzt.

Die Umsetzungseinheit Unit (U) der FBP aus dem Gesamtzellextrakt wurde definiert, wenn die Proteine 1 µmol Fructose-1,6-bisphosphat pro Minute umsetzte. Jede Messung wurde 3x wiederholt (n = 3).

25. Western Blot

Die durch Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden elektrophoresisch auf eine PVDF Membran (Hybond-P, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) übertragen. Dazu wurde ein semitrockener Elektrobloetter (Fastblot B32, Biometra GmbH, Göttingen, Deutschland) verwendet, für 90 min mit $1,6 \text{ mA/cm}^2$ bei 8°C . Die PVDF Membran, genau auf die Größe des Polyacrylamidgels zugeschnitten, wurde vor Benutzung mit 100%-igem Methanol aktiviert und anschließend in dem Transferpuffer (20% (v/v) 100%-iges Methanol, 10% (v/v) Lämmli-puffer (0,025 M Tris, 0,25 M Glycin und 0,003 M SDS), auf 1 Liter dd. H_2O) für 1 bis 2 min eingelegt. Die Whatmanpapiere (Whatman-Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland), ebenfalls genau auf die Größe des Polyacrylamidgels zugeschnitten, wurden auch in Transferpuffer eingelegt. In Kathoden- zur Anodenrichtung wurden zuerst 4 Whatmanpapiere, dann die PVDF Membran, darüber das Polyacrylamidgel und abschließend 3 Whatmanpapiere gelegt. Dabei wurde vermieden, daß sich Luftblasen zwischen den Schichten einlagerten. Nach dem Blotten wurde das Polyacrylamidgel nachträglich mit Coomassie Blue Färb- und Entfärbungslösung behandelt. Die PVDF Membran mit den Proteinen wurde zur Bindung der α -HIS-HRP Antikörper vom Penta-His HRP Conjugate Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) wie folgt behandelt: die PVDF Membran wurde 2x für jeweils 10 min bei RT mit TBS Puffer (10 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl) gewaschen. Die Membran wurde anschließend für 1 Stunde bei RT oder über Nacht bei 8°C in Blockpuffer (0,15 g Blocking Reagent (QIAGEN) in TBS-Tween Puffer (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20) bei 70°C gelöst und auf RT runtergekühlt) inkubiert. Danach wurde die geblockte PVDF Membran 2x gewaschen für jeweils 10 min bei RT in TBS-Tween-Triton Puffer (20 mM Tris-HCl (pH 7,5), 500 mM NaCl, 0,05% (v/v) Tween 20, 0,2% (v/v) Triton X-100). Anschließend wurde die PVDF Membran für 10 min bei RT in TBS Puffer gewaschen. Zu Inkubation mit dem α -HIS-HRP Antikörper wurde die PVDF Membran für 1 Stunde bei RT in der „ α -HIS-HRP conjugate“ Lösung (1:10'000 Antikörperverdünnung in Blockpuffer) gelegt. Nach der Bindung des Antikörpers an die Proteine wurde die PVDF Membran 2x für jeweils 10 min bei RT in TBS-Tween-Triton Puffer gewaschen. Danach wurde die PVDF Membran 1x für 10 min bei RT in TBS Puffer gewaschen.

Zur Detektierung wurden das Enhanced Chemiluminescent (ECL) Detektionssystem (BM Chemiluminescence Blotting Substrate, Roche Diagnostics

GmbH, Mannheim, Deutschland) und Röntgenfilme (Hyperfilm P ECL, Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) verwendet. Um die Blotteffizienz zu prüfen, wurde die Membran, nach der ECL Reaktion, mit Amidoschwarz Lösung (20 ml Essigsäure, 180 ml 100%-ige Methanol, 0,4 g Amidoschwarz) gefärbt, bzw. mit 50%-igem Methanol wieder entfärbt (Sambrook *et al.*, 1989).

26. RNA Extraktion

Phaeodactylum tricornutum (50 ml) wurde nach dem Anwachsen durch 15 minütige Zentrifugation mit 5'000 x g bei 4°C geerntet. Das Pellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert. Um aus dem Pellet die komplette RNA ohne genomische DNA zu isolieren, wurde eine Kombination von Chloroform/Phenol-Fällung (TRIzol, Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und das RNeasy Mini Prep Kit (QIAGEN, Hilden, Deutschland) verwendet. Das gefrorene Pellet wurde in einem stetig mit flüssigem Stickstoff gekühltem Mörser zerkleinert. Alle weiteren Arbeiten wurden auf Eis durchgeführt. Das Algenpulver wurde daraufhin in einem 2 ml Eppendorftube (Eppendorf, Wesselin-Berzdorf, Deutschland) überführt und mit 1 ml TRIzol versehen. Das Gemisch von gemörsertem Algenpulver und TRIzol wurde 20 sec lang durch vortexen gemischt, bis es eine homogene Flüssigkeit ergab. Diese Flüssigkeit wurde auf einem Heizblock (Thermomixer compact, Eppendorf, Wesselin-Berzdorf, Deutschland) für 5 min, bei 25°C mit 1100 rpm inkubiert. Nach der Inkubation wurden noch 200 µl 100%-iges Chloroform hinzugegeben und wieder durch vortexen gemischt. Die Algenpulver, TRIzol und Chloroform Mischung wurde wieder auf einem Heizblock für 5 min, bei 25°C mit 1100 rpm inkubiert. Anschließend wurde für 20 min mit 16'000 g bei 4°C zentrifugiert (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Wesselin-Berzdorf, Deutschland). Um die empfindliche RNA nicht zu scheren, wurde mit abgeschnittenen Pipettenspitzen die obere, wässrige Phase nach der Zentrifugation in ein neues, auf Eis vorgekühltes Eppendorftube überführt. 70%-iges Ethanol mit demselben Volumen an überführtem Überstand wurde dazugegeben. Durch einfaches, vorsichtiges Kippen des Tubes wurde die Mixtur gemischt. Diese Mixtur wurde direkt, wieder mit einer abgeschnittenen Pipettenspitze, auf die RNeasy Säule vom QIAGEN Kit transferiert. Alle weitere Schritte wurden nach Herstellerangaben durchgeführt unter Anwendung der RW1 und RPE Puffer. Obwohl durch die TRIzol und RNeasy Aufreinigung der RNA alle genomische DNA entfernt sein sollte, wurde trotzdem anschließend jede

evtl. vorhandene DNA mit Turbo-DNase (Ambion, Woodward, TX, USA) nach Herstellerangaben verdaut. Die so gereinigte RNA wurde anschließend revers transkribiert mit der Reversen-Transkriptase von QuantiTect reverse transcription Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland). Die cDNA wurde anschließend auf genomischer DNA Kontamination durch PCR Amplifikation untersucht, indem gezielt auf Introns amplifiziert wurde. Die getestete cDNA wurde weiter für Assays mit der Real-Time PCR verwendet.

27. Real-Time PCR

Alle verwendeten Oligonukleotide (Primer) wurden von der Firma Thermo-Electron GmbH (Ulm, Deutschland) bezogen. Alle Primer wurden mit sterilgefiltertem (Rotilabo-Spritzenfilter steril, 0,22 µm Filterdurchmesser, Zellulosemischester, Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland) doppelt destilliertem Wasser (dd. H₂O) angesetzt.

Tab. 6: Oligonukleotidsequenz (Primer) für die Amplifikation der endogenen Haushaltsgen Kontrolle. Die Nukleotidsequenzen werden immer in der 5' zu 3'-Richtung und in der Reihenfolge zuerst „upstream“, dann „downstream“ angegeben. Die Protein ID (Prot ID) wird als ID in der Tabelle angegeben, ID welche mit Querstrich (/) angegeben sind, haben verschiedene Splicevarianten der mRNA. RPS (Ribosomales Bindeprotein Small Subunit (Siaut *et al.* 2007).

Gen	ID	Nukleotidsequenz	Produkt- größe (bp)	Tm (°C)
RPS	10847	CGAAGTCAACCAGGAAACCAA GTGCAAGAGACCGGACATACC	166	60
GAPDH	51128/51129	ACGGCCGATGTTTCTATGGT ATCGGTCCTTGACGCCTT	100	60

Das Primerpaar für RPS (Ribosomal Protein, small Subunit 30S) (ID 10847) wurde von Siaut *et al.* (2007) übernommen. Die veröffentlichten Daten zur endogenen Kontrolle RPS wurden in dieser Arbeit zur eigenen Kontrolle wiederholt. Die bei Siaut *et al.* (2007) veröffentlichte Primer zur GAPDH (51128) wurde nicht verwendet, weil schon das obige Paar (siehe Tabelle 3) für die GAPDH angewendet wurde. Da diese Primer im Nukleotidbereich des reifen Proteins ansetzten, kann leider nicht zwischen der GAPDH GapC2 und GapC2b (Liaud *et al.*, 2000) unterschieden werden. Beide Gene kodieren das gleiche Protein auf dem Chromosom 16, diese sind auch in der Nukleotidsequenz des reifen Proteins zu 99% homolog. Nur in der Signal- und Transitsequenz unterscheiden sie sich stark genug voneinander, daß dort eine

spezifische Bindung von Primern möglich wäre. Daher die doppelte ID in der obigen Tabelle. Aus diesem Grund wurden alle Transkriptionsverhältnisse der verschiedenen Gene des Calvin Zyklus zueinander mit der endogenen Kontrolle RPS berechnet.

Die in Tabelle 7 aufgeführten Primer wurden zur Amplifikation ausgewählter Calvin Zyklus Gene herangezogen und, wie auch die endogene Kontrolle der GAPDH, mit der Software „Primer Express“ ABI PRISM Version 2.0.0 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) designt. Dabei wurde beachtet, daß die Annealing Temperatur (T_m (°C)) bei genau 60°C liegt. Teilweise waren aber mit dieser Temperatureinstellung in der Software „Primer Express“ keine passenden Primer zu designt, so daß die T_m von 56°C gewählt wurde. Ebenso wurde darauf geachtet, daß alle Primer so spezifisch wie möglich an das jeweilige Gen binden. Dazu wurden bei homologen Genen nur an die zueinander stark unterschiedlichen Signal- und Transitsequenzen die Primer designt. Wenn dies nicht anders möglich war, wurde in der Nukleotidsequenz des reifen Proteins, welcher keine konservierten Bereiche aufweist, Primer designt. Teilweise kamen dadurch unterschiedlich lange Nukleotidsequenzen heraus, welche aber allgemein dieselbe Elongationszeit hatten. Dies wurde mit einer Standard PCR getestet. Die Nukleotidsequenz des PCR-Produktes wurde wiederum einmal gegen das Genom von *Phaeodactylum tricornutum* geblastet (<http://genome.jgi-psf.org/Phatr2/Phatr2.home.html>) oder allgemeiner bei NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), um evtl. ähnliche Proteine zu finden. Es wurden alle Primer vorher auf Bildung von Selbstdimere mittels Standard PCR getestet. Aufgeführt ist das PCR Programm, wobei die Schritte 3 bis 5 insgesamt 35x wiederholt wurden: 1. Heizblock vorgewärmt: bei 80°C (Hotstart), 2. Prädenaturierung: bei 94°C mit 5 min, 3. Denaturierung: bei 94°C mit 10 sec, 4. Annealing: bei 60°C mit 12 sec, 5. Elongation: bei 72°C mit 10 sec, 6. Postelongation: bei 60°C mit 1 min, 7. Pause: bei 4°C. Nach der PCR wurden die Amplifikate auf ein 3%-iges Agarosegel aufgetragen, um zu erkennen, ob einmal sich Dimere (PCR lief ohne cDNA-Template) gebildet haben und ob das PCR-Produkt in der sich berechneten Größe einzeln im Gel vorkam. Zur Berechnung der Transkriptionsraten wurde zuerst von jedem einzelmem Primerpaar die spezifische Efficiency mittels RT-PCR ermittelt (Pfaffl 2001). Es wurden hierzu aus der gleichen cDNA, welche später zur Analyse herangezogen wurden, Verdünnungsreihen der cDNA Konzentration von 1/1, 1/2, 1/4, 1/6 mit steril gefiltertem dd. H₂O hergestellt.

Ausgeführt wurde das Programm der RT-PCR mit der Maschine 7500 Real Time PCR System (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) mit der Software Sequence Detection Software Version 1.2.3 mit dem Plugin: Relative Quantification v.1.2. build 29 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland). Der RT-PCR Mastermix war MESA GREEN qPCR, Mastermix Plus for SYBR (Refernce: RT-SY2X-03+WOULR, Eurogentec Deutschland GmbH, Köln, Deutschland).

Tab. 7: Oligonukleotidsequenz (Primer) für die Amplifikation der zu untersuchenden Gene. Die Nukleotidsequenzen werden immer in der 5' zu 3'-Richtung und in der Reihenfolge zuerst „upstream“, dann „downstream“ angegeben. Die Protein ID (Prot ID) wird als ID in der Tabelle angegeben, ID welche mit Querstrich (/) angeben sind, haben verschiedene Splicevarianten der mRNA.

Gen	ID	Nukleotidsequenz	Produktgröße (bp)	Tm (°C)
FBP	23247	CGTTTCGTCATGTCGTACACG GTCCTCGTTTTCTTCGGAA	250	60
FBPC1	42886	TTCCAGACGTCGACAGGACAA CGCTGGACGATGCGATTAATC	295	60
FBPC2	42456	CTGTCTTTTTTCGGCGATT TGGCTCCAAACAGTGTGTGA	249	60
FBPC3	31451	GGCGCTTTGGTTGCTTCTT CAATCGCACCAAACAGCGT	248	60
FBPC4	54279	CTGCAGTTTCCATCCAAGCGT TGCCTCACTCAAAAACCGG	301	60
TKL	50819	TCGTTTCGCAATTCGTTTCG TGGCGGTGCTCATTGAG	200	60
TAL	20779	TCGAACGGTCTAGGCATTGTC TCCCGTAAAACATCCCTGTGC	154	60
TAL	50313	ACTTGATTTTCGCCCTTTCCC ATCGTCGAGTGCCGTGTGTT	184	60
SBP	9583	TTCCGGACGTGTATCAGCAA AAAGGCGCTGCTTCAAACG	106	60
TAL	28222	TGCGACCGTTTTGACGATTTT AGCGAAGTTGCGGATACCATC	200	60
GPDH	54663	TTGTGGAGAAGCCCTTTGGTC TTCCAAACGCGCTCAAACC	175	60
GPDH	22916	TCCGTCATCACCTGAAACCT TTTCCCAGTCGCCATAACTC	103	56
PGL	31882	CCTCACCGAATCACCTTGACA ATACATCCCACACAACAGCAC	103	60
PGDH	54663	CGCAGTTAAAAAAGCCTCGC TCCAGAAACTCTCCACGACGA	163	60
PGDH	45333/26934	ATCATGAAGTGTGCCGCCA CCGTTGTGCACCATTTGAC	101	60
TKL	22135	TTGAGTAACGGACACGCCTGT TGGATTGATCTTGCGGAA	102	60

FTR	50907	ACGCCGGAAGAAGAGGAGATT TTGTGCTCAGCCAGTCCTTTG	146	60
Trx F	46280	GACGCGTCCAAACTGATGAAA TTCGATGGCTTCCGCATTG	114	60
Trx M	51357	TTGCTCCGCATTCTGTTCCT CGGTTTTCCCAACTGCCATA	152	60
NTR	51055	TGCAAAGTACGGCCAGAACA TTGGTATACGCCGATTGTGA	122	60
Trx H	56471	TCGAAAAGCTAGCGGAAGAGA TGGTCTGCCCCATCATT	157	60
Trx H	48539	TCGATGCGCTTGTCTGAA TGAAGAGCGGAGCAATCA	103	60

Das folgende Programm wurde bei allen relativen Quantifikationen der zu untersuchenden Gene angewendet, dabei wurden Schritt 3 und 4 40x wiederholt: 1. Heizblock vorgewärmt: bei 50°C (Hotstart), 2. Prädenaturierung: bei 95°C mit 10 min, 3. Denaturierung: bei 95°C mit 15 sec, 4. Annealing und Elongation: bei 60°C mit 1 min. Jede Real-Time PCR Reaktion wurde in 20 µl Volumen in einer 96-well Platte von Applied Biosystems durchgeführt. Alle Proben wurden in 3 Replikaten analysiert und jedes Experiment wurde mit drei verschiedenen Proben von cDNA wiederholt. Am Ende jeder Reaktion wurde der Cycle threshold (Ct) manuell auf den Level gesetzt, welcher die beste kinetischen PCR Parameter widerspiegelt. Aus den Real-Time PCR Läufen wurde anschließend zu jedem Primerpaar die Ct Value ermittelt, welche sich im linearen Bereich der Kurven befand (dazu wurde die Software Sequence Detection Software Version 1.2.3 mit dem Plugin: Relative Quantification v.1.2. build 29 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) benutzt). Aus drei gleichzeitig angesetzten PCR Mixturen für ein Gen und den daraus sich ergebenden Ct Values wurde dann nach Pfaffl (2001) die Efficiency berechnet.

Tabelle 1a und 1b: Anhang - *Phaeodactylum tricornutum*: Gene auf dem Genom von *Phaeodactylum tricornutum*, involviert in dem Kohlenstoffmetabolismus, sind öffentlich zugänglich bei <http://genome.jgi-psf.org/Phatr2/Phatr2.home.html>. Für jedes identifizierte Gen sind folgende Information in der Tabelle gegeben: Enzymname; allgemein übliche Abkürzung; designerter Stoffwechselweg; Protein Identifizierungsnummer (Prot ID); GenBank Accession Nummer (falls erhältlich); Anzahl von identifizierten Isoenzymen; genomische Koordinaten; der beste Blast Hit: Gen, Organismus, % Identität, GenBank Accession Nummer; Targeting Vorhersage: mTP: mitochondriales Targeting Peptid Score, SP: Signal Peptid Score, other: Wahrscheinlichkeit für andere Lokalisation, Loc: Vorhersage für Lokalisation, basierend auf die Scores von TargetP, RC: Verlässlichkeitsklasse, 1 = starke, 5 = schwache Vorhersage, TPlen: Länge für Transitpeptid, Regionen für vorhergesagte Signalpeptid Trennseite; zugeteilte Lokalisation: allgemeine Targeting Vorhersage. Targeting Vorhersage wurden durchgeführt mit TargetP (Emanuelsson *et al.* 1999) und SignalP Neuronal Networks (NN) (Nielsen *et al.* 1997) oder mit Hidden Markov Model (HMM) (Nielsen und Krogh 1998). Für detaillierte Beschreibung von Protein Lokalisationsvorhersage siehe auch Emanuelsson *et al.* (2007).

Phaeodactylum tricornutum				Best Blast Hit										Localisation									
Enzyme	Si-Name	own name	Pathway	Protein ID	Number of Iso-enzymes in Pt	genomic coordinates	gene	organism	% identity	accession no.	mTP	SP	other	Loc	RC	T/len	Cleavage site motif	location	ER-Relien flonm	AA-Sequen z			
6-phosphogluconate dehydrogenase, putativ	PGDH		Calvin cycle	45333		Pha2/2chr. 6:869375-871507	6-phosph Phosphat	68%	AAI76320	0.027	0.973	0.068	S	1	18	LES-IQT	ER/pps?	MFLTLL					
6-phosphogluconate dehydrogenase, putativ	PGDH	Pha1_441	Calvin cycle	29324		Pha2/2chr. 6:869375-871506	6-phosph Phosphat	68%	AAI76320	0.200	0.174	0.538	-	3	-	-	cytosol	MNSDGV					
Alcoholase	AL Class II		Calvin cycle	31147		Pha2/2chr. 29:203226-205163	hacabadi Arabidops	95%	AT5G43850	0.297	0.039	0.791	-	4	-	-	cytosol	MNSDGV					
Ferredoxin-Thioredoxin reductase	FTR	FtB	Electron transp	52607		Pha2/2chr. 7:807040-807764	ferredoxi Spinacia c	65%	CAAS2867	0.070	0.546	0.200	S	1	18	TOA-FMP	plastid	MKVFSL					
Fructose-1,6-bisphosphatase	FBP	FBP	Glucosogenesis	22947		Pha2/2chr. 22:379333-375312	fructose-1,6-bisphos	87%	NP_915841	0.043	0.104	0.333	-	1	-	-	cytosol	MKDFE					
Fructose-1,6-bisphosphatase	FBP	FBP	Calvin cycle	42456		Pha2/2chr. 11:7111-11854	fructose-1,6-bisphos	80%	CAC37908	SignalP HMM:0.989	Signal Peptid						VRA-FLP	plastid	MKALFP				
Fructose-1,6-bisphosphatase	FBP	FBP	Calvin cycle	31451		Pha2/2chr. 11:8907-120325	fructose-1,6-bisphos	45%	CAC38200	0.105	0.914	0.013	S	1	25	ARA-NSI	plastid	MNFKLK					
Fructose-1,6-bisphosphatase	FBP	FBP	Calvin cycle	42886		Pha2/2chr. 1:1417264-1418948	fructose-1,6-bisphos	39%	AAF79192	0.022	0.539	0.076	S	1	30	TNS-FQT	plastid	MEKWS					
Fructose-1,6-bisphosphatase	FBP	FBP	Calvin cycle	54279		Pha2/2chr. 4:1300960-1131624	fructose-1,6-bisphos	42%	CMO245C	0.030	0.566	0.025	S	1	28	IAQ-WIP	plastid	MGRGVI					
Fructose-1,6-bisphosphatase	FBP	FBP	Calvin cycle	325		Pha2/2chr. 10:2337961-160049	fructose-1,6-bisphos	99%	AAO43196	0.081	0.875	0.060	S	2	16	VVA-FAP	plastid	MKLSA					
Fructose-1,6-bisphosphatase	FBP	FbaC1	Calvin cycle	22993		Pha2/2chr. 20:567333-569313	fructose-1,6-bisphos	99%	AAO43232	0.171	0.815	0.077	S	2	16	CGA-FAP	plastid	MKIAVVA					
Fructose-1,6-bisphosphatase	FBP	FbaC2	Calvin cycle	42447		Pha2/2chr. 1:95522-97171	fructose-1,6-bisphos	97%	O8ELI2	0.088	0.194	0.751	-	3	-	-	cytosol	MLMVG					
Fructose-1,6-bisphosphatase	FBP	FbaC3	Calvin cycle	22014		Pha2/2chr. 14:707216-708875	fructose-1,6-bisphos	61%	XP_568771	0.133	0.095	0.837	-	2	-	-	cytosol	MATTDL					
Fructose-1,6-bisphosphatase	FBP	FbaC3	Glycolysis	21113		Pha2/2chr. 30:151448-130953	fructose-1,6-bisphos	91%	AAF27641	0.228	0.833	0.011	S	2	22	AAA-FSA	plastid	MRFSLC					
Glucose-6-phosphate dehydrogenase	GPDH		Calvin cycle	22916		Pha2/2chr. 20:281933-293923	glucose-6-phosphat	91%	BA979893	SignalP HMM:0.405	TargetP (mispredict as						ASC-DLA	cytosol	MICSLLI				
Glucose-6-phosphate dehydrogenase - 6-phosph	GPDH6PGD	G6PDH6P	Calvin cycle	54663		Pha2/2chr. 11:747438-750923	6-phosph Arabidops	48%	AT5G41670	0.152	0.188	0.594	-	3	-	-	cytosol/ER?	MPPSTI					
Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	Pha1_168	Calvin cycle	53878		Pha2/2chr. 28:197023-198823	glucose-6-phosphat	92%	BAO46305	0.038	0.215	0.893	-	2	-	-	cytosol	MDSLTS					
Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	PG2	Calvin cycle	23924		Pha2/2chr. 28:194949-197014	glucose-6-phosphat	65%	AAF93547	0.105	0.050	0.918	-	1	-	-	cytosol	MRALES					
Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	GLX1	Glycolysis	55512	3	Pha2/2chr. 29:61186-63623	glucose-6-phosphat	61%	ABH11444	0.025	0.889	0.063	S	1	26	SSA-FVP	plastid	MSCCAF					
Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	GLX2	Redox	18854	5	Pha2/2chr. 29:195096-196309	putative Candidia f	48%	XP_720834	0.121	0.055	0.886	-	2	-	-	cytosol	MILGFA					
Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	GLX2	Redox	52497	5	Pha2/2chr. 3:581207-582137	putative Candidia f	42%	XP_561474	0.026	0.544	0.082	S	1	19	CSS-ETL	pps ?	MILGFA					
Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	GLX2	Redox	43497	5	Pha2/2chr. 2:537531-538146	putative Candidia f	49%	XP_719021	SignalP HMM:0.997	Signal Peptid						AQA-WSV	plastid	MKLVSR				
Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	GLX2	Redox	39133	5	Pha2/2chr. 18:410710-411512	Glutared Synchoc	30%	ABE27080	0.185	0.846	0.043	S	2	16	AAA-FAP	plastid	MKSFAI					
Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	GLX2	Redox	37615	5	Pha2/2chr. 13:546609-547959	Glutared Synchoc	62%	ZP_01006911	0.070	0.074	0.475	-	5	-	-	mitochondria ?	MARISA					
Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	GSR	Redox regulation	49167		Pha2/2chr. 8:809718-811294	glutathion Physaru	98%	BAAS9433	0.083	0.082	0.860	-	2	-	-	cytosol	MATSDD					
Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	GSR	Redox regulation	49167		Pha2/2chr. 21:114002-115654	glutathion Physaru	98%	BAAS9433	0.083	0.082	0.860	-	2	-	-	cytosol	MSTSDD					
Glucose-6-phosphate isomerase	GPI	gestB	Redox regulation	28976		Pha2/2chr. 3:1164247-1166076	glutathion Toxoplas	94%	AAE96971	0.439	0.087	0.461	-	5	-	-	cytosol	MFCGS					
Glyceraldhyde-3-phosphat dehydrogenase	GAPDH / GapC1	GapC1	Calvin cycle	22122	3	Pha2/2chr. 15:748735-750259	glycerald Phaeocad:	100%	AAF34329	SignalP HMM:0.988	Signal Peptid						AAA-YSS	plastid	MKFSAA				
Glyceraldhyde-3-phosphat dehydrogenase	GAPDH / GapC2b	GapC2b	Calvin cycle	51128	3	Pha2/2chr. 16:704574-705999	cytosolic Phaeocad:	99%	AAF34325	0.614	0.077	0.296	M	4	76	-	cytosol	MPVSLG					
Glyceraldhyde-3-phosphat dehydrogenase	GAPDH / GapC2a	GapC2a	Calvin cycle	51129	3	Pha2/2chr. 16:730132-731560	cytosolic Phaeocad:	99%	AAF34325	0.397	0.101	0.414	-	5	-	-	cytosol	MPVSLG					
Glyceraldhyde-3-phosphat dehydrogenase	GAPDH / GapC2b	GapC2b	Calvin cycle	23598		Pha2/2chr. 25:254137-255640	glycerald Synchoc	96%	ZP_01124355	0.469	0.127	0.227	M	4	115	-	cytosol	MPVKCL					
NADPH dependig Ferredoxin-Thioredoxin reduct	NADPH-FTR		Redox regulation	51055		Pha2/2chr. 13:376900-379521	PREDICT1 Canis lup	84%	XP_541733	0.469	0.127	0.227	M	4	115	-	cytosol	MAGVPK					
NADPH dependig Ferredoxin-Thioredoxin reduct	NADPH-FTR		Redox regulation	51055		Pha2/2chr. 14:135292-137640	thioredoxin Acidipilli	45%	ZP_001736553	0.439	0.825	0.011	S	4	24	VHA-RPV	ER/pps?	MGRTML					
Peroxioredoxin	Pix		Redox regulation	22389		Pha2/2chr. 17:293018-294704	Alkyl hyd Trichodes	89%	ZP_00675699	0.073	0.546	0.016	S	1	22	VAS-TPI	ER	MVSYKI					
Peroxioredoxin	Pix		Redox regulation	95578		Pha2/2chr. 17:479395-480284	Thioredoxin Medicago	85%	ABE93230	0.115	0.902	0.024	S	2	21	TTS-FSS	plastid/pps?	MKLKLU					
Peroxioredoxin	Pix		Redox regulation	39534		Pha2/2chr. 16:335402-336015	unknown Arabidops	83%	AAF66133	0.868	0.025	0.260	M	3	15	KRK-VSA	mitochondria	MMHSX					
Peroxioredoxin	Pix		Redox regulation	55680		Pha2/2chr. 15:354487-355855	peroxired Candida a	47%	XP_715859	0.821	0.074	0.154	M	2	80	-	mitochondria	MLLKTI					
Peroxioredoxin	Pix		Redox regulation	48206		Pha2/2chr. 9:603561-604415	Peroxiored Nestos pu	40%	ZP_00110733	0.465	0.889	0.004	S	3	20	IAA-FSL	plastid	MILRVIF					
Peroxioredoxin	Pix		Redox regulation	17396		Pha2/2chr. 14:130704-131825	peroxired Triticum a	49%	AAV66923	0.130	0.841	0.013	S	1	18	VSG-FAP	plastid	MILRAFI					
Phosphogluconat lactonase	PGL		Calvin cycle	39631		Pha2/2chr. 16:568002-568914	PREDICT1 Rattus no	77%	ZP_214296	0.088	0.945	0.026	S	1	25	CHG-FVP	plastid	MKACSTI					
Phosphogluconat lactonase	PGL		Calvin cycle	13882		Pha2/2chr. 1:1167900-1168750	6-phosph Cryptococ	65%	CNE04030	0.125	0.111	0.807	-	2	-	-	cytosol	MVYSAS					
Phospho-glycerate kinase	PGK		Calvin cycle	22033		Pha2/2chr. 15:522021-523934	phospho Phaeocad:	100%	AAF48020	0.303	0.775	0.023	S	3	20	AAA-FAP	plastid	MKFVQA					
Phospho-glycerate kinase	PGK	PGK	Glycolysis	48983		Pha2/2chr. 20:222146-225862	phospho Phaeocad:	99%	AAF48021	0.959	0.014	0.066	M	1	42	VIC-AKM	mitochondria	MFRMLT					

Tabelle 1a: Anhang - *Phaeodactylum tricornutum*

Phaeodactylum tricornutum				Best Blast hit										Localisation									
Enzyme	Si-Name	own name	Pathway	Protein ID	Number of isoenzymes in Pt	genomic coordinates	gene	organism	% identity	accession no.	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen	Cleavage site motif	location	ER-Relen Item off	AA-Sequen z			
Phosphonitriblutikinas	FRK	FRK	Calvin cycle	50773		Phar2/chr. 3:1048272-1048620	phosho-1-omdeltella	87%	CA469502	0.399	0.451	0.083	S	5	15	AAA-FAP	plastid	MKFAVF					
Ribulose-5-phosphat isomerase	RPI	RPI	Calvin cycle	53926		Phar2/chr. 11:354707-355441	chloroplast Heterocist	73%	AAW79354	SignalP_HMM03669	Signal Peptide	17	AAA-FTN	plastid	MKSLTAG								
Ribulose-1,5-bisphosphat carboxylase / oxygen RUBISCO ISU	RPE1	Calvin cycle	17204		plastid genome	ribulose-1-ceanobci	96%	ZP_01306515	0.284	0.823	0.026	S	3	17	ASA-FAP	plastid	MKFTTVC						
Ribulose-5-phosphat epimerase	RPE	Calvin cycle	20015		Phar2/chr. 7:520079-520913	ribulose-1-arabidops	90%	NP_650495	0.023	0.770	0.405	S	4	23	cybsol	MHSFCF							
Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	SBP	Calvin cycle	9583		Phar2/chr. 1:115412-116574	sedohep1-chlamydc	81%	BA594305	0.088	0.079	0.909	1	-	cybsol	MPEAAS								
Thoredoxin Domain	?	?	?	47444		Phar2/chr. 13:636458-639142	Thoredox Magnetes	30%	ZP_00207953	0.115	0.792	0.055	S	2	18	VDA-GLH	ER/pps?	MHGLGV					
Thoredoxin Domain	?	?	?	45252		Phar2/chr. 6:616000-616981	Thoredox Nannochl	41%	BA042332							MORRWI							
Thoredoxin Domain	?	?	?	44324		Phar2/chr. 4:371663-372426	Thoredox Nannochl	29%	BA042332							MVGVWV							
Thoredoxin Domain, vcher als Thoredoxin y be ?	?	?	?	44562		Phar2/chr. 4:907110-908414	Thoredox Cyanothe	50%	ZP_01726260	0.053	0.544	0.024	S	1	y	SignalP_HMM1	AH-plastid (SignalP	MAVPSV					
Thoredoxin Domain, vcher als Trx H bezeichne ?	?	?	?	53522		Phar2/chr. 6:274715-275407	putative 1-arabidops	27%	AAU62595	SignalP_HMM03663	Signal Peptide	29	TEA-FOV	plastid	MHSKTS								
Thoredoxin Domain, vcher als Trx X bezeichne ?	?	?	?	43450		Phar2/chr. 7:189076-189245	Thoredox Chlamydc	31%	XP_001091599	0.281	0.061	0.068	S	4	40	TDS-FAA	plastid, cytosol	MTLTDG					
Thoredoxin f	Trx F	Trx F	Redox regulation	45280	6	Phar2/chr. 11:954989-97295	Thoredox Cyanidios	52%	Cinn729C	0.137	0.059	0.827	3	-	-	MTLIEG							
Thoredoxin h	Trx H	Trx-h2	Redox regulation	49539	6	Phar2/chr. 9:802194-802929	Thoredox Helicospo	51%	AAU93947	0.212	0.553	0.123	S	4	33	ATA-FAP	plastid	MNIOQQ					
Thoredoxin h	Trx Hc	Trx-h1	Redox regulation	59471	6	Phar2/chr. 18:155395-156112	Thoredox Xenospo	61%	NP_001085522	0.067	0.501	0.055	S	1	21	GDA-VOG	ppa?	MRSYLL					
Thoredoxin h	Trx H, longer varia		Redox regulation	48141		Phar2/chr. 9:520403-521204	Thoredox Xenospo	61%	NP_001085522	0.031	0.125	0.954	1	-	-	GDA-VOG	ppa?	MRSYLL					
Thoredoxin h	Trx H, shorter varia		Redox regulation	59201	6	Phar2/chr. 16:319845-320422	Thoredox Cycloag	39%	P39628	0.011	0.563	0.129	S	3	31	GYL-KSI	ER/pps, cytosol	MSTCOI					
Thoredoxin m	Trx M	Trx-m	Redox regulation	51357	6	Phar2/chr. 16:319845-320413	Thoredox Cycloag	39%	P39628	0.133	0.697	0.141	S	3	20	VLT-NKI	ER/pps, cytosol	MCLKAW					
Thoredoxin o	Trx O	Trx-o	Redox regulation	51320	6	Phar2/chr. 1:770516-770917	Thoredox Synchoc	85%	F12243	0.517	0.745	0.009	S	4	29	CSA-FCS	plastid	MYFRAC					
Thoredoxin y	Trx Y	Trx-y	Redox regulation	33356	6	Phar2/chr. 3:685869-686303	Thoredox Flavobact	68%	ZP_01105321	0.918	0.037	0.020	M	1	28	RSMS-VI	mitochondria	MSITIAA					
Thoredoxin y	Trx Y	Trx-y	Redox regulation	43384	6	Phar2/chr. 2:309544-309949	Thoredox Chlamydc	63%	AAO20257	0.433	0.683	0.020	S	4	17	IEG-FYR	plastid	MRSLLMA					
Transaldolase	TAL	TAL	Calvin cycle	50313		Phar2/chr. 3:685869-686303	Thoredox Acaryochl	36%	AAO20257	0.015	0.586	0.034	S	1	25	IEG-FYR	plastid	MYSITMR					
Transaldolase	TAL	TAL	Calvin cycle	20779		Phar2/chr. 28:288081-288952	transaldol Methylab	96%	YP_045764	0.495	0.751	0.020	S	4	16	SSG-FAP	plastid	MKSLVP					
Transaldolase	TAL	FSA	Calvin cycle	23222		Phar2/chr. 10:231990-232894	Putative 1-synchoc	97%	ZP_01084071	0.587	0.759	0.006	S	5	28	VWG-WTP	plastid	MAISRF					
Transketolase	TKL	Phar1_438	Calvin cycle	21135		Phar2/chr. 11:457005-458167	transaldol Rattus no	94%	83688	0.058	0.076	0.939	-	1	-	cybsol	MNSOYE						
Transketolase	TKL	TKL	Calvin cycle	52819		Phar2/chr. 15:72639-727129	probable Neurospo	98%	CAC18218	0.052	0.109	0.929	-	1	-	cybsol	MSELEC						
Triosephosphat isomerase	TPI	TKI	Calvin cycle	50728		Phar2/chr. 4:1171012-117199	transketo Dictyostel	98%	XP_645046	0.389	0.493	0.059	S	5	19	AOG-FTG	plastid	MKFSSV					
Triosephosphat isomerase	TPI	Phar1_253	Calvin cycle	18228		Phar2/chr. 2:1241688-1242757	Trioseph delta proh	99%	EAT04169	0.292	0.760	0.032	S	3	17	ATA-FAP	plastid	MKFLAI					
Triosephosphat isomerase	TPI	TIM	Calvin cycle	54728		Phar2/chr. 2:858561-859627	Trioseph Carboxydc	98%	ABB15245	0.072	0.875	0.077	S	2	18	ISA-FTV	plastid	MKISSA					
Triosephosphat isomerase - Glyceraldehyd-3-TPH-GAPDH / TPI	TPH	TPH/GapC3	Glycolysis	25208		Phar2/chr. 13:594581-596684	Trioseph Zea may	97%	F12863	0.126	0.073	0.964	M	2	2	LTE-ARK	mitochondria	MPPDCC					
biophysikal protein				55583		Phar2/chr. 7:248279-250278	Glycerol Phytopyrit	100%	F39888	0.925	0.027	0.087	M	1	27	LTE-ARK	mitochondria	MLASSR					
NAD-dependent glycol-3-phosphat dehydng				1631		Phar2/chr. 7:248279-250278	Mycesim-Homo sap	52%	AAI15035	0.200	0.456	0.220	S	4	22	TNA-EVA	plastid	MKYGKI					
NAD-dependent glycol-3-phosphat dehydng				1800		Phar2/chr. 3:13261-140178	NAD-Dep Tetrahym	41%	XP_001032725	0.055	0.284	0.885	S	2	-	cybsol	MGAADR						
lysyl-tRNA synthetase				43384		Phar2/chr. 3:13261-140178	NAD-Dep Tetrahym	41%	XP_001032725	0.072	0.181	0.856	-	4	-	cybsol	MSSGLK						
lysyl-tRNA synthetase				43384		Phar2/chr. 6:962913-965499	lysyl-tRNA Tetrahym	33%	XP_317411	0.330	0.057	0.837	-	3	-	cybsol	MSSGLK						
gaa-pol polyproteine				1833		Phar2/chr. 16:363163-365287	methytra Franckia sp	43%	YP_480878	0.047	0.082	0.951	-	1	-	cybsol	MODLLE						
Myosin Class II heavy chain kinase				35403		Phar2/chr. 8:173402-5437	gaa-pol p Phaeodac	62%	AC-A08881	0.363	0.033	0.682	S	4	-	cybsol	MARVRK						
Thiopurine S-methyltransferase, putative splice variant of Protein ID 56587				55585		Phar2/chr. 10:361415-362033	Myosin c1 Ostraeoc	35%	CAL50197	0.074	0.663	0.034	S	2	22	SOA-FLG	plastid	MOTVTR					
Thiopurine S-methyltransferase, putative splice variant of Protein ID 56585				55587		Phar2/chr. 21:417965-418000	thiopurine Myxococ	43%	YP_632497	0.088	0.075	0.913	-	1	-	cybsol	MFLPCC						

Tabelle 1b: Anhang - Phaeodactylum tricornutum

Tabelle 2a und 2b: Anhang - *Thalassiosira pseudonana*: Gene auf dem Genom von *Thalassiosira pseudonana*, involviert in dem Kohlenstoffmetabolismus, sind öffentlich zugänglich bei <http://genome.jgi-psf.org/Thaps3/Thaps3.home.html>. Für jedes identifizierte Gen sind folgende Informationen in der Tabelle gegeben: Enzymname; allgemein übliche Abkürzung; designierter Stoffwechselweg; Protein Identifizierungsnummer (Prot ID); GenBank Accession Nummer (falls erhältlich); Anzahl von identifizierten Isoenzymen; genomische Koordinaten; der beste Blast Hit: Gen, Organismus, % Identität, GenBank Accession Nummer; Targeting Vorhersage: mTP: mitochondriales Targeting Peptid Score, SP: Signal Peptid Score, other: Wahrscheinlichkeit für andere Lokalisation, Loc: Vorhersage für Lokalisation, basierend auf den Scores von TargetP, RC: Verlässlichkeitsklasse, 1 = starke, 5 = schwache Vorhersage, TPlen: Länge für Transitpeptid, Regionen für vorhergesagte Signalpeptid Trennseite; zugeteilte Lokalisation: allgemeine Targeting Vorhersage. Targeting Vorhersagen wurden durchgeführt mit TargetP (Emanuelsson *et al.* 1999) und SignalP Neuronal Networks (NN) (Nielsen *et al.* 1997) oder mit Hidden Markov Model (HMM) (Nielsen und Krogh 1998). Für detaillierte Beschreibungen von Protein Lokalisationsvorhersagen siehe auch Emanuelsson *et al.* (2007).

Thalassiosira pseudonana				Best Blast hit		Localisation														
Enzyme	SI-Name	own name	Pathway	Protein ID	Number of iso-enzymes In Th	genomic coordinates	gene	organism%	identity	accession n no.	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen	Cleavage site motif	location	ER-Referentio nmotif	AA-Sequenz
6-phosphogluconate dehydrogenase	P6DH		Calvin cycle	3900		Thaps3/chr. 3:2077667-2078204					0.131	0.055	0.854	-	2	-	-	cytosol		MEELCTGLI -
6-phosphogluconate dehydrogenase	P6DH		Calvin cycle	33543		Thaps3/chr. 4:1222361-1223933					0.223	0.056	0.734	-	3	-	-	cytosol		MSNDVGLYI -
Albise	AL Class II		Calvin cycle	270296		Thaps3/chr. 8:247294-249350					SignalP HMM0.097 targetP (mispredict as signalpep)							cytosol		MSFLVNLVI -
Ferredoxin-Thioredoxin reductase	FTR		Redox regulation	26406		Thaps3/chr. 13:610874-511571					0.344	0.904	0.046	S	1	17	IWA-LNT	plastid		MISRSALLT -
Fructose-1,6-bisphosphatase	FBP		Glycolysis	255250		Thaps3/chr. 3:938327-938432					0.346	0.195	0.932	-	1	-	-	cytosol		MSEQYVD -
Fructose-1,6-bisphosphatase	FBP		Calvin cycle	25437		Thaps3/chr. 18:784836-786566					0.446	0.517	0.041	S	5	22	SSV-IAF	plastid		MKRLLCVAV -
Fructose-1,6-bisphosphatase	FBP		Calvin cycle	5901		Thaps3/chr. 5:1614424-1616006					0.183	0.759	0.033	S	3	24	SSC-LVN	plastid		MALOSKHQ -
Fructose-1,6-bisphosphatase	FBP		Calvin cycle	478		Thaps3/chr. 4:2703842-2705103					0.061	0.101	0.911	-	1	-	-	cytosol		MAETAERKA -
Fructose-1,6-bisphosphatase	FBP	ALDO2	Calvin cycle	21748		Thaps3/chr. 3:936110-936008					0.325	0.546	0.079	S	4	19	ADA-FTS	plastid		MKFGFALFA -
Fructose-1,6-bisphosphatase	FBP		Glucocogenesis	11761		Thaps3/chr. 22:382395-384387					0.083	0.192	0.757	-	3	-	-	cytosol		MINNEIMHP -
Fructose-5-phosphatase	GFDH		Glucocogenesis	270288		Thaps3/chr. 6:1178651-1180215					0.364	0.089	0.900	-	1	-	-	cytosol		MYTRCDYPA -
Glucose-5-phosphatase	GFI		Calvin cycle	28388		Thaps3/chr. 5:1649496-1647208					0.368	0.057	0.940	-	1	-	-	cytosol		MYTGDYDS -
Glucose-5-phosphatase	GFI		Calvin cycle	39873		Thaps3/chr. 3:1428195-1430363					SignalP HMM0.0 TargetP (mispredict as signalpep)							cytosol		MSVGGYFN -
Glucose-5-phosphatase	GFI		Glycolysis	270301		Thaps3/chr. 4:2256687-2298112					0.226	0.933	0.070	S	1	30	VSS-LLL	plastid		MSVGHYNM -
Glucose-5-phosphatase	GFI		Calvin cycle	270302		Thaps3/chr. 11a:623785-626199					0.421	0.040	0.625	-	4	-	-	cytosol		MINRSQAV -
Glucose-5-phosphatase	GFI		Calvin cycle	38266		Thaps3/chr. 19a:19364435-386277					0.131	0.056	0.839	-	2	-	-	cytosol		MTGVESTTA -
Glutaredoxin	GLRX		Redox	270291		Thaps3/chr. 2:572621-573511					0.127	0.830	0.039	S	2	19	TAA-AFI	plastid		MKFPVAILG -
Glutaredoxin	GLRX		Redox	23837		Thaps3/chr. 8:997809-998174					SignalP HMM0.135 targetP (mispredict as sign)							cytosol		MLHRLTTS -
Glutaredoxin	GLRX		Redox	270295		Thaps3/chr. 2:356230-356833					0.065	0.100	0.903	-	1	-	-	cytosol		MESPTITYG -
Glutaredoxin	GLRX		Redox	270296		Thaps3/chr. 1:2374305-2374695					0.317	0.818	0.031	S	3	17	TSA-FCC	plastid		MKILVYFLIV -
Glutaredoxin	GLRX		Redox	3733		Thaps3/chr. 3:1679960-1680580					0.071	0.918	0.021	S	1	34	SHA-FAP	plastid		MTYKPTRS -
Glutaredoxin	GLRX		Redox	270299		Thaps3/chr. 6:261919-262578					0.167	0.800	0.041	S	2	17	ALA-FJS	plastid		MKTSLATAL -
Glutaredoxin	GLRX		Redox	270300		Thaps3/chr. 17:416800-417505					0.266	0.712	0.040	S	3	16	CSA-FAP	plastid		MYHSLFIATI -
Glutaredoxin Domain and Thioredoxin Domain	?			5415		Thaps3/chr. 5:1146967-1151337					0.135	0.225	0.698	-	3	-	-	cytosol		MERKLVYV -
Glutathione reductase	GsR		Redox regulation	41433		Thaps3/chr. 11a:278227-279468					0.200	0.224	0.550	-	4	-	-	cytosol		MAIDIATDA -
Glutathione reductase	GsR		Redox regulation	41379		Thaps3/chr. 7:1734535-1736341					0.344	0.144	0.907	-	2	-	-	cytosol		MTTYDYNIH -
Glutathione reductase	GsR		Redox regulation	29457		Thaps3/chr. 11a:308945-310854					SignalP HMM 0 TargetP (mispredict as signalpep)							cytosol		MHHHGHQR -
Glutathione Synthase				29512		Thaps3/chr. 20:45400-47667					0.044	0.298	0.626	-	3	-	-	cytosol		MYSHLSTA -
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH		Calvin cycle	270231		Thaps3/chr. 1:1404394-1405891					SignalP HMM0.999 Signal Peptide not				15		ASA-YAP	plastid		MKFFAALSL -
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	GAPDH		Glycolysis	35616		Thaps3/chr. 8:86240-863467					0.306	0.149	0.358	-	5	-	-	cytosol		MYTCVAVNGI -
NADPH oxidizing Ferredoxin-Thioredoxin reductase	NADPH-FTR		Redox regulation	270256		Thaps3/chr. 4:432722-441951					0.428	0.883	0.004	S	3	18	TTA-RFY	plastid/pps?		MSMLRTVLL -
NADPH oxidizing Ferredoxin reductase	NADPH-FTR		Redox regulation	40200		Thaps3/chr. 4:44483-441935					0.064	0.098	0.933	-	1	-	-	cytosol		MAEIKRDP -
NADPH oxidizing Ferredoxin reductase	NADPH-FTR		Redox regulation	39754		Thaps3/chr. 2:2685713-2687674					0.066	0.142	0.874	-	2	-	-	cytosol		MTPDGHTPI -
Periredoxin	Pir		Redox regulation	1936		Thaps3/chr. 1:276992-2767888					0.039	0.936	0.093	S	1	21	CNA-YTP	plastid/pps?		MISTQLLSL -
Periredoxin	Pir		Redox regulation	3114		Thaps3/chr. 3:165744-156438					0.148	0.725	0.148	S	3	17	ATA-FAP	plastid		MKFTTGLAI -
Periredoxin	Pir		Redox regulation	11178		Thaps3/chr. 19a:19356949-357724					0.116	0.878	0.035	S	2	19	AAA-IFP	ER		MKLLRLATA -
Periredoxin, putative splice variant of Protein ID 270263	Pir		Redox regulation	270261		Thaps3/chr. 20:108898-110394					SignalP HMM0.219 TargetP (mispredict as sign)							cytosol		KDEL
Periredoxin, putative splice variant of Protein ID 270271	Pir		Redox regulation	270263		Thaps3/chr. 20:108898-110394					0.168	0.355	0.408	-	5	-	-	cytosol		MMNVAKSC -
Periredoxin	Pir		Redox regulation	270263		Thaps3/chr. 20:108898-110394					0.080	0.428	0.559	-	6	-	-	cytosol		MMNVAKSC -
Periredoxin	Pir		Redox regulation	270374		Thaps3/chr. 3:165677-156438					0.142	0.699	0.176	S	3	17	ATA-FAP	plastid		MKFTTGLAI -

Tabelle 2a: Anhang - Thalassiosira pseudonana

Thalassiosira pseudonana					Best Blast hit		Localization												
Enzyme	SI-Name	own name	Pathway	Protein ID	Number of Iso-enzymes In Th	genomic coordinates	gene	organism's identity	accession no.	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen	Cleavage site motif	location	ER-Retention motif	AA-Sequenz
Phosphoglucuronat lactonase	PGL		Calvin cycle	5080		Thaps3/chr. 5:321931-322851				SignalP HMM: 0.017 TargetP (mispredict) as slight							cytosol		IASPILLSPI -
Phospho-glycerate kinase	PKG		Glycolysis	42577		Thaps3/chr. 16a:200515-202295				0.990 0.065 0.890							cytosol		MATKCCISD -
Phospho-glycerate kinase	PKG		Glycolysis	25116		Thaps3/chr. 16a:152794-154678				0.155 0.057 0.840							cytosol		MKLSKTKVN -
Phospho-glycerate kinase	PKG		Calvin cycle	270304		Thaps3/chr. 7:117219-1172951				0.067 0.838 0.050				18	18	ASA-FAP	plastid		MKLFNAALI -
Phospho-glycerate kinase	PKG		Glycolysis	269007		Thaps3/chr. 6:687522-689258				0.374 0.039 0.638							ctosol		MYNKTVLVF -
Phospho-glycerate kinase	PKG		Glycolysis	39501		Thaps3/chr. 3:1042707-1044026				0.369 0.079 0.927							ctosol		MKVDLNVPI -
Phosphoglucose-1,7-bisphosphatase	PRK		Calvin cycle	43276		Thaps3/chr. 4:670636-671605				0.196 0.709 0.176							plastid		MKFLVASLJ -
Ribose-5-phosphatase isomerase	RPI		?	32252		Thaps3/chr. 2:1066222-1067048				0.355 0.084 0.955							cytosol		MTSGEELVI -
Ribose-5-phosphatase isomerase	RPI		Calvin cycle	270308		Thaps3/chr. 2:1061227-1062252				0.688 0.431 0.035			M	4	18	VAA-FAP	plastid		MKFLAAFAA -
Ribulose-1,5-bisphosphatase carboxylase / oxygenase, larg RLBISCO ISU	RBC		Calvin cycle	40538		plastid genome											plastid		MSQSVGER -
Ribulose-1,5-bisphosphatase carboxylase / oxygenase, smRLBISCO sSU	RBC		Calvin cycle	40539		plastid genome											plastid		MRLTGGCF -
Ribulose-5-phosphatase epimerase	RPE		Calvin cycle	6803		Thaps3/chr. 3:2106540-2107855				0.341 0.243 0.820							cytosol		MVWGDNKY -
Ribulose-5-phosphatase epimerase	RPE		Calvin cycle	270306		Thaps3/chr. 3:1103115-1164039				0.343 0.610 0.044			S	4	17	ASA-FAP	plastid		MKFSALFSA -
Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase	SBP		Calvin cycle	3523		Thaps3/chr. 10:371959-374479				0.995 0.055 0.919							cytosol		MSSEOPSY -
Thioredoxin Domain	?		Calvin cycle	270310		Thaps3/chr. 9:430656-421677				0.276 0.622 0.26							ER/pps?		MRYLPLPLS -
Thioredoxin f	TrxF		Redox regulation	270330		Thaps3/chr. 2:1827595-1828706				0.264 0.879 0.021			S	2	19	THA-FAP	plastid		MTRLTLTLC -
Thioredoxin h	TrxH		Redox regulation	5491		Thaps3/chr. 5:1356627-1357434				0.376 0.679 0.011			S	5	17	ALA-SSG	ER/pps?		MKFTLSLAT -
Thioredoxin h	TrxH		Redox regulation	41697		Thaps3/chr. 9:430656-421677				0.028 0.197 0.932							cytosol		MVKPVESEK -
Thioredoxin h	TrxH		Redox regulation	270273		Thaps3/chr. 22:530832-531641				0.507 0.895 0.003			S	4	20	ASS-ARS	ER/pps?		MRR7ALIAT -
Thioredoxin m	TrxM		Redox regulation	29789		Thaps3/chr. 13:137259-138116				0.010 0.996 0.097			S	1	29	VAT-QLA	ER/pps?		MSCILGGV -
Thioredoxin o	TrxO		Redox regulation	40293		Thaps3/chr. 4:1042586-1043376				SignalP HMM: 0.296 Signal Peptide not				46		TYA-FLP	plastid/pps?		MPSHORCH -
Thioredoxin o	TrxO		Redox regulation	270255		Thaps3/chr. 4:1930063-1930741				SignalP HMM:0.001 targetP (mispredict) as slight							mitochondria		MFLRRSFT -
Thioredoxin y	TrxY		Redox regulation	24557		Thaps3/chr. 5:725781-728841				0.448 0.822 0.012			S	4	30	VSS-LSF	ER/pps?		MTSPHGRR -
Thioredoxin y	TrxY		Redox regulation	30505		Thaps3/chr. 20:37403-38183				0.047 0.085 0.955							cytosol		MEELGWDE -
Thioredoxin y	TrxY		Redox regulation	9599		Thaps3/chr. 14:135157-136034				0.429 0.771 0.007			S	4	19	ASA-FVA	plastid		MHRSTMLL -
Transaldolase	TAL		Calvin cycle	11651		Thaps3/chr. 22:20395-21713				0.155 0.406 0.279			S	5	19	SIT-AFS	plastid		MKLDIALFAL -
Transaldolase	TAL		Calvin cycle	270305		Thaps3/chr. 11a:770712-772030				0.155 0.406 0.279			S	5	19	SIT-AFS	plastid		MKLDIALFAL -
Transaldolase	TAL		Calvin cycle	4331		Thaps3/chr. 4:771955-772903				0.127 0.881 0.017			S	2	28	SAA-FTP	plastid		MHLSTFTL -
Transaldolase	TAL		Calvin cycle	27187		Thaps3/chr. 2:1789185-1790381				0.071 0.101 0.898							cytosol		MASQVQLI -
Transaldolase	TAL		Calvin cycle	28678		Thaps3/chr. 1:1406706-1409097				0.257 0.150 0.798							cytosol		MEPTTKRAI -
Transketolase	TKL		Calvin cycle	21175		Thaps3/chr. 2:486307-488517				0.366 0.134 0.846							cytosol		MAALATAAN -
Transketolase	TKL		Calvin cycle	270314		Thaps3/chr. 7:613989-620968				0.343 0.725 0.022			S	4	18	SSA-FTT	plastid		MKFLSTIAV -
Triosephosphate isomerase	TPI		Calvin cycle	40538		Thaps3/chr. 6:56791-57245				0.466 0.047 0.518							cytosol		MHOHTTSG -
Triosephosphate isomerase	TPI		Calvin cycle	7429		Thaps3/chr. 7:1648896-1649850				0.245 0.130 0.418							cytosol		MKRVIVAGN -
Triosephosphate isomerase	TPI		Calvin cycle	8590		Thaps3/chr. 10:1026883-1027970				0.439 0.606 0.031			S	5	17	ASA-FTA	plastid		MKFLSATLL -
Triosephosphate isomerase	TPI		Calvin cycle	30390		Thaps3/chr. 18:3744893-375691				0.302 0.095 0.696							cytosol		MKFSACKI -
Triosephosphate isomerase - Glyceraldehyd-3-phosphat TPI-GAPDH	TPI		Glycolysis	28239		Thaps3/chr. 5:488138-490555				0.744 0.035 0.242			M	3	28	KLE-ARK	mitochondria		MLSNTYTKV -
CPI2	CFI2		Redox regulation	270287		Thaps3/chr. 3:12789-13626				0.162 0.772 0.059			S	2	21	SNA-FFN	plastid		MKTTASLAI -

Tabelle 2b: Anhang - *Thalassiosira pseudonana*

Literaturverzeichnis

Adler K, Arkona C, Manteuffel R, Süss KH (1993) Electron-microscopical localization of chloroplast proteins by immunogold labelling on cryo-embedded spinach leaves. *Cell Biol. Int* 17: 213-220

Allen JT, Brown L, Sanders R, Moore CM, Mustard A, Fielding S, Lucas M, Rixen M, Savidge G, Henson S, Mayor D (2005) Diatom carbon export enhanced by silicate upwelling in the northeast Atlantic. *Nature* 437 (7059): 728-732

Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389–402

Andersen RA (2004) Biology and systematics of heterokont and haptophyte algae. *Am J Bot* 91 (10): 1508-1522

Apt KE, Kroth-Pancic PG, Grossman AR (1996) Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mol Gen Genet* 252:572–579

Apt KE, Zaslavkaia L, Lippmeier JC, Lang M, Kilian O, Wetherbee R, Grossman, AR, Kroth PG (2002) In vivo characterization of diatom multipartite plastid targeting signals. *J Cell Sci* 115 (Pt 21): 4061-4069

Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, *et al.* (2004) The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science* 306: 79–86.

Assmy P, Henjes J, Klaas C, Smetacek V (2007) Mechanisms determining species dominance in a phytoplankton bloom induced by the iron fertilization experiment EisenEx in the Southern Ocean. *Deep-Sea Research* 54: 340-362

Badger MR, Bek EJ (2008) Multiple Rubisco forms in proteobacteria: their functional significance in relation to CO₂ acquisition by the CBB cycle. *J Exp Bot*, in press, doi:10.1093/jxb/erm297

Bähler M (2000) Are class III and class IX myosins motorized signalling molecules? *Biochim Biophys Acta* 1496: 52-59

Banmeyer I, Marchand C, Clippe A, Knoop B (2005) Human mitochondrial peroxiredoxin 5 protects from mitochondrial DAN damages induced by hydrogen peroxide. *FEBS Letters* 579: 2327-2333

Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340:783–795

Bhattacharya D, Archibald JM, Weber AP, Reyes-Prieto A (2007) How do endosymbionts become organelles? Understanding early events in plastid evolution. *Bioessays* 29 (12): 1239-1246

- Boczar** BA, Denlany TP, Cattolicio RA (1998) Gene for the ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase small subunit protein of the marine chromophyte *Olisthodiscus luteus* is similar to that of a chemoautotrophic bacterium. Proc Natl Acad Sci USA 86: 4996-4999
- Boggetto** N, Gontero B, Maberly SC (2007) Regulation of Phosphoribulokinase and Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase in freshwater diatom, *Asterionella formosa*. J Phycol 43: 1227–1235
- Bouck** GB (1965) Fine structure and organelle associations in brown algae. J Cell Biol 26: 523-537
- Boyd** PW, Jickells T, Law CS, Blain S, Boyle EA, Buesseler KO, Coale KH, Cullen JJ, de Baar HJW, Follows M, Harvey M, Lancelot C, Levasseur M, Owens NPJ, Pollard R, Rivkin RB, Sarmiento J, Schoemann V, Smetacek V, Takeda S, Tsuda A, Turner S, Watson AJ (2007) Mesoscale Iron Enrichment Experiments 1993-2005: Synthesis and Future Directions. Science 315: 612-617
- Bradford** M (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry 72: 248-254
- Brandes** HK, Larimer FW, Geck MK, Stringer CD, Schürmann P, Hartman FC (1993) Direct identification of the primary nucleophile of thioredoxin f. J Biol Chem 268 (25):18411-18414
- Brehelin** C, Meyer EH, de Souris JP, Bonard G, Meyer Y (2003) Resemblance and dissemblance of *Arabidopsis* type II peroxiredoxins: similar sequences for divergent gene expression, protein localization, and activity. Plant Physiol 132: 2045-2057
- Buc** J, Riviere M, Gontero B, Sauve P, Meunier JC, Ricard J (1984) Affinity chromatography, on fructose-bisphosphatase-Sepharose, of two chloroplastic thioredoxins F. Purification and comparative molecular properties. Eur J Biochem 140 (1): 199-202
- Buchanan** BB (1980) Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. Ann Rev Plant Physiol 31: 341-374
- Buchanan** BB (1984) The Ferredoxin/Thioredoxin system: a key element of the regulatory function of light in photosynthesis. Bioscience 34: 378-383
- Buchanan** BB (1991) Regulation of CO₂ assimilation in oxygenic photosynthesis: the Ferredoxin/Thioredoxin system. Perspective on its discovery, present status and future development. Arch Biochem Biophys 288: 1-9
- Buchanan** BB, Balmer Y (2005) Redox Regulation: A Broadening Horizon. Rev in Advance 56: 187-220
- Buchanan** BB, Luan S (2005) Redox regulation in the chloroplast thylakoid lumen: a new frontier in photosynthesis research. J Exp Bot 56(416):1439-1447

- Buchanan** BB, Schürman P, Kalberer PP (1971) Ferredoxin-activated fructose-1,6-bisphosphatase of spinach chloroplasts. Resolution of the system, properties of the alkaline fructose diphosphate component and physiological significance of the ferredoxin-linked activation. *J Biol Chem* 246: 5952-5959
- Buchanan** BB, Wolosiuk RA, Schürmann P (1979) Thioredoxin and enzyme regulation. *Trends Biochem Sci* 4: 93-95
- Buesseler** KO, Doney SC, Karl DM, Boyd PW, Caldeira K, Chai F, Coale KH, de Baar HJW, Falkowski PG, Johnson KS, Lampitt RS, Michaels AF, Naqvi SWA, Smetacek V, Takeda S, Watson AJ (2008) Ocean Iron Fertilization-Moving Forward in a Sea of Uncertainty. *Science* 319: 162
- Cadet** F, Meunier JC (1988) pH and kinetic studies of chloroplast sedoheptulose-1,7-bisphosphatase from spinach (*Spinacia oleracea*). *Biochem J* 253 (1): 249-254
- Calvin** M (1956) The photosynthetic carbon cycle. *J Chem Soc* 1956: 1895-1915
- Calvin** M, Benson AA (1948) The Path of Carbon in Photosynthesis. *Science* 107 (2784): 476-480
- Capitani** G, Markovic-Housley Z, del Val G, Morris M, Jansonius JN, Schürmann P (2000) Crystal structures of two functionally different thioredoxins in spinach chloroplasts. *J Mol Biol* 302 (1): 135-154
- Cavalier-Smith** T (1999) Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. *J Eukaryot Microbiol* 46 (4): 347-366
- Cavalier-Smith** T (2003) Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358 (1429): 109-134
- Charles** SA, Halliwell B (1980) Action of calcium ions on spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplasts fructose bisphosphatase. *Biochem J* 185: 689-694
- Cheng** NH, Hirschi KD (2003) Cloning and characterization of CXIP1, a novel PICOT domain-containing *Arabidopsis* protein that associates with CAX1. *J Biol Chem* 278: 6503-6509
- Chew** O, Rudhe C, Glaser E, Whelan J (2003) Characterization of the targeting signal of dual-targeted pea glutathione reductase. *Plant Mol Biol* 53: 341-356
- Chiadmi** M, Navaza A, Miginiac-Maslow M, Jacqout JP, Cherils J (1999) Redox signalling in the chloroplast: structure of oxidized pea fructose-1,6-bisphosphate phosphatase. *EMBO J* 18: 6809-6815
- Chisti** Y (2007) Biodiesel from microalgae. *Biotechnol Adv* 25 (3): 294-306

Collin V, Issakidis-Bourguet E, Marchand C, Hirasawa M, Lancelin JM, Knaff DB, Miginiac-Maslow M (2003) The *Arabidopsis* plastidial thioredoxins: new functions and new insights into specificity. *J Biol Chem* 278 (26): 23747-23752

Cotgreave IA, Gerdes R, Schuppe-Koistinen I, Lind C (2002) S-glutathionylation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: role of thiol oxidation and catalysis by glutaredoxin. *Methods Enzymol* 148: 175-182

Daniell H (1997) Transformation and foreign gene expression in plants by microprojectile bombardment. *Methods Mol Biol* 62: 463-489

del Val G, Maurer F, Stutz E, Schürmann P (1999) Modification of the reactivity of spinach chloroplast thioredoxin *f* by site-directed mutagenesis. *Plant Sci* 149 (2): 183-190

Delwiche CF (1999) Tracing the Thread of Plastid Diversity through the Tapestry of Life. *Am Nat* 154 (S4): 164-177

DeRocher EJ, Quigley F, Mache R, Bohnert HJ (1993) The six genes of the Rubisco small subunit multigene family from *Mesembryanthemum crystallinum*, a facultative CAM plant. *Mol Gen Genet* 239: 450-462

Dietz KJ (2003) Plant peroxiredoxins. *Annu Rev Plant Biol* 54: 93-107

Dietz KJ, Jacob S, Oelze ML, Laxa M, Tognetti V, de Miranda SM, Baier M, Finkemeier I (2006a) The function of peroxiredoxins in plant organelle redox metabolism. *J Exp Bot* 57 (8): 1697-1709

Dietz KJ, Stork T, Finkemeier I, Lamkemeyer P, Li WX, El-Tayeb MA, Michel KP, Pistorius E, Baier M (2006b) The role of peroxiredoxins in oxygenic photosynthesis of cyanobacteria and higher plants: peroxide detoxification or redox sensing? In: Demmig-Adams B, Adams W, Mattoo A, eds. *Photoprotection, photoinhibition, gene regulation, and environment*. Berlin: Springer: 303-319

Du YC, Hong S, Spreitzer RJ (2000) *RbcS* suppressor mutations improve the thermal stability and CO₂/O₂ specificity of *rbcL*-mutant ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase. *PNAS* 97 (26): 14206-14211

Eck RV, Dayhoff MO (1966) Atlas of protein sequence and structure. Natl Biomed Res Found, Silver Spring

Eicks M, Maurino V, Knappe S, Flügge UI, Fischer K (2002) The plastidic pentose phosphate translocator represents a link between the cytosolic and the plastidic pentose phosphate pathways in plants. *Plant Physiol* 128 (2): 512-522

Eisen JA, Coyne RS, Wu M, Wu D, Thiagarajan M, Wortman JR, Badger JH, Ren Q, Amedeo P, Jones KM, Tallon LJ, Delcher AL, Salzberg SL, Silva JC, Haas BJ, Majoros WH, Farzad M, Carlton JM, Smith Jr. RK, Garg J, Pearlman RE, Karrer KM, Sun L, Manning G, Elde NC, Turkewitz AP, Asai DJ, Wilkes DE, Wang Y, Cai H, Collins K, Stewart BA, Lee SR, Wilamowska K, Weinberg Z, Ruzzo WL, Wloga D, Gaertig J, Frankel J, Tsao CC, Gorovsky MA, Keeling PJ, Waller RF, Patron NJ, Cherry JM, Stover NA, Krieger CJ, del Toro C, Ryder HF, Williamson SC, Barbeau RA, Hamilton EP, Orias E (2006) Macronuclear Genome Sequence of the Ciliate *Tetrahymena thermophila*, a Model Eukaryote. PLoS Biol 9 (4): e286

Eklund H, Cambillau C, Sjoberg BM, Holmgren A, Jornvall H, Hoog JO, Branden CI (1984) Conformational and functional similarities between glutaredoxin and thioredoxins. EMBO J 3: 1443-1449

Eklund H, Gleason, FK, Holmgren A (1991). Structural and functional relations among thioredoxins of different species. Proteins: Struct Funct Genet 11: 13-28

Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. Nature Protocols 2: 953-971

Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G (2000) Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. J Mol Biol 300: 1005–1016

Fagan T, Hastings JW, Morse D (1998) The phylogeny of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase indicates lateral gene transfer from cryptomonads to dinoflagellates. J Mol Evol 47: 633-639

Falkowski PG, Barber RT, Smetacek VV (1998) Biogeochemical controls and feedbacks on ocean primary production. Science 281: 200-207

Fast NM, Kissinger JC, Roos DS, Keeling PJ (2001) Nuclearencoded, plastid-targeted genes suggest a single common origin for apicomplexan and dinoflagellate plastids. Mol Biol Evol 18: 418-426

Field CB, Behrenfeld MJ, Randerson JT, Falkowski P (1998) Primary production of the biosphere: integrating terrestrial and oceanic components. Science 281: 237-240

Finkemeier I, Goodman M, Lamkemeyer P, Kandlbinder A, Sweetlove LJ, Dietz KJ (2005) the mitochondrial type II peroxiredoxin F is essential for redox homeostasis and root growth of *Arabidopsis thaliana* under stress. J Biol Chem 280: 12168-12180

Florencio FJ, Yee BC, Johnsen TC, Buchanan BB (1988) An NADP/thioredoxin system in leaves: purification and characterization of NADP-thioredoxin reductase and thioredoxin h from spinach. Arch Biochem Biophys 266: 496-507

Foth BJ, Goedecke MC, Soldati D (2006) New insights into myosin evolution and classification. Proc Natl Acad Sci USA 103 (10): 3681-3686

Foth BJ, McFadden GI (2003) The apicoplast: a plastid in *Plasmodium falciparum* and other apicomplexan parasites. I Rev Cytology 224: 57-110

- Foyer** CH, Noctor G (2005) Redox homeostasis and antioxidant signaling: a metabolic interface between stress perception and physiological response. *Plant Cell* 17: 1866-1875
- Fratelli** M, Gianazza E, Ghezzi P (2004) Redox proteomics: identification and functional role of glutathionylated proteins. *Expert Rev Proteomics* 1: 365-376
- Fritsch** WM (1977) on the problem of discovering the most parimonius tree. *Am Nat* 111: 223-257
- Fritz** CC, Wolter FP, Schenkemeyer V, Hergt T, Schreier PH (1993) The gene family encoding the ribulose-(1,5)-bisphosphate carboxylase/oxygenase (Rubisco) small subunit of potato. *Gene* 137: 271-274
- Fujita** Y, Freese E (1979) Purification and properties of fructose-1,6-bisphosphatase of *Bacillus subtilis*. *J Biol Chem* 254 (12): 5340-5349
- Furusawa** T, Ikawa S, Yanai N, Obinata M (2000) Isolation of a novel PDZ-containing myosin from hematopoietic supportive bone marrow stromal cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 270: 67-75
- Gao** X, Havecker ER, Baranov PV, Atkins JF, Voytas DF (2003) Translational recording signals between gag and pol in diverse LTR retrotransposons. *RNA* 9: 1422-1430
- Garcia** GA, Leatherbarrow RJ, Eckstein F, Fersht AR (1990) Metal ion dependence of phosphorothioate ATP analogues in the *Bacillus stearothermophilus* tyrosyl-tRNA synthetase reaction. *Biochemistry* 29 (6): 1643-1648
- Geigenberger** P, Kolbe A, Tiessen A (2005) Redox regulation of carbon storage and partitioning in response to light and sugars. *J Exp Bot* 56: 1469-1479
- Gelhaye** E, Rouhier N, Jacquot JP (2003) Evidence for a subgroup of thioredoxin h that requires GSH/Grx for its reduction. *FEBS L* 555 (4): 443-448
- Ghezzi** P, Bonetto V, Fratelli M (2005) Thiol-disulfide balance: from the concept of oxidative stress to that of redox regulation. *Antioxid Redox Signal* 7: 964-972
- Gibbs** SP (1981) The chloroplast endoplasmic reticulum: Structure, function, and evolutionary significans. *Int Rev Cytol* 72: 49-99
- Gillot** MA, Gibbs SP (1980) The cryptomonad nucleomorph: Its ultrastructure and evolutionary significance. *J Phycol* 16: 558-568
- Gilmartin** PM, Memlink J, Hiratsuka K, Kay SA Chua NH (1992) Characterization of a gene encoding a DNA binding protein with specificity for a light-responsive element. *Plant Cell* 4: 839-849

- Giordano M**, Beardall J, Raven JA (2005) CO₂ concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annu Rev Plant Biol* 56: 99-131
- Goldman E.**, Rosenberg A.H., Zubay G., Studier F.W. (1995) Consecutive low-usage leucine codons block translation only when near the 5' end of a message in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 245 (5): 467-473
- Gomori G** (1943) Hexosedisphosphatase. *J Biol Chem* 148: 139-149
- Gontero B**, Meunier JC, Ricard J (1984a) Purification and properties of a chloroplastic phosphatase distinct from fructose bisphosphatase. *Plant Sci Lett* 36 (2): 137-142
- Gontero B**, Meunier JC, Richard J (1984b) On the activation of two chloroplastic phosphatases by fructose bisphosphate, seduheptulose bisphosphate and magnesium. *Plant Sci Lett* 36: 195-199
- Gould SB**, Sommer MS, Hadfi K, Zauner S, Kroth PG, Maier UG (2006a) Protein Targeting into the Complex Plastid of Cryptophytes. *J Mol Evol* 62 (6): 674-681
- Gould SB**, Sommer MS, Kroth PG, Gile GH, Keeling PJ, Maier UG (2006b) Nucleus-to-nucleus gene transfer and protein retargeting into a remnant cytoplasm of cryptophytes and diatoms. *Mol Biol Evol* 23 (12): 2413-2422
- Goyer A**, Haslekas C, Miginiac-Maslow M, Klein U, Le Marechal P, Jacquot JP, Decottignies P (2002) Isolation and characterization of a thioredoxin-dependent peroxidase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem* 269 (1): 272-282
- Grant CM**, Quinn KA, Dawes IW (1999) Differential protein S-thiolation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isoenzymes influences sensitivity to oxidative stress. *Mol Cell Biol* 19: 2650-2656
- Gross W**, Lenze D, Nowitzki U, Weiske J, Schnarrenberger C (1999) Characterization, cloning, and evolutionary history of the chloroplast and cytosolic class I aldolases of the red alga *Galdieria sulphuraria*. *Gene* 230: 7-14
- Gruber A**, Vugrinec S, Hempel F, Gould SB, Maier UG, Kroth PG (2007) Protein targeting into complex diatom plastids: functional characterisation of a specific targeting motif. *Plant Mol Biol* 64 (5): 519-530
- Gutteridge S**, Gatenby AA (1995) Rubisco synthesis, assembly, mechanism and regulation. *Plant Cell* 7: 809-819
- Hackett JD**, Anderson DM, Erdner DL, Bhattacharya D (2004) Dinoflagellates: a remarkable evolutionary experiment. *Am J Bot* 91 (10): 1523-1534
- Han PF**, Owen GS, Johnson J (1975) Purification and properties of fructose 1,6-bisphosphatase from turkey liver. *Arch Biochem Biophys* 168 (1): 171-179

- Hansmann P**, Falk H, Scheer U, Sitte P (1987) Ultrastructural localisation of DNA in two *Cryptomonas* species by use of a new monoclonal DNA antibody. *Eur J Cell Biol* 42: 152-160
- Hatano-Iwasaki A**, Yanagida M, Henmi K, Iwabuchi M, Ogawa K (2002) Involvement of glutathion in light-intensity-dependent flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 43: s79
- Hermoso R**, Castillo M, Chueca A, Lazaro JJ, Sahrawy M, López-Gorgé J (1996) Binding site on pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase involved in the interaction with thioredoxin. *Plant Mol Biol* 105 (3): 455-465
- Hermoso R**, Lázaro JJ, Chueca A, Sahrawy, López-Gorgé J (1999) Purification and binding features of a pea fructose-1,6-bisphosphatase domain involved in the interaction with thioredoxin *f*. *Phys Plantarum* 105: 756-762
- Hisabori T**, Hara S, Fujii T, Yamazaki D, Hosoya-Matsuda N, Motohashi K (2005) Thioredoxin affinity chromatography: a useful method for further understanding the thioredoxin network. *J Exp Bot* 56 (416): 1463-1468
- Holmgren A** (1976) Hydrogen donor system for *Escherichia coli* ribonucleoside-disphosphate reductase dependent upon glutathione. *Proc Natl Acad Sci USA* 73: 2275-2279
- Holweg C**, Nick P (2004) Arabidopsis myosin XI mutant is defective in organelle movement and polar auxin transport. *PNAS* 101 (28): 10488-10493
- Hosoya-Matsuda N**, Motohashi K, Yoshimura H, Nozaki A, Inoue K, Ohmori M, Hisabori T (2005) Anti-oxidative stress system in cyanobacteria. Significance of type II peroxiredoxin and the role of 1-Cys peroxiredoxin in *Synechocystis* sp. Strain PCC 6803. *J Biol Chem* 280: 840-846
- Howard TP**, Metodiev M, Lloyd JC, Raines CA (2008) Thioredoxin-mediated reversible dissociation of a stromal multiprotein complex in response to changes in light availability. *Proc Natl Acad Sci USA* 105 (10): 4056-4061
- Hunter SC**, Ohlrogge JB (1998) Regulation of spinach chloroplast acetyl-CoA Carboxylase. *Arch Biochem Biophys* 359: 170-178
- Hwang SR**, Tabitas FR (1991) Cotranscription, Deduced Primary Structure, and Expression of the Chloroplast-encoded *rbcL* and *rbcS* Genes of the Marine Diatom *Cylindrotheca* sp. Strain N1. *J Biol Chem* 266 (10): 6271-6279
- Ishida K**, Cavalier-Smith T, Green BR (2000) Endomembrane structure and the chloroplast protein targeting pathway in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae, Chromista). *J Phycol* 36: 1135-1144
- Ito H**, Iwabuchi M, Ogawa K (2003) The sugar-metabolic enzymes aldolase and triose-phosphate isomerase are targets of glutathionylation in *Arabidopsis thaliana*: detection using biotinylated glutathione. *Plant Cell Physiol* 44: 655-660

- Jacquot** JP, Lopez-Jaramillo J, Chueca A, Cherfils J, Lemaire S, Chedozeau B, Miginiac-Maslow M, Decettignies P, Wolosiuk RA, Lopez-Gorgé J (1995) High-level expression of recombinant pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase and mutagenesis of its regulatory site. *Eur J Biochem* 229: 675-681
- Jacquot** JP, Lopez-Jaramillo J, Miginiac-Maslow M, Lemaire S, Cherfils J, Chueca A, Lopez-Gorge J (1997) Cysteine-153 is required for redox regulation of pea chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *FEBS L* 401 (2-3): 143-147
- Jaquot** JP, Rivera-Madrid R, Marinho P, Kollarova M, Le Maréchal P, Miginiac-Maslow M, Meyer Y (1994) *Arabidopsis thaliana* NADPH Thioredoxin reductase. cDNA characterization and expression of recombinant protein in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 235: 1357-1363
- Jarvis** P, Soll J (2001) Toc, Tic, and chloroplast protein import. *Biochim Biophys Acta* 1541: 64-79
- Johnson** TC, Wada K, Buchanan BB, Holmgren A (1987) Reduction of Purothionin by the Wheat Seed Thioredoxin System. *Plant Physiol* 85 (2): 446-451
- Kapralov** MV, Filatov DA (2007) Widespread positive selection in the photosynthetic Rubisco enzyme. *BMC Evol Biol* 7: 73-83
- Keeling** PJ (2004) Diversity and evolutionary history of plastids and their hosts. *Am J Bot* 91 (10): 1481-1493
- Keeling** PJ, Archibald JM, Fast NM, Palmer JD (2004) Comment on "The evolution of modern eukaryotic phytoplankton". *Science* 306 (5705): 2191
- Kelly** GJ, Zimmermann G, Latzko E (1982) Fructose bisphosphatase from spinach leaf chloroplast and cytoplasm. In *Methods in Enzymology* (Edited by Meister A) 90: 371-378. Academic Press, New York
- Kennedy** RA, Pumpho ME, Fox TC (1992) Anaerobic metabolism in plants. *Plant Physiol* 1000: 1-6
- Kilian** O, Kroth PG (2005) Identification and characterization of a new conserved motif within the presequence of proteins targeted into complex diatom plastids. *Plant J* 41 (2): 175-183
- Kintisch** E (2007) Should Oceanographers Pump Iron? *Science* 318: 1368-1370
- Kleber-Janke** T, Becker WM (2000) Use of modified BL21 (DE3) *Escherichia coli* cells for high-level expression of recombinant peanut allergens affected by poor codon usage. *Protein Expr Purif* 19 (3): 419-424
- Klöck** G, Kreuzberg K (1989) Kinetic properties of a *sn*-glycerol-3-phosphate dehydrogenase purified from the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* 991: 347-352

Knight S, Anderson I, Branden CI (1990) Crystallographic analysis of ribulose 1,5 bisphosphate carboxylase from spinach at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol* 215: 113-160

Kobayashi T, Kishigami S, Sone M, Inokuchi H, Mogi T, Ito K (1997) Respiratory chain is required to maintain oxidized states of the DsbA-DsbB disulfide bond formation system in aerobically growing *Escherichia coli* cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94 (22): 11857-11862

König J, Baier M, Horling F, Kahmann U, Harris G, Schürmann P, Dietz KJ (2002) The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthesis electron flux. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 5738-5743

König J, Lotte K, Plessow R, Brockhinke A, Baier M, Dietz KJ (2003) Reaction mechanism of the 2-Cys Peroxiredoxin: role of the C-terminus and the quaternary structure. *J Biol Chem* 278: 2440-24420

Kooistra WH, De Stefano M, Mann DG, Medlin LK (2003) The phylogeny of the diatoms. *Prog Mol Subcell Biol* 33: 59

Kozaki A, Mayumi K, Sasaki Y (2001) Thiol-disulfide exchange between nuclear-encoded and chloroplast-encoded subunits of pea acetyl-CoA Carboxylase. *J Biol Chem* 276: 39919-39925

Krogh A, Larsson B, von Heijne G, Sonnhammer ELL (2001) Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: Application to complete genomes. *J Mol Biol* 305 (3): 567-580

Kroth PG (2002) Protein transport into secondary plastids and the evolution of primary and secondary plastids. *Int Rev Cytol* 221: 191-255

Kroth PG (2007) Genetic transformation; a tool to study protein targeting in diatoms, chap. 17. In: *Methods in molecular biology*, 2nd edn., Totowa, NJ, USA: Humana Press

Kroth PG, Chiovitti A, Gruber A, Martin-Jezequel V, Mock T, Schnitzler Parker M, Stanley MS, Kaplan A, Caron L, Weber T, Maheswari U, Armbrust EV, Bowler C (2007) A Model for Carbohydrate Metabolism in the Diatom *Phaeodactylum tricorutum* Deduced from Comparative Whole Genome Analysis. *Plos one* (1): e1426

Kumar S., Tamura K., and Nei M. (2004) MEGA3: Integrated software for Molecular Evolutionary Genetics Analysis and sequence alignment. *Briefings in Bioinformatics* 5: 150-163

La Roche J, Boyed PW, McKay RML, Geider RJ (1996) Flavodoxin as an *in situ* marker for iron stress in phytoplankton. *Nature* 382: 802-805

- Laloi C**, Rayapuram N, Chartier Y, Grienenberger JM, Bonnard G, Meyer Y (2002) Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proc. Natl Acad Sci USA* 98: 14144-14149
- Lam E**, Chua NH (1990) GT-1 binding site confers light responsive expression in transgenic tobacco. *Science* 248: 471-474
- Lankemeyer P**, Laxa M, Collin V, Li W, Finkemeier I, Schottler MA, Holtkamp V, Tognetti VB, Issakidis-Bourguet E, Kandlbinder A, Weis E, Miginiac-Maslow M, Dietz KJ (2006) PrxQ of *Arabidopsis thaliana* is attached to the thylakoids and functions in context of photosynthesis. *Plant J* 45: 968-981
- Laurent TC**, Moore EC, REichard P (1964) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotides. IV. Isolation and characterization of Thioredoxin, the hydrogen donor from *Escherichia coli* B. *J Biol Chem* 239: 3436-3444
- Lebreton S**, Andreescu S, Graciet E, Gontero B (2006) Mapping of the interaction site of CP12 with glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii*. Functional consequences for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *FEBS J* 273: 3358-69
- Lemaire SD** (2004) The glutaredoxin family in oxygenic photosynthetic organism. *Photosynth Res* 79: 305-318
- Lemaire SD**, Michelet L, Zaffagnini M, Massot V, Issakidis-Bourguet E (2007) Thioredoxins in chloroplasts. *Curr Genet* 51 (6): 343-365
- Liaud MF**, Lichtle C, Apt K, Martin W, Cerff R (2000) Compartment-specific isoforms of TPI and GAPDH are imported into diatom mitochondria as a fusion protein: evidence in favor of a mitochondrial origin of the eukaryotic glycolytic pathway. *Mol Biol Evol* 17 (2): 213-223
- Lloyd JC**, Horsnell PR, Dyer TA, Raines CA (1991a) Structure and sequences of a wheat phosphoribulokinase gene. *Plant Mol Biol* 17: 167-168
- Lloyd JC**, Raines CA, John UP, Dyer TA (1991b) The chloroplast FBPase gene of wheat: Structure and expression of the promoter in photosynthetic and meristematic cells of transgenic tobacco plants. *Mol Gen Genet* 225: 209-216
- Ludwig M**, Gibbs SP (1989) Evidence that the Nucleomorph of *Chlorarachnion reptans* (Chlorarachniophyceae) are vestigial nuclei: Morphology, division and DNA-DAPI fluorescence. *J Phycol* 25: 385-394
- Maheswari U**, Montsant A, Goll J, Krishnasamy S, Rajyashri KR, Patell VM, Bowler C (2005) The Diatom EST Database. *Nucleic Acids Res* 33: D344-347
- Mann DG** (1999) The species concept in diatoms. *Phycologia* 38: 437-495

- Marchand C**, Le Maréchal P, Meyer Y, Decottignies P (2006) Comparative proteomic approaches for the isolation of proteins interacting with thioredoxin. *Proteomics* 6 (24): 6528-6537
- Marchand C**, Le Maréchal P, Meyer Y, Miginiac-Maslow M, Issakidis-Bourguet E, Decottignies P (2004) New targets of *Arabidopsis* thioredoxins revealed by proteomic analysis. *Proteomics* 4: 2696-2706
- Marcus F**, Harrisch PB (1990) Amino acid sequence of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase. *Arch Biochem Biophys* 279: 151-157
- Marcus F**, Moberly L, Latshaw S (1988) Comparative amino acid sequence of fructose-1,6-bisphosphatases: Identification of a region unique to the light-regulated chloroplast enzyme. *Proc Acad Sci* 85: 5379-5383
- Martin W**, Scheibe R, Schnarrenberger C (2000) The Calvin cycle and its regulation. In: Leegood RC, Sharkey TD, von Caemmerer S, eds (2000) *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp 9-51
- Martin W**, Schnarrenberger C (1997) The evolution of the Calvin cycle from prokaryotic to eukaryotic chromosomes: a case study of functional redundancy in ancient pathways through endosymbiosis. *Curr Genet* 32 (1): 1-18
- McFadden GI** (1999) Plastids and protein targeting. *J Eukaryotic Microbiol* 46: 339-346
- Meunier JC**, Buc J, Soulie JM, Pradel J, Richard J (1981) Substrate binding isotherms of spinach chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase (EC 3.1.3.11) and the photoregulation of the Calvin Cycle. *Eur J Biochem* 113: 513-520
- Meyer AJ**, Hell R (2005) Glutathione homeostasis and redox-regulation by sulfhydryl groups. *Photosynth Res* 86: 435-457
- Michelet L**, Zaffagnini M, Marchand C, Collin V, Decottignies P, Tsan P, Lancelin JM, Trost P, Miginiac-Maslow M, Noctor G, Lemaire SD (2005) Glutathionylation of chloroplast thioredoxin f is a redox signaling mechanism in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 102 (45): 16478-16483
- Michelet L**, Zaffagnini M, Massot V, Keryer E, Vanacker H, Miginiac-Maslow M, Issakidis-Bourguet E, Lemaire SD (2006) Thioredoxins, glutaredoxins, and glutathionylation: new crosstalks to explore. *Photosynth Res* 89 (2-3): 225-245
- Michels AK**, Wedel N, Kroth PG (2005) Diatom plastids possess a phosphoribulokinase with an altered regulation and no oxidative pentose phosphate pathway. *Plant Physiol* 137 (3): 911-920
- Miginiac-Maslow M**, Lancelin JM (2002) Intrasteric inhibition in redox signalling: light activation of NADP-malate dehydrogenase. *Photosynth Res* 72: 1-12

- Mittler** R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F (2004) Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 9: 490-498
- Montell** C, Rubin GM (1988) The *Drosophila ninaC* locus encodes two photoreceptor cell specific proteins with domains homologous to protein kinases and the myosin heavy chain head. *Cell* 52 (5): 757-772
- Montsant** A, Jabbari K, Maheswari U, Bowler C (2005) Comparative genomics of the pennate diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol* 137 (2): 500-513
- Moore** EC, Reichert P, Thelander L (1964) Enzymatic synthesis of deoxyribonucleotids. V. Purification and properties of Thioredoxin reductase from *Escherichia coli* B. *J Biol Chem* 239: 3445-3452
- Moore** RB, Obornik M, Janouskovec J, Chrudimsky T, Vancova M, Green DH, Wright SW, Davies NW, Bolch CJ, Heimann K, Slapeta J, Hoegh-Guldberg O, Logsdon JM, Carter DA (2008) A photosynthetic alveolate closely related to apicomplexan parasites. *Nature* 451 (7181): 959-963
- Motohashi** K, Kondoh A, Stumpp MT, Hisabori T (2001) Comprehensive survey of proteins targeted by chloroplast thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci USA* 98 (20): 11224-11229
- Motohashi** K, Koyama F, Nakanishi Y, Ueoka-Nakanishi H, Hisabori T (2003) Chloroplast cyclophilin is a target protein of thioredoxin. Thiol modulation of the peptidyl-prolyl cis-trans isomerase activity. *J Biol Chem* 278 (34): 31848-31852
- Murata** N, Kume N, Okada Y, Hori T (1979) Preparation of girdle lamella-containing chloroplasts from the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Cell Physiol* 20 (6): 1047-1053
- Nalin** CM, McCarty RE (1984) Role of a disulfide bond in the γ subunit in activation of the ATPase of chloroplast coupling factor 1. *J Biol Chem* 259 (11): 7275-7280
- Nassoury** N, Cappadocia M, Morse D (2003) Plastid ultrastructure defines the protein import pathway in dinoflagellates. *J Cell Sci* 116: 2867-2874
- Navrot** N, Collin V, Gualberto J, Gelhaye E, Hirasawa M, Rey P, Knaff DB, Issakidis E, Jacquot JP, Rouhier N (2006) Plant glutathione peroxidases are functional peroxiredoxins distributed in several subcellular compartments and regulated during biotic and abiotic stresses. *Plant Physiol* 142 (4): 1364-1379
- Nel** W, Terblanche SE (1992) Plant fructose-1,6-bisphosphatases: characteristics and properties. *Int J Biochem* 24 (8): 1267-1283
- Nicholas** KB, Nicholas HB, Deerfield DW (1997) GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *EMBNEW NEWS* 4: 14

Nielsen H, Engelbrecht J, Brunak S, von Heijne G (1997) A neural network method for identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Int J Neural Syst* 8:581-599

Nielsen H, Krogh A (1998) Prediction of signal peptides and signal anchors by a hidden Markov model. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 6:122-130

Nishizawa AN, Buchanan BB (1981) Enzyme regulation in C4 photosynthesis. Purification and properties of thioredoxin-linked fructose biphosphatase and sedoheptulose biphosphatase from corn leaves. *J Biol Chem* 256 (12): 6119-6126

Nishizawa AN, Yee BC, Buchanan BB (1982) Chloroplast fructose-1,6-biphosphatase from spinach leaves. In *Methods in Chloroplast Molecular Biology* (Edited by Edelman M, Hallick RB, Chua NH) 707-713. Elsevier Biomedical, Amsterdam

Nosenko T, Lidie KL, Van Dolah FM, Lindquist E, Cheng JF, Bhattacharya D (2006) Chimeric Plastid Proteome in the Florida "Red Tide" Dinoflagellate *Karenia brevis*. *Mol Biol Evol* 23 (11): 2026-2038

Oesterhelt C, Klocke S, Holtgreffe S, Linke V, Weber AP, Scheibe R (2007) Redox-regulation of chloroplast enzymes in *Galdieria sulphuraria* in view of eukaryotic evolution. *Plant Cell Physiol* 48 (9): 1359-1373

Ogawa K (2005) Glutathione-associated regulation of plant growth and stress response. *Antioxid REdox Sinal* 7: 973-981

Ogawa K, Hatano-Iwasaki A, Tokuyoma M, Iwabuchi M (2002) A possible role of glutathione as an electron source for flowering in *Arabidopsis thaliana*. In PS2001 Proceedings, S20-30, CSIRO Publishing, Colingwood

Orellana MV, Perry MJ (1992) An immunoprobe to measure RUBISCO concentrations and maximal photosynthetic rates of individual phytoplankton cell. *Limnol Oceanogr* 37: 478-490

Orellana MV, Perry MJ (1995) Optimization of an immunofluorescent assay of the internal enzyme ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase (RUBISCO) in single phytoplankton cells. *J Phycol* 31: 785-794

Otsuki T (2001) A study for the biological CO₂ fixation and utilization system. *Sci Total Environ* 277 (1-3): 21-25

Parker MS, Armbrust EV (2005) Synergistic effects of light, temperature, and nitrogen source on transcription of genes for carbon and nitrogen metabolism in the centric diatom *Thalassiosira pseudonana* (Bacillariophyceae). *J Phycol* 41 (6): 1142-1153

Pedrajas JR, Miranda-Vizuete A, Javanmardy N, Gustafsson JA, Spyrou G (2000) Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* contain one-conserved cysteine type peroxiredoxin with thioredoxin peroxidase activity. *J Biol Chem* 275: 16296-16301

- Pelzer-Reith** B, Freund S, Schnarrenberger C, Yatsuki H, Hori K (1995) The plastid aldolase gene from *Chlamydomonas reinhardtii*: Intron/exon organization, evolution, and promotor structure. *Mol Gen Genet* 248: 481-486
- Petersen** J, Brinkmann H, Cerff R (2003) Origin, evolution and metabolic role of a novel glycolytic GAPDH enzyme recruited by land plant plastids. *J Mol Evol* 57: 16-26
- Petkewich** R (2008) Fertilization the Ocean with iron. Large-scale experiments will determine whether plankton can battle climate change. *S&EN* 86 (13): 30-33
- Pfaffl** MW (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29 (9): e45
- Pfaffl** MW, Horgan GW, Dempfle L (2002) Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* 30 (9): e36
- Pohlmeier** K, Paap BK, Soll J, Wedel N (1996) CP12: a small nuclear-encoded chloroplast protein provides novel insights into higher plant GAPDH evolution. *Plant Mol Biol* 32: 969-978
- Portis** AR Jr (1990) Rubisco activase. *Biochem Biophys Acta* 1015: 15-28
- Portis** AR Jr (2003) Rubisco activase - Rubisco's catalytic chaperone. *Photosynth Res* 75: 11-27
- Portis** AR Jr, Salvucci ME, Ogren WL (1986) Activation of ribulosephosphate carboxylase/oxygenase at physiological CO₂ and ribulose biphosphate concentrations by rubisco activase. *Plant Physiol* 82: 967-971
- Pradel** J, Soulie JM, Bus J, Meunier JC, Richard J (1981) Substrate-binding isotherms of spinach chloroplastic fructose-1,6-bisphosphatase (EC 3.1.3.11) and the photoregulation of the Calvin Cycle. *Eur J Biochem* 113: 507-511
- Preiss** J, Biggs ML, Greenberg E (1967) The effect of magnesium ion concentration on the pH optimum of the spinach leaf alkaline fructose disphosphatase. *J Biol Chem* 242: 2292-2294
- Qin** J, Clore GM, Gronenborn AM (1994) The high-resolution three-dimensional solution structures of the oxidized and reduced states of human thioredoxin. *Structure* 2: 503-522
- Quigley** F, Martin W, Cerff R (1988) Intron conservation across the prokaryote-eukaryote boundary: Structure of the nuclear gene for chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2672-2676
- Raines** CA, Lloyd JC, Longstaff M, Bradley D, Dyer TA (1988) Chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase: the product of a mosaic gene. *Nucleic Acid Res* 16: 7931-7942

- Raines** CA, Lloyed JC, Willingham NM, Potts S, Dyer TA (1992) cDNA and gene sequences of wheat chloroplast seduheptulose-1,7-bisphosphatase reveal homology with fructose-1,6-bisphosphatases. *Eur J Biochem* 205 (3): 1053-1059
- Rakus** D, Pasek M, Krotkiewski H, Dzugaj A (2004) Interaction between muscle aldolase and muscle fructose 1,6-bisphosphatase results in the substrate channeling. *Biochem* 43 (47): 14948-14957
- Read** BA, Tabita FR (1994) High substrate specificity factor ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase from eukaryotic marine algae and properties of recombinant cyanobacterial Rubisco containing "algal" residue modifications. *Arch Biochem Biophys* 312 (1): 210-218
- Reichert** A, Dennes A, Vetter S, Scheibe R (2003) Chloroplast fructose 1,6-bisphosphatase with changed redox modulation: comparison of the *Galdieria* enzyme with cysteine mutants from spinach. *Biochim Biophys Acta* 1645 (2): 212-217
- Reyes-Prieto** A, Bhattacharya D (2007) Phylogeny of Calvin cycle enzymes supports Plantae monophyly. *Mol Phylogenet Evol* 45 (1): 384-391
- Roberts** K, Granum E, Leegood RC, Raven JA (2007) Carbon acquisition by diatoms. *Photosynth Res* 93 (1-3): 79-88
- Rogers** MB, Keeling PJ (2003) Lateral gene transfer and re-compartmentalisation of Calvin cycle enzymes in plants and algae. *J Mol Evol* 58: 367-375
- Rotatore** C, Colman B (1992) Active uptake of CO₂ by the diatom *Navicula pelliculosa*. *J Exp Bot* 43: 571-576
- Rouhier** N, Couturier J, Jacquot, JP (2006) Genome-wide analysis of plant glutaredoxin systems. *J Exp Bot* 56 (8): 1685-1696
- Rouhier** N, Gelhaye E, Gualberto JM (2004) Poplar peroxiredoxin Q: a thioredoxin-linked chloroplast antioxidant functional in pathogen defense. *Plant Phys* 134: 1027-1038
- Rouhier** N, Gelhaye E, Jacquot JP (2002) Exploring the active site of plant glutaredoxin by site-directed mutagenesis. *FEBS Lett* 511: 145-149
- Rouhier** N, Gelhaye E, Jacquot JP (2004) Plant glutaredoxins: still mysterious reducing systems. *Cell Mol Life Sci* 61: 1266-1277
- Rouhier** N, Gelhaye E, Sautiere PE, Brun A, Laurent P, Tagu D, Gerard J, de Fay E, Meyer Y, Jacquot JP (2001) Isolation and characterization of a new peroxiredoxin from poplar sieve tubes that uses either glutaredoxin or thioredoxin as a proton donor. *Plant Physiol* 127: 1299-1309
- Rouhier** N, Jacquot JP (2002) Plant peroxiredoxins. Alternative hydroperoxide scavenging enzymes. *Photosynth Res* 74: 259-268

- Rouhier N, Jacquot JP (2005).** The plant multigenic family of thiol peroxidases. *Free Radical Biology and Medicine* 38: 1413-1421
- Rouhier N, Villarejo A, Srivastava M, Gelhay E, Keech O, Droux M, Finkemeier I, Samuelsson G, Dietz KJ, Jacquot JP, Wingsle G (2005)** Identification of plant glutaredoxin targets. *Antioxid Redox Signal* 7 (7-8): 919-929
- Round FE, Crawford RM, Mann DG (1990)** The Diatoms: Biology and Morphology of the Genera. 747. Cambridge University Press
- Roy H, Andrews TJ (2000)** Rubisco: Assembly and Mechanism. In: Leegood RC, Sharkey TD, von Caemmerer S, eds (2000) *Photosynthesis: Physiology and Metabolism*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers. pp 52-83
- Ruelland E, Miginiac-Maslow M (1999)** Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: activation or relief from inhibition? *Trends Plant Science* 4: 136-141
- Sachs MM (1994)** Gene expression during anoxia. In: AS Basra (ed) *Stress-Induced-Gene Expression in Plants*. 87-102. Horwood Acad Publ, Chur
- Sahrawy M, Chucea A, Hermoso R, Lazaro JJ, López-Gorgé J (1997)** Direct mutagenesis shows that the preceding region of the chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase regulatory sequence is the thioredoxin docking site. *J Mol Biol* 296: 623-630
- Saldarriaga JF, Taylor FJR, Keeling PJ, Cavalier-Smith T(2001)** Dinoflagellate nuclear SSU rRNA phylogeny suggests multiple plastid losses and replacements. *J Mol Evol* 53: 204-213
- Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. (1989)** *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd edn. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York
- Sarokin LP, Chua NH (1992)** Binding sites for two novel phosphoproteins, 3AF5 and 3AF3, are required for *rbcS-3A* expression. *Plant Cell* 4 (4): 473-483
- Sasaki Y, Kozaki A, Hatano M (1997)** Link between light and fatty acid synthesis: Thioredoxin-linked reductive activation of plastidic acetyl-CoA carboxylase. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 11096-11101
- Sato N (2001)** Multiple forms of phosphoglucomutase from immature wheat endosperms. *Plant Physiol Biochem* 25: 745-751
- Satoh D, Hiraoka R, Colman B, Matsuda Y (2001)** Physiological and molecular biological characteristics on intracellular carbonic anhydrase from the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Plant Physiol* 126: 1459-1470
- Scheibe R, Baalman E, Backhausen JE, Rak C, Vetter S (1996)** C-terminal truncation of spinach chloroplast NAD(P)-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase prevents inactivation and reaggregation. *Biochim Biophys Acta* 1296: 228-234

Schürmann P (1995) Ferredoxin: thioredoxin system. *Methods Enzymol* 252: 274-283

Schürmann P, Jacquot JP (2000) Plant Thioredoxin systems revisited. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 51: 371-400

Schwarz O, Schürmann P, Strotmann H (1997) Kinetics and Thioredoxin Specificity of Thiol Modulation of the Chloroplast H1-ATPase. *J Biol Chem* 272 (27): 16924-16927

Shackelford RE, Heinloth AN, Heard SC, Paules RS (2005) Cellular and molecular targets of protein S-glutathiolation. *Antioxid Redox Signal* 7: 940-950

Shih MC, Heinrich P, Goodman HM (1992) Cloning and chromosomal mapping of nuclear genes encoding chloroplast and cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase on *Nicotiana tabacum*. *EMBO J* 7: 893-898

Siaut M, Heijde M, Mangogna M, Montsant A, Coesel S, Allen A, Manfredonia A, Falciatore A, Bowler C (2007) Molecular toolbox for studying diatom biology in *Phaeodactylum tricorutum*. *Gene* 406 (1-2): 23-35

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

Smetacek V, Assmy P, Henjes J (2004) The role of grazing in structuring Southern Ocean pelagic ecosystems and biogeochemical cycles. *Antarctic Science* 16 (4): 541-558

Sonnhammer ELL, von Heijne G, Krogh A (1998) A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. In Glasgow J, Littlejohn T, Major F, Lathrop R, Sankoff D, Sensen C, editors, *Proceedings of the Sixth International Conference on Intelligent Systems for Molecular Biology*, 175-182, Menlo Park, CA, AAAI Press

Sparla F, Pupillo P, Trost P (2002) The C-terminal extension of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase subunit B acts as an autoinhibitory domain regulated by thioredoxins and nicotinamide adenine dinucleotide. *J Biol Chem* 277 (47): 44946-44952

Starke DW, Chock PB, Mieyal JJ (2003) Glutathione-Thiyl radical scavenging and transferase properties of human Glutaredoxin (thioltransferase). Potential role in redox signal transduction. *J Biol Chem* 278: 14607-14613

Starr RC, Zeikus JA (1993) UTEX: the culture collection of algae at the University of Texas at Austin, 1993 list of cultures. *J Phycol* 29: 1-106

Steiner JM, Löffelhardt W (2002) Protein import into cyanobacteria. *Trends Plant Sci* 7 (2): 72-77

Steinhauser S, Beckert S, Capesius I, Malek O, Knoop V (1999) Plant mitochondrial RNA editing. *J Mol Evol* 48 (3): 303-312

- Stitt M** (1990a) Fructose-2,6-bisphosphate as a regulatory molecule in plants. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 41: 153-185
- Stitt M** (1990b) The flux of carbon between the chloroplast and cytosol. In; Dennis DT, Turpin DH (eds) *Plant Physiology, Biochemistry and Molecular Biology*, 309-326. Longman, Singapore
- Stoebe B, Maier UG** (2002) One, two, three: nature's tool box for building plastids. *Protoplasma* 219: 23-30
- Stork T, Michel KP, Pistorius E, Dietz KJ** (2005) Bioinformatic analysis of the genomes of cyanobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 und *Synechocystis elongates* PCC 7942 for the presence of peroxiredoxins and the transcript regulation under stress. *J Exp Bot* 56: 3193-3206
- Sulli C, Fang Z, Muchnal U, Schwartzbach SD** (1999) Topology of *Euglena* chloroplast protein precursors within endoplasmic reticulum to Golgi to chloroplast transport vesicles. *J Biol Chem* 274: 457-463
- Süss KH, Arkona C, Manteuffe R, Adler K** (1993) Calvin cycle multienzyme complexes are bound to chloroplast thylakoid membranes of higher plants *in situ*. *Proc Natl Acad Sci USA Proc Natl Acad Sci* 90 (12): 5514-5518
- Szabo E, Colman B** (2007) Isolation and characterization of carbonic anhydrases from the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Physiol Plantarum* 129: 484-492
- Szederkényi J, Komor E, Schobert C** (1997) Cloning of the cDNA for glutaredoxin, an abundant sieve-tube exudate protein from *Ricinus communis* L., and characterisation of the glutathione-dependent thiol-reduction system in sieve tubes. *Planta* 202: 349-356
- Tabita FR, Satagopan S, Hanson TE, Kreef NE, Scott SS** (2008) Distinct form I, II, III, and IV Rubisco proteins from the three kingdoms of life provide clues about Rubisco evolution and structure/function relationships. *J Exp Bot* 59 (7): 1515-1524
- Taketa K, Pogell BM** (1965) Allosteric inhibition of rat liver fructose-1,6-diphosphatase by adenosine-5'-monophosphate. *J Biol Chem* 240: 651-662
- Tamoi M, Ishikawa T, Takeda T, Shigeoka S** (1996) Molecular characterization and resistance to hydrogen peroxide of two fructose-1,6-bisphosphatases from *Synechococcus* PCC 7942. *Arch Biochem Biophys* 334: 27-36
- Tamoi M, Miyazaki T, Fukamizo T, Shigeoka S** (2005) The Calvin cycle in cyanobacteria is regulated by CP12 via the NAD(H)/NADP(H) ratio under light/dark conditions. *Plant J* 42: 504-13
- Tanaka Y, Nakatsuma D, Harada H et al.** (2005) Localisation of soluble β -carbonic anhydrase in the marine diatom *Phaeodactylum tricornutum*. Sorting to the chloroplast and cluster formation on the girdle lamella. *Plant Physiol* 138: 207-217

- Tang** GL, Wang YF, Bao JS, Chen HB (2000) Overexpression in *Escherichia coli* and characterization of the chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase from wheat. *Protein Expr Purif* 19 (3): 411-418
- Teige** M, Melzer M, Süß KH (1998) Purification, properties and *in situ* localization of the amphibolic enzymes D-ribulose 5-phosphate 3-epimerase and transketolase from spinach chloroplasts. *Eur J Biochem* 252 (2): 237-244
- Tejwani** GA (1983) Regulation of fructose-1,6-bisphosphatase activity. In *Advances in Enzymology* (Edited by Meister A), 54: 121-194. Interscience, New York
- Thompson** JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG (1997) The CLUSTAL_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research* 25: 4876-4882
- Thompson** RF, Langford GM (2002) Myosin superfamily evolutionary history. *Anatom Record* 268: 276-289
- Trost** P, Fermani S, Marri L, Zaffagnini M, Falini G, Scagliarini S, Pupillo P, Sparla, F (2006) Thioredoxin-dependent regulation of photosynthetic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: autonomous vs. CP12-dependent mechanisms. *Photosynth Res* 89 (3): 1-13
- Tsutsumi** K, Kagaya Y, Hidaka S, Suzuki J, Tokairin Y, Hirai T, Hu DL, Ishikawa K, Ejiri S (1994) Structural analysis of the chloroplastic and cytoplasmic aldolase-encoding genes implicated the occurrence of multiple loci in rice. *Gene* 141: 215-220
- Turner** S, Pryer KM, Miao VP, Palmer JD (1999) Investigating deep phylogenetic relationships among cyanobacteria and plastids by small subunit rRNA sequence analysis. *J Eukaryotic Microbiol* 46: 327-338
- van den Hoek** C, Jahn, HM, Mann DG (1993) *Algen*. 3. Auflage. Georg Thieme Verlag, Stuttgart
- van den Hoek** C, Mann DG, Jahns HM (1997) *Algae. An introduction to Phycology*. Cambridge University Press
- Verdouxq** L, Vignols F, Jacquot JP, Chartier Y, Meyer Y (1999) *In vivo* characterization of a thioredoxin *h* target protein defines a new peroxiredoxin family. *J Biol Chem* 274: 19714-19722
- Vestweber** D, Schatz G (1988) Mitochondria can import artificial precursor proteins containing a branched polypeptide chain or a carboxy-terminal stilbene disulfonate. *J Cell Biol* 107 (6): 2045-2049
- Villeret** V, Huang S, Zhang Y, Xue Y, Lipscomb WM (1995) Crystal structure of spinach chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase at 2,8 Å resolution. *Biochemistry* 34: 4299-4306

- Vrieling** EG, Gieskes WWC, Beelen TPM (1999) Silicon deposition in diatoms: Control by the pH inside the silicon deposition vesicle. *J Phycol* 35: 548-559
- Wachter** A, Wolf S, Steininger H, Bogs J, Rausch T (2005) Differential targeting of GSH1 and GSH2 is achieved by multiple transcription initiation: implications for the compartmentation of glutathione biosynthesis in the *Brassicaceae*. *Plant J* 41 (1): 15-30
- Wawrik** B, Paul JH, Tabita FR (2002) Real-time PCR quantification of *rbcL* (ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase) mRNA in diatoms and pelagophytes. *Appl Environ Microbiol* 68 (8): 3771-3779
- Wedel** N, Soll J (1998) Evolutionary conserved light regulation of Calvin cycle activity by NADPH-mediated reversible phosphoribulokinase/CP12/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complex dissociation. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 9699-9704
- Weeden** NF, Buchanan BB (1983) Leaf cytosolic fructose-1,6-bisphosphatase. A potential target site in low temperature stress. *Plant Physiol* 72: 259-261
- Wells** AL, Lin AW, Chen LQ, Safer D, Cain SM, Hasson T, Carragher BO, Milligan RA, Sweeney HL (1999) Myosin VI is an actin-based motor that moves backwards. *Nature* 401: 505-508
- Wheland** S, Goldman N (2001) A general empirical model of protein evolution derived from multiple protein families using a maximum-likelihood approach. *Mol Biol Evol* 18: 691-699
- Wilhelm** C, Buchel C, Fisahn J, Goss R, Jakob T, Laroche J, Lavaud J, Lohr M, Riebesell U, Stehfest K, Valentin K, Kroth PG (2006) The Regulation of Carbon and Nutrient Assimilation in Diatoms is Significantly Different from Green Algae. *Protist* 157(2): 91-124
- Winyard** PG, Moody CJ, Jacob C (2005) Oxidative activation of antioxidant defence. *Trends Biochem Sci* 30 (8): 453-461
- Wittpoth** C, Kroth PG, Weyrauch K, Kowallik KV, Strotmann H (1998) Functional characterization of isolated plastids from two marine diatoms. *Planta* 206: 79-85
- Wolosiuk** RA, Buchanan BB (1977) Thioredoxin and glutathion regulates photosynthesis in chloroplasts. *Nature* 266: 565-567
- Wolter** F, Fritz C, Willmitzer L, Schell J, Schreier P (1988) *rbcS* genes in *Solanum tuberosum*: Conservation of transit peptide and exon shuffling during evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 846-850
- Yin** H, Pruyne D, Huffaker TC, Bretscher A (2000) Myosin V orientates the mitotic spindle in yeast. *Nature* 406: 1013-1015

Zaffagnini M, Michelet L, Marchand C, Sparla F, Decottignies P, Le Maréchal P, Miginiac-Maslow M, Noctor G, Trost P, Lemaire SD (2007) The thioredoxin independent isoforms of chloroplastic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is selectively regulated by glutathionylation. FEBS J 274: 212-226

Zaslavskaja LA, Lippmeier JC, Kroth PG, Grossman AR, Apt KE (2000) Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes. J Phycol 36 (2): 379-386

Zhang N, Kallis RP, Ewy RG, Portis AR Jr (2002) Light modulation of Rubisco in *Arabidopsis* requires a capacity for redox regulation of larger Rubisco activase isoform. Proc Natl Acad Sci USA 99: 3330-3334

Zhang N, Portis AR Jr (1999) Mechanism of light regulation of Rubisco: A specific role for the larger Rubisco activase isoform involving reductive activation by thioredoxin-f. Proc Natl Acad Sci USA 96: 9438-9443

Zhang Y, Yüksel KÜ, Gracy RW (1995) Terminal marking of avian triosephosphate isomerases by deamidation and oxidation. Arch Biochem Biophys 317: 112-120

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

Teilergebnisse dieser Arbeit wurden in folgendem Beitrag vorab veröffentlicht:

- Publikation:

Kroth PG, Chiovitti A, Gruber A, Martin-Jezequel V, Mock T, Schnitzler Parker M, Stanley MS, Kaplan A, Caron L, **Weber T**, Maheswari U, Armbrust EV, Bowler C (2007) A Model for Carbohydrate Metabolism in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum* Deduced from Comparative Whole Genome Analysis. Plos one (1): e1426

Danksagung

Als erstes möchte ich meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Peter G. Kroth danken, nicht nur für seine hervorragende Betreuung und die Bereitstellung dieses interessanten Themas, sondern auch für seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft. Danke für Deine verständnisvolle und entgegenkommende Art und das Du mir mit Rat und Tat in diesen Jahren zur Seite standest.

Desweiteren möchte ich mich ganz herzlich bei Dr. Toru Hisabori und bei Dr. Naomi Hosoya-Matsuda bedanken, daß sie mir die Methode zum Sammeln der Zielproteine vom Thioredoxin beigebracht und erklärt haben.

Ein Dank gilt besonders für die Arbeitsgruppe Kroth: tausend Dank an Doris für das Ballern und an Angelika für die Messungen, und Ansgar vielen Dank für Deine unermüdliche Diskussionsbereitschaft und hilfreichen Tipps.

Ganz besonderer Dank gilt meiner lieben Ehefrau Virginie. Du hast mir nicht nur im Labor geholfen, sondern auch zuhause immer gute Ratschläge gegeben und zu mir gehalten. Ich weiß, was ich an Dir hab´.

Liebe Uschi, vielen Dank für Deine hervorragende Küche und lieber Dani, vielen herzlichen Dank für Deine edlen französischen Tropfen.

Liebe Piccadilly und Héros, vielen Dank, daß ich am Wochenende mal mein Gehirn frei machen konnte...und das liebe Bienchen für die nächtliche Wärme.

Erklärung

Hiermit versichere ich, daß ich die schriftliche Dissertation selbständig nach besten Wissen und Gewissen verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe. Alle erhobenen Daten wurden nach wissenschaftlichem Standard ethisch erhoben. Jede Stelle der Arbeit, die dem Wortlaut oder dem Sinne nach anderen Werken entnommen sind, habe ich unter Angabe der Quelle deutlich als Entlehnung kenntlich gemacht.

Konstanz, im Juni 2008

Till Weber