

**Physiologische und strukturelle Untersuchungen zur
Redoxmodulation, Aggregation/Dissoziation und
Coenzympezifität der
NAD(P)(H)-Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase**

vorgelegt von
Elisabeth Baalman

DISSERTATION

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

eingereicht an der
Universität Osnabrück
Fachbereich Biologie/Chemie

Osnabrück, im Mai 2003

1. Einleitung	1
1.1. Allgemeine Einführung	1
1.2. Die Isoenzyme der NAD(P)(H)-abhängigen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase	3
1.3. Strukturelle Merkmale cytosolischer und chloroplastidärer NAD(P)(H)-GAPDH	5
1.4. Molekulargewichte der NAD(P)(H)-GAPDH und Komplexe mit anderen Enzymen	7
1.4.1. Molekulargewichte der NAD(P)(H)-GAPDH in Blau-, Rot- und Grünalgen	7
1.4.2. Komplexe der NAD(P)(H)-GAPDH mit PRK, Phosphoglycerat-Kinase (PGK) und Multienzymkomplexe	8
1.5. Der katalytische Mechanismus und die Nucleotidspezifität der NAD(P)(H)-GAPDH	9
1.5.1. Der katalytische Mechanismus	9
1.5.2. Strukturelle Grundlagen der Nucleotidspezifität	10
1.6. Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH durch Metabolite und andere Faktoren	10
1.7. Redoxmodulation der NAD(P)(H)-GAPDH	11
1.8. Zielsetzungen	11
2. Material und Methoden	13
2.1. Pflanzenmaterial und -anzucht	13
2.2. Chemikalien und Enzyme	13
2.3. Molekularbiologische Methoden	13
2.3.1. Bakterienstämme	13
2.3.2. Oligonucleotide	14
2.3.3. <i>E. coli</i> -Kulturen	15
2.3.4. Klonierungen	15
2.3.4.1. Klonierung der chloroplastidären gapA-cDNA, gapB-cDNA und gapB ^{ΔC} -cDNA in pET-3a	15
2.3.4.2. Konstruktion von Vektoren zur gleichzeitigen Expression mehrerer NAD(P)(H)-GAPDH-Untereinheiten in <i>E. coli</i>	16
2.4. Reinigung der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat	16
2.5. Reinigung der NAD(H)-GapCp und der NAD(P)(H)-GAPDH aus dem Stroma roter Paprikafruchtplastiden	18
2.6. Induktion und Überexpression der rekombinanten NAD(H)-GapCp in <i>E. coli</i>	19
2.6.1. Expression der rekombinanten NAD(H)-GapCp in <i>E. coli</i>	19
2.6.2. Reinigung der rekombinanten GapCp (Rote Paprikafrucht) aus <i>E. coli</i>	19
2.7. Sequenzierung der rekombinanten GapCp (Rote Paprikafrucht) aus <i>E. coli</i>	20
2.8. Überexpression der rekombinanten GapA ^M -, GapB ^M -, GapB ^{MΔC} -Untereinheiten und der simultan exprimierten rekombinanten GapA ^M B ^M - und GapA ^M B ^{MΔC} -Untereinheiten aus <i>E. coli</i>	21
2.9. Enzymaktivitätsbestimmung von NAD(P)(H)-GAPDH	22
2.10. Proteinbestimmung	24
2.11. Molekulargewichtsbestimmung von NAD(P)(H)-GAPDH durch Gelfiltration	24

2.12. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)	24
2.13. Gewinnung von polyklonalem Antiserum	24
2.14. <i>Western Blotting</i>	25
2.14.1. Quantifizierung von <i>Western-Blots</i>	25
2.15. Aktivierungsmöglichkeiten von NAD(P)(H)-GAPDH durch 1,3bisPGA und Reduktionsmittel	25
2.16. Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte für Substrate und Coenzyme verschiedener Isoenzyme der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat und roter Paprikafrucht	26
2.17. Bestimmung der K_a -Werte für verschiedene Aktivatoren der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat	26
2.18. Isolierung intakter Chloroplasten aus Spinat und intakter Chromoplasten aus roter Paprikafrucht	27
2.19. Bestimmung des Chlorophyll-Gehalts	27
2.20. Bestimmung des Intaktheitsgrades	27
2.21. Messung von NAD(P)(H)-GAPDH-Aktivität in isolierten intakten Spinat-Chloroplasten	28
2.22. Herstellung der Proben zur Metabolitenbestimmung im Chloroplasten durch Silikonölzentrifugation	28
2.23. Neutralisierung der Proben	29
2.24. Metabolitenbestimmung im Chloroplasten: ATP, ADP, 3PGA und DHAP	29
2.25. Molekulargewichtsbestimmung der NAD(P)(H)-GAPDH in Spinat-Chloroplastenextrakten	30
2.26. Molekulargewichtsbestimmung der NAD(P)(H)-GAPDH und der NAD(H)-GapCp in roten Paprikafrucht-Chromoplasten	30
2.27. Limitierte Proteolyse der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat	30
2.28. Bioinformatische Analysen	31
2.29. Darstellung der Ergebnisse	31
3. Ergebnisse	32
3.1. Untersuchungen zur NAD(P)(H)-GAPDH-Aktivierung in isolierten intakten Spinat-Chloroplasten	32
3.1.1. Chloroplasten in der Dunkelphase	32
3.1.2. Belichtete Chloroplasten	33
3.2. Aggregationsformen der NAD(P)(H)-GAPDH in isolierten intakten Spinat-Chloroplasten	35
3.2.1. Aggregationsformen der NAD(P)(H)-GAPDH in Chloroplasten während der Dunkelphase	36
3.2.2. Aggregationsformen der NAD(P)(H)-GAPDH in belichteten Spinat-Chloroplasten	37
3.3. Einfluß der Zugabe von Phosphat zu belichteten Chloroplasten und zu Chloroplasten während der Dunkelphase	38
3.4. Gibt es eine A_4 -Form in Dunkel-adaptierten Spinat-Chloroplasten? Quantitative Überprüfung von GapA und GapB in isolierten Spinatchloroplasten	39
3.5. Reinigung der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat	40
3.6. 1,3bisPGA und DTT _{red} sind Aktivatoren der NAD(P)(H)-GAPDH im Standard-Aktivitätstest	40

3.7. Zeitlicher Verlauf der Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH mit verschiedenen Thiolen und 1,3bisPGA	42
3.8. Katalytische Eigenschaften von NAD(P)(H)-GAPDH in den verschiedenen Aktivitäts-Zuständen	43
3.9. Einfluß von NAD auf die Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH	45
3.10. Untersuchungen zum Aggregations-Status der verschiedenen Formen der NAD(P)(H)-GAPDH	48
3.11. Die Rolle der CTE von GapB bei der Aktivierung und Aggregation der NAD(P)(H)-GAPDH: Versuche mit proteolysierter NAD(P)(H) GAPDH	51
3.11.1. Limitierte Proteolyse führt zur Aktivitätssteigerung der NAD(P)(H)-GAPDH	51
3.11.2. Aggregationszustände und Größe der Untereinheiten der NAD(P)(H)-GAPDH während der Proteolyse	53
3.11.3. Kinetische Eigenschaften der proteolysierten NAD(P)(H)-GAPDH	54
3.11.4. Kann proteolysierte NAD(P)(H)-GAPDH reaggregieren?	55
3.12. Die Rolle der CTE von GapB bei der Aktivierung und Aggregation der NAD(P)(H)-GAPDH: Versuche mit rekombinant hergestellter NAD(P)(H)-GAPDH	57
3.12.1. Expression der GapA-, GapB- und GapB ^{ΔC} -Untereinheiten in <i>E. coli</i>	57
3.12.2. Reinigung von GapA ^M , GapB ^M und GapB ^{MΔC} aus <i>E. coli</i>	60
3.12.3. Molekulargewichtsbestimmung der rekombinanten Homotetramere mittels SDS-PAGE	60
3.12.4. Molekulargewichtsbestimmung der rekombinanten Proteine mittels Gelfiltration an der Superdex-200	60
3.12.5. Kinetische Eigenschaften der rekombinanten Proteine	63
3.12.5.1. V_{max} - und K_m -Wert-Bestimmungen für das Substrat 1,3bisPGA und die Coenzyme NADPH und NADH	63
3.12.5.2. V_{max} - und K_m -Wert-Bestimmungen für das Substrat Gap	66
3.12.6. Expression von GapA ^{MBM} - und GapA ^{MBMΔC} -Formen in <i>E. coli</i>	68
3.12.7. Molekulargewichtsbestimmung der in <i>E. coli</i> coexprimierten im Rohextrakt vorliegenden GapA ^{MBM} - und GapA ^{MBMΔC} -Proteine	69
3.13. Inaktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH und der rekombinanten Formen der NAD(P)(H)-GAPDH durch H₂O₂	71
3.14. Plastidäre NAD(H)-spezifische GAPDH: Handelt es sich um GapCp?	74
3.14.1. NAD(H)- und NAD(P)H-spezifische GAPDH-Aktivitäten in Dunkel-adaptierten intakten Spinat- und isolierten roten Paprikafruchtplastiden	74
3.14.2. Trennung der NAD(H)-spezifischen und der NAD(P)(H)-abhängigen Aktivitäten der GAPDH aus rotem Paprikafruchtstroma	75
3.14.3. Reinigung rekombinant hergestellter GapCp (Rote Paprikafrucht) aus <i>E. coli</i>	79
3.14.4. Ansequenzierung der rekombinanten GapCp (Rote Paprikafrucht) aus <i>E. coli</i>	81
3.14.5. SDS-Gel zur Größenbestimmung der rekombinanten GapCp (Rote Paprikafrucht) aus <i>E. coli</i>	81

4. Diskussion	83
4.1. Reduktive und metabolische Aktivatoren der NAD(P)(H)-GAPDH	84
4.1.1. Reduktive und metabolische Aktivatoren der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat <i>in vivo</i>	86
4.1.2. Reduktive und metabolische Aktivatoren der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat <i>in vitro</i>	91
4.1.3. Die kinetischen Eigenschaften der NAD(P)(H)-GAPDH	91
4.1.4. Licht- und Dunkelstoffwechsel	94
4.1.4.1. Lichtstoffwechsel	95
4.1.4.2. Dunkelstoffwechsel	98
4.1.4.2.1. Regulation der NAD(P)(H)-abhängigen GAPDH im Dunkelstoffwechsel	99
4.1.4.2.2. GapCp im Stoffwechsel heterotropher Plastiden	100
4.2. Strukturelle Grundlagen der Regulation der NAD(P)(H)-GAPDH: Die Rolle der CTE	102
4.2.1. Die Rolle der CTE für die Aggregation	105
4.2.1.1. Besondere Merkmale der CTE in höheren Pflanzen	106
4.2.1.2. Kann proteolytisierte A ₂ B ₂ -NAD(P)(H)-GAPDH aggregieren?	107
4.2.1.3. Eigenschaften rekombinant hergestellter NAD(P)(H)-GAPDH: Rekombinant hergestellte Untereinheiten der chloroplastidären GapA ^M , GapB ^{MB^{AC}} und GapB ^M aus Spinat sind katalytisch aktiv	108
4.2.1.4. Kinetische Eigenschaften der rekombinant hergestellten Untereinheiten der chloroplastidären GapA ^M , GapB ^{MB^{AC}} und GapB ^M aus Spinat	108
4.2.1.5. Die CTE ist für die Aggregation der A ₂ B ₂ -NAD(P)(H)-GAPDH in höheren Pflanzen verantwortlich	109
4.2.1.6. Gibt es die A ₄ -Form der NAD(P)(H)-GAPDH in Chloroplasten höherer Pflanzen?	109
4.2.2. Die Rolle der CTE für die Redoxmodulation	111
4.2.3. Die Rolle der CTE für die Nucleotidspezifität	115
4.2.4. Die Aktivierung der chloroplastidären NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat und anderer höherer Pflanzen in struktureller Hinsicht	122
4.3. Alternative Modelle – Multienzymkomplexe	123
4.3.1. Multienzymkomplexe und Enzym-Interaktionen in höheren Pflanzen	123
4.3.2. Enzyminteraktionen in Algen	124
4.3.3. NAD(P)(H)-GAPDH/PRK/CP12-Komplexe	125
5. Zusammenfassung	126
6. Literaturverzeichnis	128
7. Anhang	139

1. Einleitung

1.1. Allgemeine Einführung

Im Licht wird in den Chloroplasten höherer Pflanzen und aerober, photoautotropher Algen Kohlenstoff durch den Calvin-Cyclus fixiert. Ausgehend von den Primärreaktionen in den Thylakoidmembranen, die über Photosystem I und II Lichtenergie und H₂O nutzen, um ATP und Reduktionsäquivalente zur Verfügung zu stellen, wird im Stroma über die Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase (RubisCO) zunächst CO₂ in Form von 3-Phosphoglycerat (3PGA) fixiert, welches in Folgereaktionen genutzt wird, um Kohlenhydrate (Triosephosphate) zu bilden.

Der Calvin-Cyclus steht in enger Kooperation mit dem Elektronen-Transport, da er der Hauptkonsument für Reduktionsäquivalente und ATP ist. Es gibt mehrere Mechanismen, über die die Effizienz der Lichtnutzung und die Rate des photosynthetischen Elektronentransportes durch *feed-back* Mechanismen an den Bedarf der in den verbrauchenden Reaktionen im Stroma angepasst wird. Umgekehrt gibt es Mechanismen, die bei hohen Lichtintensitäten und bei hoher Verfügbarkeit von CO₂ die Umsatzraten im Calvin-Cyclus deutlich erhöhen.

Dies gilt sowohl für langfristige Anpassungen an jeweilige Lichtbedingungen, als auch für kurzfristige Veränderungen der Bedingungen der Umgebung wie Wechsel zwischen Sonne und Schatten. Die Aktivitäten der Calvin-Cyclus Enzyme müssen daher speziell bei schnellen Änderungen bestimmten Formen der Kontrolle unterliegen. Die Licht-Aktivierung über das Ferredoxin/Thioredoxin-System erlaubt eine schnelle Anpassung der Enzym-Aktivitäten an die jeweilige Situation (LEEGOOD 1990). Diese redoxmodulierten Enzyme werden durch den Elektronenfluß von Ferredoxin über die Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase (FTR) auf die Thioredoxine reguliert, wobei letztere als lösliche Elektronencarrier Elektronen auf die redoxmodulierten Enzyme im Stroma übertragen (SCHEIBE 1991). Zu diesen Enzymen gehören u.a. die Calvin-Cyclus-Enzyme Fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), Phosphoribulokinase (PRK), Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase (SBPase) und die NAD(P)(H)-abhängige Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (NAD(P)(H)-GAPDH) (EC 1.2.1.13; SCHEIBE 1996, BUCHANAN et al. 1994). Redoxmoduliert sind ferner Enzyme, wie z.B. NADP-Malat-Dehydrogenase (NADP-MDH), die CF₁-ATPase und Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G6PDH), die anderen im Stroma ablaufenden Stoffwechselprozessen zuzuordnen sind.

In einer Übersichtsarbeit von SCHÜRMAN & JACQUOT (2000) wurde die NAD(P)(H)-GAPDH jedoch lediglich als 'mögliches Zielenzym' bezeichnet, weil die für die Redoxmodulation verantwortlichen Cysteine bislang nicht identifiziert werden konnten. Als weiteres Argument, dass es sich bei der NAD(P)(H)-GAPDH möglicherweise nicht um ein typisch redoxmoduliertes Enzym handelt, führen sie auf, dass das Enzym zwar durch Thioredoxin_f aktiviert werden kann, es aber keinen zwingenden Nachweis gibt, dass Thioredoxin_f für die Reduktion benötigt wird. Statt Thioredoxin_f könnte die Reduktion durch reduziertes Glutathion (GSH) erfolgen. Die Autoren nehmen Bezug auf BAALMANN et al. (1995), die gezeigt haben, dass die NAD(P)(H)-GAPDH ebenfalls durch geringe Konzentrationen von GSH aktiviert werden kann.

Redoxmodulation beinhaltet neben der Reduktion von Disulfidbrücken der Zielenzyme die Modulation durch enzymespezifische Metabolite. In den meisten untersuchten Fällen handelt es sich um die Substrate bzw. Produkte der jeweiligen Enzyme, deren aktuelle Konzentration die Fähigkeit des Zielenzym, durch Thioredoxin reduziert zu werden, beeinflusst. In Abbildung 1 ist der Calvin-Cyclus und damit zusammenhängende Reaktionen im Chloroplasten während der Belichtung dargestellt. Das im Calvin-Cyclus zunächst synthetisierte 3PGA wird entweder zur Regeneration des CO₂-Akzeptors, Ribulose-bisphosphat (RuBP),

oder zur Synthese von Stärke und Triosephosphaten genutzt. Eine zentrale Rolle spielt dabei die NAD(P)(H)-GAPDH, da sie die Reduktion von 1,3-bis-Phosphoglycerat (1,3bisPGA) in das erste Kohlenhydrat Glycerinaldehyd-3-phosphat (GAP) katalysiert.

Unbestritten ist, dass im Licht NAD(P)(H)-GAPDH-Aktivität benötigt wird (s. Abb. 1). Unklar ist jedoch weitgehend die Rolle der NAD(P)(H)-GAPDH im Chloroplasten während der Dunkelpphase. In Abbildung 2 sind die im Dunkeln im Chloroplasten ablaufenden Stoffwechselwege dargestellt. Ein wesentlicher Aspekt des Licht-Dunkel-Überganges ist, dass die im Licht aktiven Enzyme, so auch die NAD(P)(H)-GAPDH, im Dunkeln inaktiv sein müssen, um dem Stärkeabbau in der Nacht nicht entgegen wirken zu können (SIEBKE et al. 1991, NEUHAUS & SCHULTE 1996, BACKHAUSEN et al. 1998). Das bedeutet, dass die NAD(P)(H)-GAPDH keine Katalyse mit NADPH als Coenzym durchführen darf. Während der Dunkelpphase werden im Verlauf des Stärkeabbau im Chloroplasten die NAD(H)-abhängigen

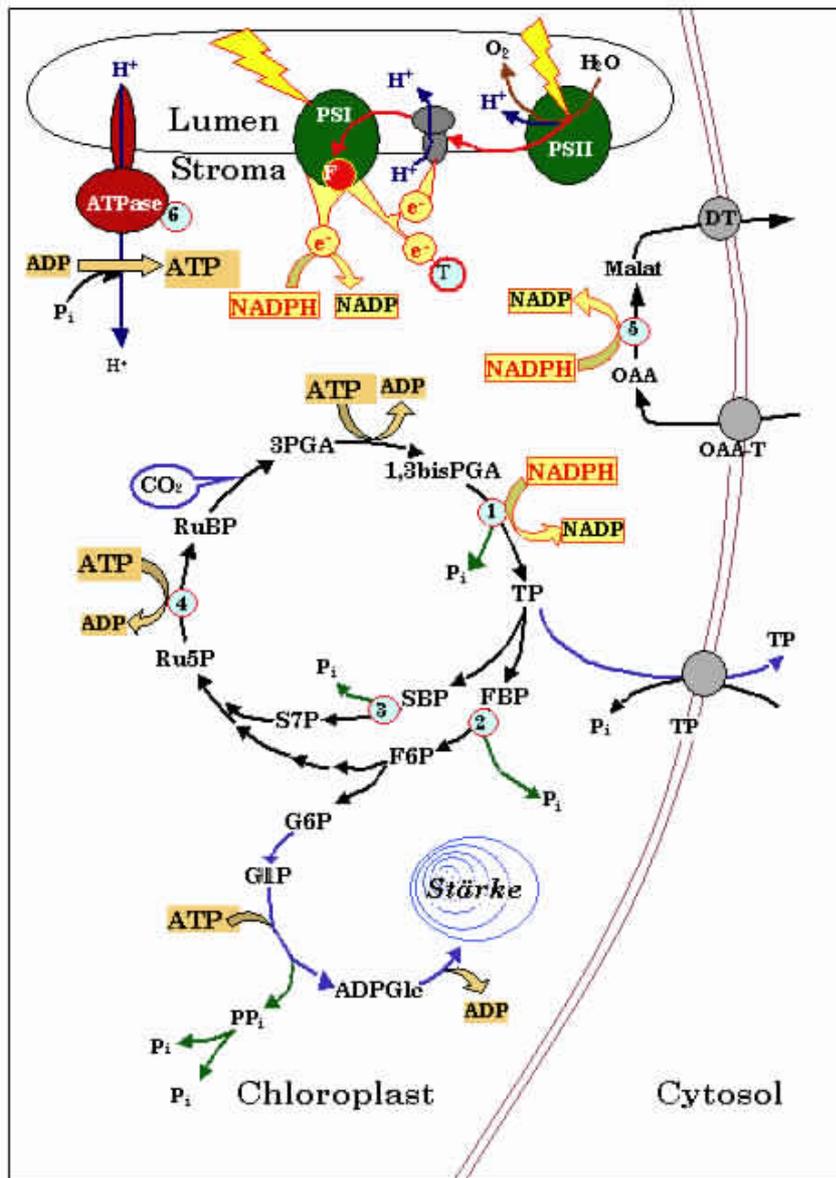


Abbildung 1: Schematische Darstellung der im Chloroplasten ablaufenden Prozesse während der Belichtung: Die hellblau unterlegten Zahlen stehen für die verschiedenen durch Thioredoxine aktivierten Enzyme: 1) NAD(P)(H)-GAPDH, 2) FBPase, 3) SBPase, 4) PRK, 5) NADP-MDH, 6) ATPase, DT: Dicarbonsäure-Translokator, OAA-T: OAA-Translokator, TPT: Triosephosphat-Translokator. Schema nach Backhausen (2000, unpubl.) modifiziert.

Aktivitäten benötigt. Diese Aufgabe übernimmt einerseits die NAD(P)(H)-GAPDH (s. Abb. 2), andererseits vollzieht in heterotrophen Plastiden ein weiteres Isoenzym der NAD(P)(H)-GAPDH, die NAD(H)-abhängige GapCp die Katalyse mit NAD(H) (vgl. Kap. 4.1.4.2.2., s. Abb. 42, BACKHAUSEN et al. 1998).

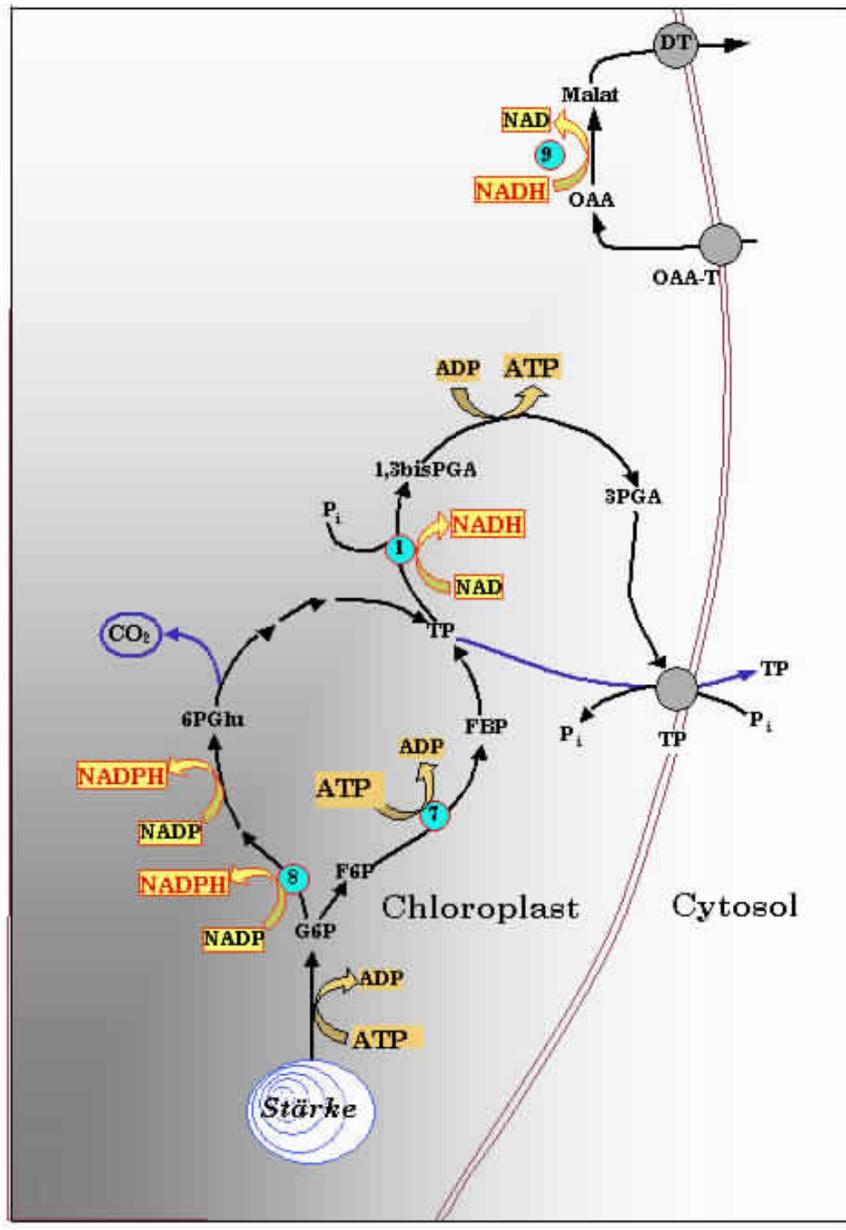


Abbildung 2: Schematische Darstellung der im Chloroplasten im Dunkeln ablaufenden Prozesse: Die hellblau unterlegten Zahlen stehen für die verschiedenen im Dunkeln im Chloroplasten aktiven Enzyme: 1) NAD(P)(H)-GAPDH, 7) Phosphofruktokinase (PFK), 8) G6PDH, 9) NAD-MDH. DT: Dicarbonsäure-Translokator, OAA-T: OAA-Translokator, TPT: Triosephosphat-Translokator. Schema nach Backhausen (2000, unpubl.) modifiziert.

1.2. Die Isoenzyme der NAD(P)(H)-abhängigen Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

Im Vergleich mit den redoxmodulierten Calvin-Cyclus-Enzymen besitzt die NAD(P)(H)-GAPDH zwei besondere Eigenschaften: Sie setzt die beiden Coenzyme NAD(H) und NADP(H) um, und die von ihr katalysierte Reaktion ist reversibel. Strukturell handelt es

sich um ein heteromeres Enzym, welches aus den Untereinheiten GapA und GapB besteht. Ferner kann das Enzym sowohl als Tetramer (150 kDa, A₂B₂) als auch als Hexadecamer (600 kDa, (A₂B₂)₄) vorkommen. GapA und GapB der Landpflanzen sind kernkodiert und besitzen Transitpeptide, mit deren Hilfe sie in den Chloroplasten transportiert werden.

Die NAD(P)(H)-GAPDH in der A₂B₂-Form (Tetramer und Hexadecamer) kommt vorwiegend in den Chloroplasten höherer Pflanzen vor. GapB wurde lediglich in der Armleuchteralge *Chlorokybus atmophyticus* (Charophyceae) nachgewiesen (PETERSEN 1999). Die Charophyceae gehören zu einer von vier Abteilungen der Grünalgen. Morphologische sowie molekulare Analysen zeigen, dass sie zusammen mit den Landpflanzen eine monophyletische Gruppe bilden (FRIEDL 1997). Weiterhin wurden anhand morphologischer Eigenschaften die Chlorophyta und Charophyceae bereits seit Beginn des letzten Jahrhunderts immer als nächste Verwandte der Landpflanzen beschrieben (BREMER 1985, GRAHAM 1984). Der genaue Übergang vom Wasser- zum Landleben ist jedoch bisher umstritten. Ungeklärt ist auch die Frage, ob Charophyceae und Landpflanzen parallele Entwicklungslinien darstellen, oder ob die Landpflanzen aus einer bestimmten Klasse der Charophyceae hervorgegangen sind (MISHLER & CHURCHILL 1985). Fest steht jedoch, dass GapB einer Genduplikation der GapA innerhalb der Grünalgen entstammt (PETERSEN 1999).

In Blau-, Rot- und Grünalgen hingegen kommt ausschließlich die A-Untereinheit der NAD(P)(H)-GAPDH vor. GapA wird in diesen Organismen sowohl als Tetramer als auch als Aggregat beschrieben. Die von ihr katalysierte Reaktion ist ebenfalls reversibel und bispezifisch. In Chloroplasten höherer Pflanzen wird auch das Vorkommen einer A₄-NAD(P)(H)-GAPDH diskutiert, welche entweder separat oder mit PRK und einem weiteren Protein CP12 komplexiert vorliegen soll (CERFF 1979, 1982, CERFF & CHAMBERS 1978, SCAGLIARINI et al. 1998). Kürzlich wurde als erste chloroplastidäre NAD(P)(H)-GAPDH die tetramere A₄-Form aus Spinat kristallisiert (FERMANI et al. 2001). Aufgrund des zur Verfügung stehenden *accession code* wird mittels des Programms „Rasmol“ jedoch statt eines Tetramers lediglich ein Trimer dargestellt (vgl. Kap. 4.2.1.6.).

Im Cytoplasma kommen zwei weitere GAPDH-Isoenzyme vor. Die Reaktion der cytosolischen NAD(H)-GAPDH (EC 1.2.1.12) ist ebenfalls reversibel, aber strikt NAD(H)-abhängig. Das Homotetramer ist 140-145 kDa groß (MCGOWAN & GIBBS 1974) und besteht ausschließlich aus GapC-Untereinheiten. Veränderungen im Molekulargewicht sind unbekannt. Die zweite cytosolische GAPDH (EC 1.2.1.9) ist dagegen strikt NADP-abhängig und irreversibel, da die von diesem Enzym katalysierte Reaktion nur mit GAP als Substrat abläuft. Diese nicht reversible GAPDH besitzt ein Molekulargewicht von 195 kDa und besteht aus vier Untereinheiten, die als GapN bezeichnet werden. Das Enzym wurde bislang ausschließlich als Tetramer beschrieben. Aufgrund veränderter Eigenschaften und der Aminosäuresequenz wird diese GAPDH den Aldehyd-Dehydrogenasen zugerechnet. Die NAD(H)-abhängige GAPDH kommt im Cytoplasma pflanzlicher und tierischer Zellen vor, während die NADP-abhängige nicht reversible GAPDH in allen Organismen, welche Chloroplasten oder Cyanellen besitzen, nachgewiesen werden konnte. Prokaryotische blau-grüne Algen oder nicht-photosynthetisch-aktive Mikroorganismen besitzen keine NADP-GAPDH (IGLESIAS & LOSADA 1988, MATEOS & SERRANO 1992, KELLY & GIBBS 1973, HABENICHT et al. 1994).

Ein mit GapC nahe verwandtes, chloroplastidäres GAPDH-Isoenzym wurde zuerst in der Gymnosperme *Pinus sylvestris* und dem Farn *Marsilea quadrifolia* gefunden. Es wird als GapCp bezeichnet, besteht aus vier GapC-Untereinheiten und ist als Homotetramer 150 kDa groß. Die von ihm katalysierte Reaktion ist reversibel, aber genau wie bei den cytosolischen Isoformen der GAPDH strikt NAD(H)-abhängig (MEYER-GAUEN et al. 1994, 1998). Die Besonderheit dieses Enzyms liegt darin, dass es aufgrund seiner Eigenschaften dem cytosolischen Isoenzym sehr ähnlich ist, aber in Chloroplasten importiert wird. GapCp ent-

stammt einer Genduplikation der cytosolischen GapC. Ein Transitpeptid sorgt für den Transport von GapCp in den Chloroplasten. Dieses Enzym wurde weiterhin in den Chloroplasten roter Paprikafrucht nachgewiesen. Die Expression von GapCp wird beim Übergang von autotrophen Chloroplasten (grüne Paprikafrucht) zu heterotrophen Chloroplasten (rote Paprikafrucht) induziert und fehlt in den Blättern (BACKHAUSEN et al. 1998). PETERSEN (1999) konnte nachweisen, dass alle großen Ordnungen der Landpflanzen funktionelle GapCp-Gene besitzen. Die GapCp-Gene erstrecken sich jedoch ausschließlich auf heterotrophe Gewebe. Mittels *Northern Blot*-Analysen konnte PETERSEN 1999 zeigen, dass GapCp in Wurzel, Stengel und der roten Frucht, jedoch nicht im Blatt oder der grünen Frucht von Paprikapflanzen exprimiert wird. Die Funktion dieses Enzyms war bislang jedoch unklar. In Abbildung 3 sind mit Ausnahme der nicht reversiblen NADP-abhängigen GAPDH schematisch die Isoenzyme der GAPDH aufgeführt.

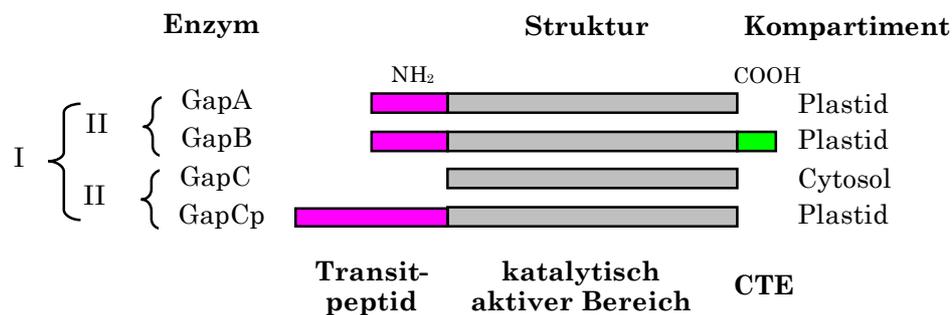


Abbildung 3: Schematischer Aufbau pflanzlicher GAPDH-Proteine. Schema nach PETERSEN (1999) modifiziert. I. Genduplikation eines gemeinsamen Vorläufers vor der Endosymbiose. II. Genduplikation in der Pflanzenevolution. Die N-terminalen **Transitpeptide** von GapA, GapB und GapCp, die **katalytisch aktiven Bereiche** von GapA, GapB, GapC und GapCp, sowie die C-terminale Sequenzerweiterung (**CTE**) von GapB sind farblich markiert.

1.3. Strukturelle Merkmale cytosolischer und chloroplastidärer NAD(P)(H)-GAPDH

Kristallstrukturdaten liegen von cytosolischen NAD(H)-abhängigen Isoenzymen der GAPDH vor. Es handelt sich um GAPDH aus menschlichem Muskel (MERCER et al. 1976), Hummer (MORAS et al. 1975, SONG et al. 1998) und Protozoen wie *Trypanosoma* (VELLIEUX et al. 1995, SOUZA et al. 1998) oder *Leishmania mexicana* (KIM et al. 1995). Weiterhin wurde GAPDH aus den Bakterien *Escherichia coli* (*E. coli*) (DUÉE et al. 1996), *Bacillus stearothermophilus* (BIESECKER et al. 1977, SKARZYNSKI et al. 1987), *Thermotoga maritima* (KORNDÖRFER et al. 1995) und *Thermus aquaticus* (TANNER et al. 1996) kristallisiert.

Kürzlich wurde auch die A₄-Form der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat kristallisiert. Die Monomere cytosolischer und chloroplastidärer GAPDH zeigen große strukturelle Homologien untereinander (FERMANI et al. 2001). Am Beispiel der NAD(H)-GAPDH aus *B. stearothermophilus* (BIESECKER et al. 1977) läßt sich die Struktur eines Monomers beschreiben (s. Abb. 4).

Ein GAPDH-Monomer besteht aus zwei Domänen mit unterschiedlichen spezifischen Funktionen: Die Aminosäuren von Position 1 bis Position 149 sind hauptsächlich an der Nucleotidbindung beteiligt, während die Aminosäuren in der Position 150 bis Position >334 die Aminosäurereste für die Substratbindung und die Katalyse beinhalten. Diese Domäne enthält außerdem die meisten Aminosäurereste, die für den Kontakt zwischen den Untereinheiten verantwortlich sind. Das an der ersten Domäne gebundene Coenzym NAD befindet sich in allen vier Untereinheiten innerhalb des Tetramers in einem schmalen Spalt. Die zweite Domäne bildet eine spezifische Struktur aus, den sogenannten *S-loop*, der aus den

Aminosäuren 178 bis 200 besteht. Er bildet zusammen mit den *S-loops* der drei anderen Monomere das Zentrum eines Tetramers. Jeder *S-loop* ragt in die Nähe der NAD-Binde-domäne eines benachbarten Monomers hinein und bildet so funktionell mit diesem ein aktives Zentrum, wobei alle vier *S-loops* durch additive hydrophobe Interaktionen zur Stabilität eines Tetramers beitragen (BANAS et al. 1987). Das in allen Isoenzymen der GAPDH konservierte Cystein 149, an dem die Substrate GAP, bzw. 1,3bisPGA kovalent binden, befindet sich im Verbindungspunkt der beiden Domänen im aktiven Zentrum. Das nahegelegene Cystein 153 ist ebenfalls in allen Isoenzymen der GAPDH konserviert. Es ist in der nativen Struktur nicht am katalytischen Prozess beteiligt, doch soll es unter bestimmten Bedingungen eine intramolekulare Disulfidbrücke mit Cystein 149 bilden. Gegenätzlich wird jedoch berichtet, dass zwischen dem Cystein 149 und dem Cystein 153 keine Disulfidbrücke ausgebildet werden kann, da sich beide Cysteine auf der gleichen Helix befinden (LI et al. 1994).

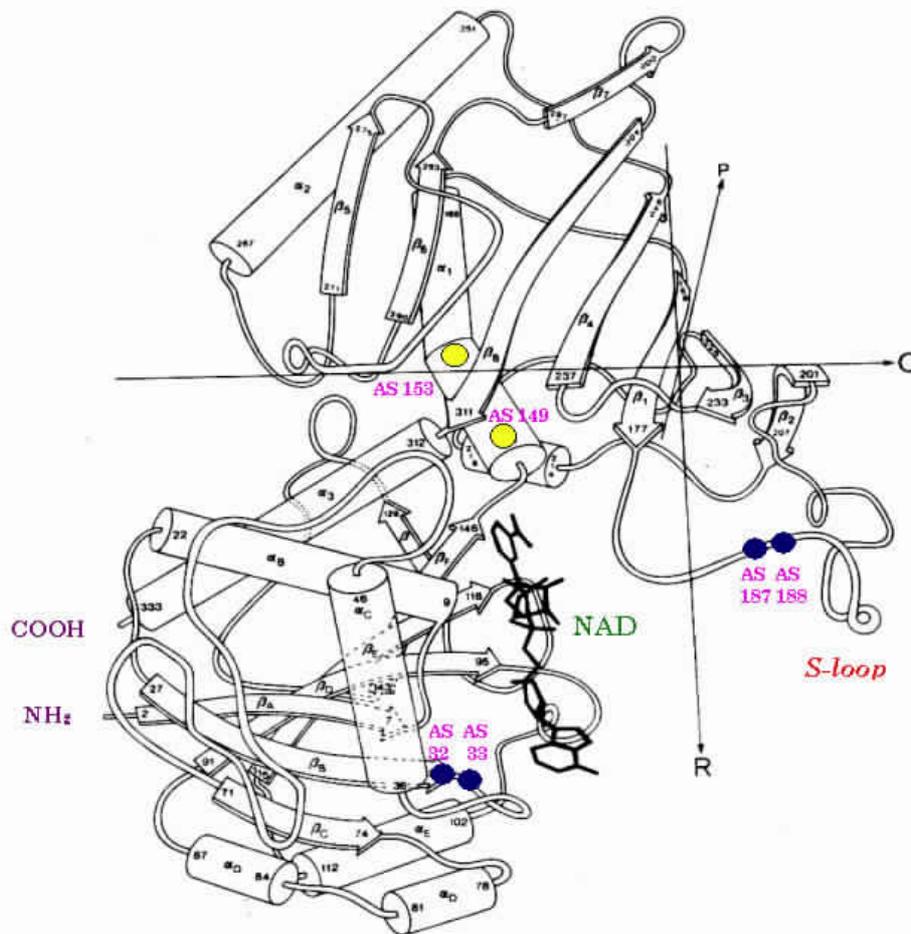


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Struktur eines Monomers der NAD(H)-GAPDH von *B. stearothermophilus*. Schema nach BIESECKER et al. (1977) modifiziert.

Aus Abbildung 4 ist ersichtlich, dass der N- und der C-Terminus eines Monomers nahe beieinander liegen und nach außen exponiert sind. Dies trifft ebenfalls für bislang kristallisierte cytosolische Isoenzyme der GAPDH zu. Obwohl für chloroplastidäre NAD(P)(H)-GAPDH, die die Untereinheit B besitzen, keine Kristallstrukturdaten verfügbar sind, gibt es Hinweise, dass die C-terminale Sequenzerweiterung von GapB (CTE) ebenfalls von außen zugänglich ist. Dafür spricht einerseits die Tatsache, dass die CTE durch Proteolyse mittels *Staphylococcus aureus*-V8-Proteinase abgeschnitten wird (ZAPPONI et al. 1993, vgl. Kap.

3.10), andererseits zeigen die Kristallstrukturdaten der chloroplastidären GAPDH-A₄-Form, dass sich dieses Enzym genau wie cytosolische GAPDH faltet.

Die NAD(P)(H)-GAPDH höherer Pflanzen setzt sich in der tetrameren Form aus je zwei Untereinheiten GapA und GapB zusammen. NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat besitzt je nach Autor die Molekulargewichtsgrößen von 37 kDa und 43 kDa (FERRI et al. 1978, PAWLIZKI & LATZKO 1974, CERFF 1979), bzw. 36 kDa und 39 kDa (FERRI et al. 1990). Die vollständigen Aminosäuresequenzen der A- und B-Untereinheiten aus Spinat wurden erstmals von FERRI et al. (1990) bestimmt. Die Aminosäuren in den Positionen 1 bis 337 von GapA, bzw. in den Positionen 1 bis 368 von GapB aus Spinat sind zu 80% identisch und zu 87% homolog (s. Tab. 22, 23). GapA und GapB unterscheiden sich lediglich durch 63 Aminosäuren, und in GapB sind drei zusätzliche Aminosäuren vorhanden. Die B-Untereinheiten der NAD(P)(H)-GAPDH höherer Pflanzen unterscheiden sich von den A-Untereinheiten hauptsächlich durch eine CTE. Im Fall der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat ist die CTE 31 Aminosäuren lang (BRINKMANN et al. 1989). Eine Besonderheit der CTE in Spinat sind zwei durch acht Aminosäuren voneinander getrennte Cysteine, neun negativ geladene Aminosäuren und zwei Proline, wovon sich ein Prolin in der Mitte zwischen beiden Cysteinen befindet (s. Abb. 44). Diese Merkmale sind abgesehen von der Anzahl der Aminosäuren (28-32) und der Anzahl der negativ geladenen Aminosäuren (7-11) in allen anderen bislang sequenziierten B-Untereinheiten höherer Pflanzen konserviert. POHLMAYER et al. (1996) stellten anhand von Homologievergleichen die Hypothese auf, dass die CTE durch eine Fusion mit dem Protein CP12 zustande kam.

1.4. Molekulargewichte der NAD(P)(H)-GAPDH und Komplexe mit anderen Enzymen

Die *in vivo*-aktiviert vorliegende 150 kDa-Form der Spinat-NAD(P)(H)-GAPDH (A₂B₂) kann reversibel zum (A₂B₂)₄-Hexadecamer mit einem Molekulargewicht von 600 kDa aggregieren (PUPILLO & GIULIANI PICCARI 1973, CERFF 1979). Beide Enzymformen unterscheiden sich durch ihre spezifischen Aktivitäten. Die 600 kDa-Form ist die nicht aktivierte Form der NAD(P)(H)-GAPDH, wie sie nach dem Reinigungsverfahren in Anlehnung an die Methode von PUPILLO & FAGGIANI (1979) isoliert vorliegt und ebenfalls in unbelichteten Chloroplasten vorgefunden wird. Die Dissoziation geht nach WARA-ASWAPATI et al. (1980) mit der Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH einher und wird sowohl für das isolierte Enzym als auch für NAD(P)(H)-GAPDH in Chloroplasten und in Blattextrakten beschrieben (SCHWARZ et al. 1976, TROST et al. 1993, FERRI et al. 1978, CERFF 1979). Gelegentlich wurde das Auftreten einer 300 kDa-Form während der Dissoziation bzw. Reassoziaton von PUPILLO & GIULIANI PICCARI (1975) und BAALMANN et al. (1994) beobachtet.

1.4.1. Molekulargewichte der NAD(P)(H)-GAPDH in Blau-, Rot- und Grünalgen

In allen bekannten Blau-, Rot- und Grünalgen besteht die NAD(P)(H)-GAPDH ausschließlich aus GapA-Untereinheiten. Das Molekulargewicht der Tetramere beträgt ca. 150 kDa. Eine Ausnahme bilden lediglich die Armeleuchteralge *Chlorokybus atmophyticus* und *Euglena gracilis*. In *Chlorokybus atmophyticus* wurde die GapB-Untereinheit, jedoch bislang nicht die A-Untereinheit, nachgewiesen (PETERSEN 1999). In *Euglena gracilis* wurden zwei NAD(P)H-abhängige Isoenzyme der GAPDH gefunden. Es handelt sich um eine A₄-Form, und um die in Chloroplasten höherer Pflanzen vorkommende A₂B₂-Form, die allerdings mit einem Molekulargewicht von 144 kDa beschrieben wurde. Eine Aggregation vergleichbar mit der Hexadecamer-Bildung höherer Pflanzen konnte bisher nicht nachgewiesen werden (THEISS-SEUBERLING 1981). Weitere Autoren haben in *Euglena gracilis* die A₄-Form mit

150 kDa (VACCHI et al. 1972) und 136 kDa (GRISSOM & KAHN 1975) beschrieben. Die Molekulargewichte von A₄-Tetrameren von anderen Algen liegen in der gleichen Größenordnung, wie z.B. bei dem photosynthetischen Protisten *Cyanophora paradoxa* mit 148 kDa (SERRANO & LÖFFELHARDT 1994) und der Grünalge *Chlorella kessleri* mit 160 kDa (KRYSTEVA et al. 1982). Wird die NAD(P)(H)-GAPDH nicht als isoliertes Enzym untersucht, sondern eine Molekulargewichtsbestimmung des Rohextraktes mittels Gelfiltration durchgeführt, so existiert z.B. in der Grünalge *Scenedesmus obliquus* außer der tetrameren A₄-Form (140 kDa) eine 470 kDa-Form (LAZARO et al. 1986) und in der Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* eine 460 kDa-Form (AVILAN et al. 1997). Auch in Rot- und Blaualgen war NAD(P)(H)-GAPDH-Aktivität meßbar; es finden sich in den entsprechenden Publikationen jedoch keine Molekulargewichtsangaben (MARTIN et al. 1993, TAMOI et al. 1996, LIAUD et al. 1994, ZHOU & RAGAN 1993).

1.4.2. Komplexe der NAD(P)(H)-GAPDH mit PRK, Phosphoglycerat-Kinase (PGK) und Multienzymkomplexe

In Spinat wurde ein Komplex, der sich aus NAD(P)(H)-GAPDH als A₄- und A₂B₂-Formen und PRK-Dimeren zusammensetzt, von CLASPER et al. (1991, 1994) mit einem Molekulargewicht von 560 kDa beschrieben. Neben diesem Komplex konnte ebenfalls die 600 kDa-Form der NAD(P)(H)-GAPDH nachgewiesen werden. Entsprechende NAD(P)(H)-GAPDH/PRK-Komplexe (jedoch ohne die A₂B₂-Form) wurden in den Grünalgen *Scenedesmus obliquus* und *Chlamydomonas reinhardtii* gefunden (NICHOLSON et al. 1987, CLASPER et al. 1994, AVILAN et al. 1997, LEBRETON et al. 1997). Darüberhinaus wurde für Spinat, *Synechocystis sp.* und *Chlamydomonas reinhardtii* ein Komplex beschrieben, der aus NAD(P)(H)-GAPDH-Heterotetrameren oder Homotetrameren, PRK-Dimeren und CP12-Dimeren besteht (POHLMAYER et al. 1996, WEDEL et al. 1997, WEDEL & SOLL 1998, SCHEIBE et al. 2002). CP12 ist ein Protein, welches große Ähnlichkeiten mit der CTE aufweist. Der C-terminale *loop* von CP12 ist in der Aminosäurezusammensetzung zu 43% identisch mit der CTE der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat, der N-terminale *loop* ist zu 25% homolog mit der CTE. Es gibt weitere Hinweise für Multienzymkomplexe, in denen NAD(P)(H)-GAPDH u.a. mit RubisCO, Ribulosephosphat-Isomerase (RPI) und PRK (800-850 kDa) in Erbsen (SAINIS & HARRIS 1986) oder Spinat (SAINIS et al. 1989) und mit RPI, PRK, RubisCO und PGK (520 bis 536 kDa) in Spinat (GONTERO et al. 1988, 1993), sowie als weiteres Beispiel ebenfalls in Spinat mit RPI, RubisCO, SBPase und FNR (Ferredoxin-NADP-Reduktase) (900 kDa) (SÜSS et al. 1993) enthalten ist (vgl. Kap. 4.3.1.).

Die Arbeiten von MARQUES et al. (1987) zeigen jedoch, dass lediglich ein Komplex zwischen PGK und NAD(P)(H)-GAPDH, der *metabolic channeling* ermöglicht, in der Lage ist, die Rate der CO₂-Fixierung in Chloroplasten zu optimieren. Hinweise für die Existenz derartiger Komplexe ergaben die Experimente von WANG et al. (1996) anhand von Protein-Protein-Hybridisierung und Fluoreszenz-Anisotropie, die zeigen, dass PGK und NAD(P)(H)-GAPDH *in vitro* physikalisch interagieren können.

1.5. Der katalytische Mechanismus und die Nucleotidspezifität der NAD(P)(H)-GAPDH

1.5.1. Der katalytische Mechanismus

Der katalytische Mechanismus wurde für die cytosolische NAD(H)-GAPDH von STRYER (1990) in der glykolytischen Richtung beschrieben. Aufgrund von Sequenzvergleichen mit chloroplastidären NAD(P)(H)-GAPDH-Isoenzymen (FERRI et al. 1990) wurde gefolgert, dass bei cytosolischen Isoformen der GapC-GAPDH und chloroplastidären Isoformen der GapA/B-GAPDH die gleichen katalytischen Mechanismen zu Grunde liegen müssen. In Abbildung 5 ist der katalytische Mechanismus der GAPDH dargestellt.

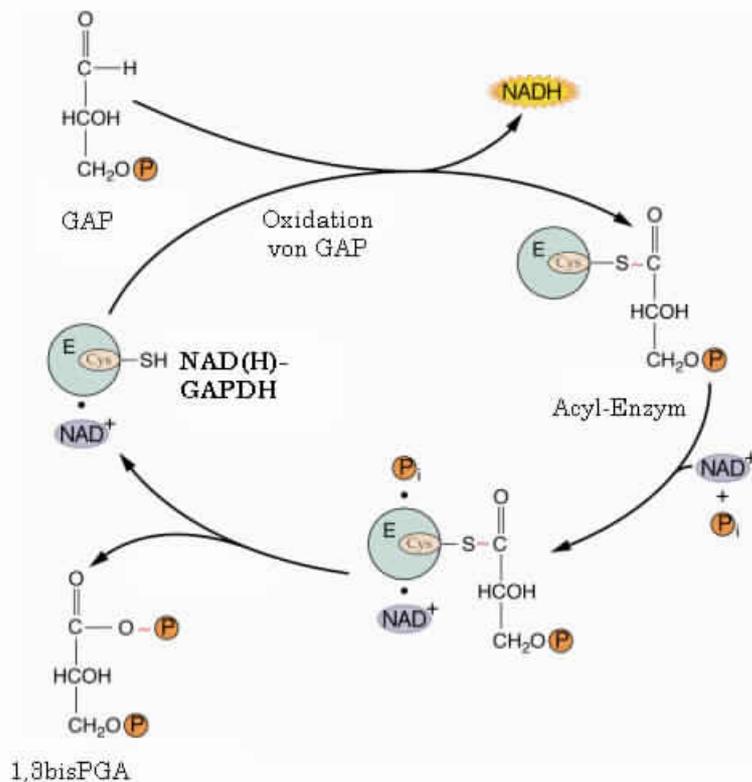


Abbildung 5: Der katalytische Mechanismus der cytosolischen NAD(H)-abhängigen GAPDH. Die Abbildung zeigt die Umsetzung von GAP zu 1,3bisPGA in der glykolytischen Richtung. Schema nach BUCHANAN et al. (2000) modifiziert.

Während der Katalyse schließt die Umwandlung eines Aldehyds in ein Acylphosphat eine Oxidation und Phosphorylierung ein. In glykolytischer Richtung reagiert die Aldehydgruppe des Substrats GAP unter Bildung eines Halbthioacetals mit der ionisierten Form der SH-Gruppe des Cysteins 149 im aktiven Zentrum. Es folgt der Transfer eines Hydridions auf ein NAD(P)-Molekül, das am Enzym gebunden vorliegt, wodurch NAD(P)H und ein Thioester entstehen. NAD(P)H wird daraufhin von einem weiteren Molekül NAD(P) ersetzt. Anschließend reagiert Orthophosphat mit dem Thioester und 1,3bisPGA wird gebildet. Bei den chloroplastidären NAD(P)(H)-GAPDH-Isoenzymen verläuft die Katalyse lediglich im Dunkelstoffwechsel (mit NAD als Coenzym) in dieser Richtung. Im Calvin-Cyclus wird jedoch in der umgekehrten Richtung NADPH als Coenzym zur Reduktion von 1,3bisPGA verwendet (vgl. Kap. 4.1.4.1.).

Studien mit cytosolischer NAD(H)-GAPDH haben ergeben, dass nur die tetrameren Formen und nicht die Monomere katalytisch aktiv sind, und dass die Anwesenheit der Substrate die Tetramer-Bildung forciert (HARRIS & WATERS 1976). O'BRIEN et al. (1977) zeigten, dass die NAD(P)(H)-GAPDH, wenn sie mehrere Stunden lang mit DTT_{red} (reduziertes DL-Dithiothreitol) inkubiert wurde, in Monomere zerfällt, welche katalytisch inaktiv sind. Ein Monomer ist katalytisch inaktiv, weil der *S-loop* eines Monomers immer in die NAD-Bindedomäne eines benachbarten Monomers hineinragt und nur so mit diesem funktionell ein aktives Zentrum bildet.

1.5.2. Strukturelle Grundlagen der Nucleotidspezifität

SCHULMAN & GIBBS (1968) zeigten erstmals, dass die NAD(H)-abhängige Aktivität nicht von der NAD(P)H-abhängigen Aktivität zu trennen ist, es sich also um das identische Enzym handelt. Die Bindung von NAD(H) oder NAD(P)H im aktiven Zentrum hängt maßgeblich von den Aminosäuren in den Positionen 32, 33, 187 und 188 ab (Nummerierung der Aminosäuren nach der Aminosäuresequenz von *B. stearothermophilus* (BIESECKER et al. 1977)). Die Aminosäuren 32 und 33 befinden sich in der ersten von BÜHNER et al. (1973) definierten 'Nucleotidbindedomäne' eines Monomers. Die Aminosäuren 187 und 188 befinden sich in dem *S-loop*, der aus einer benachbarten Untereinheit in das jeweilige aktive Zentrum ragt. Der *S-loop* ist in der sogenannten zweiten 'Untereinheiten-Kontakt-Domäne' eingebunden. Die Bindung von NAD(H) bzw. NADP(H) erfolgt einerseits z.B. an der Untereinheit O an die Aminosäuren in den Positionen 32 und 33, sowie gleichzeitig an der Untereinheit P an die Aminosäuren in den Positionen 187 und 188 oder ausschließlich an den Positionen 32 und 33. Aus Identitätsstudien der cytosolischen und chloroplastidären Isoenzyme in verschiedenen Organismen wie Algen und höheren Pflanzen geht hervor, dass sich in den Positionen 32, 33, 187 und 188 unterschiedliche Aminosäuren befinden (vgl. Kap. 4.2.3., s. Tab. 25). CORBIER et al. (1990) zeigten, dass in cytosolischen Isoformen der NAD(H)-GAPDH das konservierte Prolin in der Position 188 für eine sterische Hemmung der Bindung von NADP(H) verantwortlich ist. Deshalb kann die cytosolische GAPDH generell ausschließlich NAD(H) umsetzen. Cytosolische NAD(H)-GAPDH ist dann in der Lage, ebenfalls NADP(H) umzusetzen, wenn das Prolin durch Mutagenese durch ein Serin ausgetauscht wird (CORBIER et al. 1990).

Chloroplastidäre NAD(P)(H)-GAPDH weist in der tetrameren und hexadecameren Form unterschiedliche Präferenzen für NADH bzw. NADPH auf. Das Verhältnis der NADP(H)/NAD(H) abhängigen Aktivitäten rangiert im isolierten Zustand, in intakten isolierten Chloroplasten und in Blattextrakten zwischen den Werten 0,1 für die 600 kDa-Form und 2,2 für die 150 kDa-Form. Das bedeutet, dass die NAD(P)(H)-GAPDH in der 150 kDa-Form NADPH bevorzugt umsetzt (PUPILLO & GIULIANI PICCARI 1973, 1975, SCHULMAN & GIBBS 1968, MCGOWAN & GIBBS 1974, PAWLIZKI & LATZKO 1974, WOLOSUIK & BUCHANAN 1976, TROST et al. 1993, SCAGLIARINI et al. 1993, PUPILLO & FAGGIANI 1979). Die Dissoziation führt ausschließlich zu einer Steigerung der NADPH-abhängigen Aktivität, während die NADH-abhängige Aktivität unverändert bleibt (MÜLLER 1970).

1.6. Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH durch Metabolite und andere Faktoren

Daten über die Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH *in vivo* beschränken sich überwiegend auf die NADPH-abhängige Aktivität, und die Aktivierung geht mit einer Molekulargewichtsänderung einher. *In vitro* sind diverse physikalische und biochemische Faktoren in der Lage, eine Aktivierung des gereinigten Enzyms zu verursachen. Aktivierungen durch NADPH (MÜLLER et al. 1969, PUPILLO & GIULIANI PICCARI 1975, WOLOSUIK & BUCHANAN

1976, CERFF 1978a, PAWLITZKI & LATZKO 1974, SCHWARZ et al. 1976), sowie durch NADP (MÜLLER 1970, PUPILLO & GIULIANI PICCARI 1973 1975, CERFF 1978b, SCHWARZ et al. 1976) und ATP (MÜLLER 1970, PUPILLO & GIULIANI PICCARI 1975, WOLOSUIK & BUCHANAN 1976) wurden beschrieben. Auch durch P_i , Xanthosintriphosphat, Inosintriphosphat und Guanosintriphosphat (PUPILLO & GIULIANI PICCARI 1975), durch Cholat (SCHWARZ 1974) und hydrostatischen Druck (PRAT-GAY et al. 1991), sowie verschiedene Alkohole (WOLOSUIK et al. 1985) konnte eine Aktivierung des Enzyms erreicht werden. O'BRIEN & POWLS (1976) und O'BRIEN et al. (1977) beschrieben eine Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH durch das Substrat 1,3bisPGA über ein '1,3bisPGA-generating-system', welches in Kombination mit anderen Metaboliten untersucht wurde. Ein Dissoziieren der NAD(P)(H)-GAPDH durch gereinigtes 1,3bisPGA wurde von TROST et al. (1993) festgestellt.

Die Inaktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH, die mit einer Aggregation in das Hexadecamer eingeht, wird nach Angaben von PUPILLO & GIULIANI PICCARI (1975) durch die Metabolite NAD, NADH und GAP vermittelt. Diese Selbst-Aggregation der NAD(P)(H)-GAPDH wurde erstmals von PAWLITZKI & LATZKO (1974) vorgeschlagen und von TROST et al. (1993) und SCAGLIARINI et al. (1993) bestätigt.

1.7. Redoxmodulation der NAD(P)(H)-GAPDH

Eine Lichtaktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat wurde erstmals von ZIEGLER & ZIEGLER (1965) gezeigt. Diese Aktivierung wird durch eine Reduktion der NAD(P)(H)-GAPDH über das Ferredoxin/Thioredoxin-System erreicht, indem die NAD(P)(H)-GAPDH über Thioredoxin reduziert wird (WOLOSUIK & BUCHANAN 1978). Die Redoxmodulation eines Zielenzym *in vivo* beinhaltet die Aktivierung über Thioredoxine, d.h. Spaltung einer Disulfidbrücke und die Modulation dieser Thioredoxin-vermittelten Reduktion durch spezifische Metabolite. NAD(P)(H)-GAPDH nimmt bei den redoxmodulierten Enzymen insofern eine Sonderstellung ein, da eine Aktivierung auch ohne Reduktion erfolgen kann. *In vitro* kann gezielt zwischen der Aktivierung durch Reduktion und Metaboliteffekten unterschieden werden, wobei die Reduktion durch DTT_{red} simuliert werden kann. Molekulargewichtsbestimmungen nach Aktivierung durch DTT_{red} führten zu widersprüchlichen Ergebnissen. WOODROW et al. (1979) stellten fest, dass DTT_{red} die Aktivierung durch NADP bzw. NADPH und dadurch eine Überführung in Tetramere fördert. Durch Inkubation der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat mit DTT_{red} konnte eine Molekulargewichtsverschiebung in die 150 kDa-Form beobachtet werden, die allerdings zu einem erheblichen Verlust der NADPH-abhängigen Aktivität führte (TROST et al. 1993). Die NAD(H)-abhängige Aktivität wurde durch Reduktion mit DTT_{red} nicht beeinflusst (TROST et al. 1993). Redoxmodulation wird bei Algen konträr diskutiert. Demnach sind die Isoformen der NAD(P)(H)-GAPDH in bislang untersuchten Grünalgen redoxmodulierbar, während einige Autoren dies ebenfalls für Blau- und Rotalgen beschreiben, andere hingegen nicht (PACOLD et al. 1995a/b, DUGGAN & ANDERSON 1975, AUSTIN et al. 1992, UDVARDY et al. 1982, O'BRIEN & POWLS 1976, O'BRIEN et al. 1977, LI et al. 1997, ZIEGLER et al. 1967a, vgl. Kap. 4.2.2.1.).

1.8. Zielsetzungen

Aus den in der Einleitung dargestellten Befunden wird deutlich, dass in zahlreichen Publikationen der Regulationsmechanismus von NAD(P)(H)-GAPDH aus höheren Pflanzen, sowie aus Blau-, Rot- und Grünalgen untersucht wurde. NAD(P)(H)-GAPDH operiert im Calvin-Cyclus, wobei es durch Reduktion, vermutlich über Thioredoxin, aktiviert wird. Die *in vivo*-Regulation erfolgt ebenfalls über verschiedene Metabolite wie NADPH, NADP, ATP und 1,3bisPGA. NAD(P)(H)-GAPDH unterscheidet sich von anderen redoxmodulierten Enzymen, da es während der Aktivierung bei Belichtung von einer hochmolekularen 600 kDa-Form in

eine niedermolekulare 150 kDa-Form dissoziiert, und weil die Katalyse sowohl in der oxidierenden Richtung als auch in der reduzierenden Richtung ablaufen kann. Details zur Regulation, insbesondere Redoxmodulation, Nucleotidspezifität und Aggregations-/Dissoziationsfähigkeit in struktureller Hinsicht sind nicht oder kaum bekannt. Es leiten sich folgende konkrete Fragestellungen ab, die im Rahmen dieser Arbeit beantwortet werden:

- Welcher Zusammenhang besteht bei der Regulation der NAD(P)(H)-GAPDH zwischen Aktivierung durch Reduktion und Metabolite, bzw. sind alle bekannten Effektoren *in vivo* an der Aktivierung des Enzyms beteiligt? Diese Fragen werden mit dem *in vitro*- und dem *in vivo*-System geklärt, wobei außer den untersuchten Affinitäten und Aktivierungskonstanten für die Effektoren ebenfalls die metabolischen Konzentrationen im Chloroplasten berücksichtigt werden.
- Welche Rolle spielt NAD(P)(H)-GAPDH im Dunkelmetabolismus? Damit ein *futile cycle* ausgeschlossen ist, muß das Enzym im Dunkeln in der reduzierenden Richtung inaktiv sein. Welche Mechanismen kommen zum Tragen, damit die prognostizierte Aktivität des Enzyms ausschließlich den Umsatz von GAP beinhaltet, und welches der Coenzyme NAD oder NADP werden dabei genutzt?
- NAD(P)(H)-GAPDH höherer Pflanzen besitzt im Gegensatz zu den cytosolischen und den in Blau-, Rot-, und Grünalgen vorkommenden Isoenzymen eine zusätzliche CTE an der Untereinheit B. Hat die CTE in Hinsicht auf Redoxmodulation, Nucleotidspezifität und Aggregations-/Dissoziationsfähigkeit eine besondere Funktion? Zur Klärung dieser Fragen werden Untersuchungen mit proteolyasierter NAD(P)(H)-GAPDH, der die CTE fehlt, sowie mit rekombinant hergestellten Untereinheiten GapA^M, GapB^M und GapB^{MΔC} (ohne CTE) durchgeführt.
- Welche Eigenschaften besitzt die strikt NAD(H)-abhängige plastidäre GapCp und welche Rolle spielt sie in heterotrophen Plastiden?

2. Material und Methoden

2.1. Pflanzenmaterial und -anzucht

Zur Isolierung der NAD(P)(H)-GAPDH wurde Spinat (*Spinacia oleracea* L.) vom hiesigen Wochenmarkt verwendet. Die Anzucht des Spinats zur Isolierung von intakten Chloroplasten erfolgte hydroponisch nach der Methode von WALKER (1987). Für die Isolierung intakter Chromoplasten aus roten Paprikafrüchten (*Capsicum annuum* L.) wurde das Pflanzenmaterial vom Großmarkt bezogen.

2.2. Chemikalien und Enzyme

Vertreiber	Produkte
AGS, Heidelberg	IPTG
Applichem, Darmstadt	Tes
Biomol, Hamburg	Hepes, SDS, Tris
Boehringer, Mannheim	3PGA, Albumin B, Aldolase, ATP, Chymotrypsinogen, Cytochrom C, DNase, FBP, Ferritin, Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase, Katalase, NAD, NADP, NAD(H)-GAPDH aus Kaninchenmuskel, OAA, Ovalbumin, PGK, Triosephosphat-Isomerase, Triton X-100,
Duchefa, Haarlem, NL	Ampicillin, Chloramphenicol
Gerbu, Gaiberg	NADH, NADPH
Gibco BRL, Eggenheim	Bacto-Agar, Bacto-Tryptone, Hefe-Extrakt
MBI Fermentas, St. Leon-Rot	<i>Nde</i> I, <i>Eco</i> RI, <i>Hind</i> III, <i>Bam</i> HI, <i>Bgl</i> II
Merck, Darmstadt	NaHCO ₃
Novagen, Madison, USA	BL21(DE3), BL21(DE3)pLysS, pET-3a,
Pharmacia, Uppsala	Percoll
Riedel-de-Haen, Seelze	Aceton p.A., EDTA, Glycerin, H ₂ O ₂ , HCl, K ₂ HPO ₄ , KCl, KOH, MgCl ₂ , MgSO ₄ , NaCl, NaHCO ₃ , NaOH
Roth, Karlsruhe	BSA, Na(SO ₃) ₂ , Saccharose, Sorbit
Serva, Heidelberg	Ammoniumsulfat, Coomassie Brilliant Blue G250/R250, <i>Tli</i> -Polymerase
Sigma, Deisenhofen	α_2 -Makroglobulin, 2-Mercaptoethanol, ATP, Dalton Mark VII-L, DTT _{red} , Lysozym, MnCl ₂ , Natriumarsenat, RNase, Tricin, V8-Endoproteinase (<i>Staphylococcus aureus</i>)
Stratagene, Heidelberg	pBluescript (pBSK)

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Stämme von *E. coli* sind in Tabelle 1 aufgeführt. Tabelle 2 listet die Plasmide auf, die zur Herstellung der rekombinanten chloroplastidären gapA-, gapB-, und gapB^{AC}-Untereinheiten verwendet wurden. (^{AC}) bezeichnet die Untereinheit gapB ohne die CTE. Weiterhin sind in Tabelle 2 die Plasmide aufgeführt, die zur Herstellung der gleichzeitigen Expression der vollständigen Untereinheiten gapAB und gapAB^{AC} aus Spinat benötigt wurden.

Tabelle 1: Liste der verwendeten *E. coli*-Stämme

Stämme	Relevante Merkmale	Referenz
NM522	-	GOUGH & MURRAY (1983)
XL1-Blue	Tetr ^r	BULLOCK et al. (1987)
BL21(DE3)	-	Novagen, Madison, USA
BL21(DE3)pLysS	Cam ^r	Novagen, Madison, USA

Tabelle 2: Liste der verwendeten Plasmide

Plasmide	Relevante Merkmale	Referenz
pBluescript (= pBSK)	Amp ^r	Stratagene, Heidelberg
pET-3a	Amp ^r	Novagen, Madison, USA
pBSK-AM ^M	pBSK mit vollständigem cDNA-Fragment von chloroplastidärer gapA- Untereinheit	BAALMANN et al. (1996)
pBSK-BM ^M	pBSK mit vollständigem cDNA-Fragment von chloroplastidärer gapB-Untereinheit	BAALMANN et al. (1996)
pBSK-BM ^{AC}	pBSK mit vollständigem cDNA-Fragment von chloroplastidärer gapB ^{AC} -Untereinheit	BAALMANN et al. (1996)
pBSK-AM ^{BM}	pBSK mit vollständigem cDNA-Fragment von chloroplastidärer gapA- plus chloroplastidärer gapB-Untereinheit	diese Arbeit
pBSK-AM ^{BMAC}	pBSK mit vollständigem cDNA-Fragment von chloroplastidärer gapA- plus chloroplastidärer gapB ^{AC} -Untereinheit	diese Arbeit
pGapAM ^M	pET-3a mit cDNA-Fragment von reifer gapA	BAALMANN et al. (1996)
pGapBM ^M	pET-3a mit cDNA-Fragment von reifer gapB	BAALMANN et al. (1996)
pGapBM ^{AC}	pET-3a mit cDNA-Fragment von reifer gapB ^{AC}	BAALMANN et al. (1996)
pGapAM ^{BM}	pET-3a mit cDNA-Fragment von reifer gapA plus cDNA-Fragment von reifer gapB	diese Arbeit
pGapAM ^{BMAC}	pET-3a mit cDNA-Fragment von reifer gapA plus cDNA-Fragment von reifer gapB ^{AC}	diese Arbeit

2.3.2. Oligonucleotide

Die zur Herstellung der rekombinanten GAPDH-Homomere GapAM, GapBM und GapBM^{AC} aus Spinat verwendeten Oligonucleotide sind in der Tabelle 3 aufgeführt. Die Oligonucleotide, die zur Herstellung der rekombinanten GapCp aus roter Paprikafrucht verwendet

wurden, sind in PETERSEN (1999) aufgeführt. Die Klonierung der GapCp wurde von J. Petersen (TU Braunschweig) durchgeführt.

Tabelle 3: Liste der verwendeten Oligonucleotide. Die Restriktionsschnittstellen für die Endonucleasen *Nde* I und *Bam* HI sind fett markiert und in der Abbildung 26 im Ergebnisteil unterstrichen. Die aufgeführten Oligonucleotide wurden in der TU Braunschweig, Institut für Genetik hergestellt.

Bezeichnung	Basensequenz
A-For	5'-TGCACCATATGAAATTGAAGGTAGCAATCAATGGA-3'
A-Rev	5'-GCATAGGATCCTTACTGCCATTTGTTAGCAACAAT-3'
B-For	5'-TGCACCATATGAAACTTAAGGTGGCAATCAATGG-3'
B-RevS	5'-GCAATGGATCCTCACTTCCACTTGTGTTGCTACCAAGTCTG-3'
B-RevL	5'-GCAATGGATCCTTACTCGTAAAGTTTGCACTCC-3'

2.3.3. *E. coli*-Kulturen

Die Anzucht von *E. coli* XL1-blue Zellen erfolgte aerob in YT-Flüssig-Medium oder auf YT-Agar-Platten bei 37°C nach SAMBROCK et al. (1989).

YT-Flüssig-Medium: 8 g Bacto-Tryptone
5 g Hefe-Extrakt
2,5 g NaCl
ad 1 l mit H₂O bidest; pH 7,0 mit 5 N NaOH

YT-Platten zusätzlich: 15 g/l Bacto-Agar

Nach dem Autoklavieren wurden YT-Flüssig-Medium und Agar steril, abhängig von den Resistenzeigenschaften der verwendeten Zellen, mit Antibiotika in folgenden Konzentrationen versetzt:

Ampicillin (Amp) 200 µg/ml
Chloramphenicol (Cam) 25 µg/ml

2.3.4. Klonierungen

2.3.4.1. Klonierung der chloroplastidären gapA-cDNA, gapB-cDNA und gapB^{AC}-cDNA in pET-3a

Zur Konstruktion der Überexpressionsvektoren wurden die Plasmide pBSK-A^M mit den Oligonucleotiden A-For und A-Rev, pBSK-B^M mit den Oligonucleotiden B-For und B-RevL; pBSK-B^{MAC} mit den Oligonucleotiden B-For und B-RevS in eine *Polymerase-Chain-Reaction* (PCR) mit der *Tli*-Polymerase (Serva, Heidelberg) eingesetzt.

Ein **Standard-PCR-Ansatz** (25 µl Endvolumen) setzte sich wie folgt zusammen:

1 ng	cDNA-Vorlage
50 µg	dNTP
1,5 µg	je Oligonucleotid
0,5 U	<i>Tli</i> -Polymerase
	Reaktionspuffer
1 mM	MgCl ₂

Die Reaktionen wurden in einem TRIO-Block (Biometra, Göttingen) mit folgendem Temperaturprogramm durchgeführt:

35 Zyklen: 1 min 93°C
 1 min 50°C
 2 min 72°C

Die resultierenden Fragmente wurden nach Elektroelution mittels DE-52-Chromatographie isoliert, mit *Bam* HI und *Nde* I verdaut und in einen mit *Bam* HI- und *Nde* I-linearisierten pET-3a-Vektor ligiert. Transformanten in *E. coli* NM522, welche mit den passenden Oligonucleotiden PCR-Produkte lieferten, wurden sequenziert, um die Richtigkeit der Klonierung zu bestätigen (vgl. auch Klonierungsschema Abb. 25).

2.3.4.2. Konstruktion von Vektoren zur gleichzeitigen Expression mehrerer NAD(P)(H)-GAPDH-Untereinheiten in *E. coli*

Es wurden mehrere Vektoren konstruiert, die einerseits zur Expression der Homomere GapA^M, GapB^M und GapB^{MAC}, andererseits auch zur Expression der Heteromere GapA^{MBM} und GapA^{MBMAC} genutzt wurden. Dazu wurden die drei Plasmide pGapA^M, pGapB^M und pGapB^M in *E. coli*-BL21 bzw. *E. coli*-BL21pLysS transformiert. Weiterhin wurden die drei Fragmente, die für GapA, GapB und GapB^{AC} kodieren, zur Konstruktion eines Vektors für die gleichzeitige Expression der beiden Spinat-NAD(P)(H)-GAPDH-Untereinheiten (GapA und GapB, bzw. GapA und GapB^{AC}) in *E. coli* benutzt. Hierfür wurde cDNA kodierend für die reife GapA-Untereinheit zusammen mit dem T7-Promoter aus dem pGapA^M-Vektor mit *Bgl* II und *Bam* HI herausgeschnitten. Die Vektoren pGapB^M und pGapB^{MAC} wurden mit *Hind* III linearisiert. Nachdem die überhängenden Enden des entstandenen Fragments und der linearisierten Vektoren aufgefüllt waren, erfolgte die Ligation und Transformation in *E. coli*-BL21. Um die Richtigkeit der Klonierung zu überprüfen, wurde mit *Bgl* II und *Eco* RI eine Restriktionsanalyse durchgeführt (vgl. auch Klonierungsschema Abb. 25).

2.4. Reinigung der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat

In Anlehnung an die Methode von PUPILLO & FAGGIANI (1979) wurde NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat gereinigt. Alle Schritte mit Ausnahme der Acetonfällung wurden bei 4°C unter Verwendung von entgastem Puffern durchgeführt.

Homogenisierung des Spinats

500 g frischer, gewaschener Spinat wurden grob zerkleinert, mit Homogenisierungsmedium (Puffer A) versetzt und in einem eisgekühlten *Waring Blendor* (Bachhofer, Reutlingen) auf maximaler Stufe etwa drei Minuten homogenisiert.

Puffer A:	50 mM	Tris/HCl; pH 8,0
	5 mM	EDTA
	14 mM	2-Mercaptoethanol
	0,14 mM	NAD

Anschließend wurde das Homogenisat durch sechs Lagen Mull und eine Lage *Miracloth* (Calbiochem, LaJolla) filtriert.

Fraktionierte Ammoniumsulfatfällung

Es folgte eine fraktionierte Ammoniumsulfatfällung von 45-60% der Sättigung, wobei die Zentrifugationen jeweils für 30 Minuten bei 20000g (Sorvall RC5B, Rotor GSA, DuPont, Bad

Homburg) durchgeführt wurden. Das Pellet wurde nach der zweiten Fällung in 40 ml Puffer A resuspendiert.

Acetonfällung

Zu der Suspension wurde tropfenweise äquivalentes Volumen eiskaltes Aceton p.A. zugegeben. Daraufhin wurde bei -18°C für 20 Minuten bei 20000g (Sorvall RC5B, Rotor SS34, DuPont, Bad Homburg) zentrifugiert.

Homogenisierung des gefällten Extraktes

Das Pellet wurde mittels eines *Potter-Evelhjem-homogenizer* (Braun, Melsungen) in 20 ml Puffer A resuspendiert und bei 4°C für 20 Minuten bei 20000g (Sorvall RC5B, Rotor SS34) zentrifugiert. Der klare Überstand wurde weiterverwendet.

Entsalzung

Eine Sephadex-G25 (2,5 x 40 cm; Pharmacia, Freiburg) wurde mit Puffer B äquilibriert.

Puffer B:	10 mM	Tris/HCl; pH 8,0
	1 mM	EDTA
	14 mM	2-Mercaptoethanol

Die Probe wurde aufgetragen und mit Puffer B (Flußrate: 2 ml/min) eluiert. Die Proteindetektion erfolgte bei 280 nm über den Durchfluß-UV-Detektor (BioRad, München) des Econo-Systems (BioRad, München). Fraktionen mit hoher NADPH-abhängiger Aktivität wurden vereinigt und mit 0,14 mM NAD versetzt.

Anionenaustauscher

Eine DEAE-Cellulose (2 x 20 cm; Serva, Heidelberg) wurde mit Puffer B äquilibriert. Die Probe wurde aufgetragen und mit einer Flußrate von 1,33 ml/min eluiert. Zunächst wurde mit 80 ml Puffer B gewaschen. Die Elution erfolgte mittels eines Stufengradienten mit steigenden KCl-Konzentrationen bei einer Flußrate von 1,33 ml/min.

1. 80 ml Puffer B plus 50 mM KCl
2. 80 ml Puffer B plus 100 mM KCl
3. 80 ml Puffer B plus 200 mM KCl
4. 80 ml Puffer B plus 1 M KCl

Die Protein-Detektion erfolgte bei 280 nm über den Durchfluß-UV-Detektor (BioRad) des Econo-Systems (BioRad). Die NAD(P)(H)-GAPDH eluierte bei der Konzentration von 200 mM KCl. Fraktionen mit hoher NADPH-abhängiger GAPDH-Aktivität wurden vereinigt und mit 0,14 mM NAD versetzt. Mit dem Fraktionspool wurde über Nacht eine Ammoniumsulfatfällung bis 60% Sättigung durchgeführt. Es folgte eine Zentrifugation für 15 Minuten bei 20000g (Sorvall RC5B, Rotor SS34). Das Pellet wurde in 1,5 ml Puffer C aufgenommen.

Puffer C:	100 mM	Tris/HCl; pH 8,0
	10 mM	EDTA
	1,4 mM	2-Mercaptoethanol
	0,5 mM	NAD

Gelfiltration

Eine Superdex-200 (1,6 x 60 cm; Pharmacia, Freiburg) wurde mit Puffer D äquilibriert. Die Suspension wurde durch Zentrifugation bei höchster Drehzahl (Tischzentrifuge; Herolab, Wiesloch) geklärt und auf die Säule aufgetragen (Flußrate: 0,5 ml/min).

Puffer D:	50 mM	Tris/HCl; pH 8,0
	5 mM	EDTA
	3 mM	2-Mercaptoethanol
	150 mM	KCl
	0,14 mM	NAD

Die Protein-Detektion erfolgte bei 280 nm über den Durchfluß-UV-Detektor des FPLC-Systems (Pharmacia, Freiburg). Das Protein wurde mit Puffer D mittels des FPLC-Systems (Pharmacia, Freiburg) mit gleicher Flußrate eluiert und die Fraktionen mit hoher spezifischer NADPH-abhängiger Aktivität vereinigt. Das Volumen wurde in Centricons-30 (Millipore Corporation, Bedford MA, USA) eingengt und die verbleibende Lösung mit 50% (v/v) Glycerin versetzt und bei -20°C gelagert.

2.5. Reinigung der NAD(H)-GapCp und der NAD(P)(H)-GAPDH aus dem Stroma roter Paprikafruchtplastiden

Die Reinigung der NAD(H)-GapCp und der NAD(P)(H)-GAPDH aus dem Stroma roter Paprikafrucht wurde aufgrund des exklusiven Materials nach einigen Vorversuchen nur ein Mal durchgeführt. Das für nachstehende Versuche verwendete Material wurde freundlicherweise von G. Henrichs u. E. Neuhaus (Universität Osnabrück) zur Verfügung gestellt. Das eingefrorene Stroma wurde im Wasserbad langsam aufgetaut und anschließend 30 Minuten bei 20000g (Sorvall RC5B, Rotor GSA) zentrifugiert.

Anionenaustauscher

Eine DEAE-Cellulose (2 x 20 cm; Serva) wurde mit Puffer B (vgl. Kap. 2.4.) äquilibriert. Der Überstand wurde aufgetragen und mit einer Flußrate von 1,33 ml/min eluiert. Zunächst wurde mit 80 ml Puffer B (vgl. Kap. 2.4.) gewaschen. Anschließend folgte ein Stufengradient mit steigenden KCl-Konzentrationen.

1. 80 ml Puffer B plus 100 mM KCl
2. 80 ml Puffer B plus 500 mM KCl

Die Protein-Detektion erfolgte bei 280 nm über den Durchfluß-UV-Detektor (BioRad) des Econo-Systems (BioRad). Die Fraktionen mit den höchsten NADH-abhängigen GAPDH-Aktivitäten, die bei 100 mM KCl (Eluat GapCp), und die Fraktionen mit den höchsten NADPH-abhängigen GAPDH-Aktivitäten, die bei 500 mM KCl (Eluat NAD(P)(H)-GAPDH) eluierten, wurden separat vereinigt und mit jeweils 0,14 mM NAD versetzt.

Acetonfällung

Mit äquivalentem Volumen eiskaltem Aceton p.A. wurden mit beiden Eluaten separat Fällungen durchgeführt, wobei das Aceton jeweils tropfenweise zugegeben wurde. Die Suspensionen wurden dann für jeweils 20 Minuten bei -18°C und 20000g zentrifugiert (Sorvall RC5B, Rotor SS34, Du Pont).

Homogenisierung des gefällten Extraktes

Die Pellets wurden jeweils mittels eines *Potter-Evelhjem-homogenizer* (Braun) in 20 ml Puffer C (vgl. Kap. 2.4.) resuspendiert. Anschließend wurde das unlösliche Material durch Zentrifugation bei 4°C für 20 Minuten bei 20000g (Sorvall RC5B, Rotor SS34) aus der Lösung entfernt. Die klaren Überstände wurden weiterverarbeitet.

Gelfiltration

Eine Superdex-200 (1,6 x 60 cm; Pharmacia) wurde mit Puffer D (vgl. Kap. 2.4.) äquilibriert. Die Überstände wurden separat mit einer Flußrate von 1,5 ml/min aufgetragen. Die Proteindetektion erfolgte bei 280 nm über den Durchfluß-UV-Detektor des FPLC-Systems (Pharmacia). Die Proteine wurden jeweils mit Puffer D (vgl. Kap. 2.4.) mittels des FPLC-Systems (Pharmacia) mit gleicher Flußrate eluiert. Die Fraktionen mit den höchsten NADH-abhängigen GAPDH-Aktivitäten, die bei der Gelfiltration mit dem Eluat: GapCp durchgeführt wurden, eluierten bei 150 kDa und wurden vereinigt. Die Fraktionen mit den höchsten NADH-abhängigen GAPDH-Aktivitäten, die bei der Gelfiltration mit dem Eluat: NAD(P)(H)-GAPDH durchgeführt wurden, eluierten bei 600 kDa und wurden vereinigt. Die so angereicherte NAD(H)-GapCp und angereicherte NAD(P)(H)-GAPDH wurden separat in Centricon-30 (Millipore Corporation) eingeeengt, mit 50% (v/v) Glycerin versetzt und bei -20°C aufbewahrt.

2.6. Induktion und Überexpression der rekombinanten NAD(H)-GapCp in *E. coli*

2.6.1. Expression der rekombinanten NAD(H)-GapCp in *E. coli*

Das GapCp-Konstrukt in *E. coli*-BL21(DE3)pLysS in pET-3a wurde in der Arbeitsgruppe Cerff (TU Braunschweig) kloniert und freundlicherweise von J. Petersen und R. Cerff (TU Braunschweig) zur Verfügung gestellt. *E. coli* besitzt endogen eine eigene NAD(H)-abhängige GAPDH, die als Gap1 bezeichnet wird. Während der folgenden Reinigung mußte darauf geachtet werden, beide NAD(H)-abhängigen Isoenzyme voneinander zu trennen.

1,8 l YT-Medium (6 x 300 ml mit jeweils 200 µg/ml Ampicillin und 25 µg/ml Chloramphenicol) wurden mit je 3 ml Übernachtskultur (*E. coli*-BL21(DE3)pLysS mit pET-3a GapCp-Konstrukt) angeimpft. Zusätzlich wurden zur Kontrolle 200 ml YT-Medium mit *E. coli*-BL21(DE3)pLysS mit pET-3a ohne Insert Übernachtskultur angeimpft. Bei 37°C wurden die Medien inklusiver Konstrukte für 3,5 Stunden inkubiert (OD₆₀₀ ca. 1,5). Es wurden jeweils 40 ml frisches YT-Medium zugegeben und die Expression mit 0,4 mM IPTG induziert. Nach zwei Stunden wurden die Zellen bei 20000g (Sorvall RC5B, Rotor GSA und SS34) 15 Minuten zentrifugiert und in 150 ml Puffer E resuspendiert. Die Pellets wurden separat in 25 ml Puffer E, dem 100 µg/ml Lysozym zugesetzt wurden, aufgenommen. Nach 15minütiger Inkubation bei 30°C wurden 10 mM MgCl₂, sowie 1 µg RNase/ml und 1 µg DNase/ml zugefügt. Nach weiterer 30minütiger Inkubation wurden die Suspensionen 15 Minuten bei 4°C und 12000g (Sorvall RC5B, Rotor SS34) zentrifugiert.

Puffer E:	50 mM	Tris/HCl; pH 8,0
	2 mM	EDTA
	14 mM	2-Mercaptoethanol
	0,14 mM	NAD

2.6.2. Reinigung der rekombinanten GapCp (Rote Paprikafrucht) aus *E. coli*

Die Pellets, in denen sich das GapCp-Konstrukt und das Pellet ohne Insert befinden, wurden jeweils in 150 ml Puffer E resuspendiert. In beiden Suspensionen wurden NAD(H)-abhängige GAPDH-Aktivitäten gemessen. Berechnungen ergaben, dass die *E. coli*-Gap1 ca. 5-6% der NAD(H)-abhängigen GAPDH-Aktivität ausmacht. Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass sich in der Suspension mit exprimierter GapCp ebenfalls 5-6% *E. coli*-Gap1 befanden.

Affinität

Die Lösung mit exprimierter GapCp und *E. coli*-Gap1, sowie die Suspension mit ausschließlich endogener *E. coli*-Gap1 wurden getrennt auf eine zuvor mit Puffer E äquilibrierte rote Sepharose (Merck, Darmstadt) bei einer Flußrate von 1,5 ml/min aufgetragen. Anschließend wurde mit 20 ml Puffer E gewaschen und daraufhin mit 1 M KCl in 20 ml Puffer E mit gleicher Flußrate eluiert. Die Protein-Detektion erfolgte bei 280 nm über den Durchfluß-UV-Detektor (BioRad) des Econo-Systems (BioRad). Die Fraktionen des Säulenlaufs mit exprimierter GapCp mit den höchsten NADH-abhängigen Aktivitäten wurden vereinigt und mittels Druckfiltration eingengt. Die endogene *E. coli*-Gap1 hat nicht an die rote Sepharose (Merck) gebunden. Daher wurden die Fraktionen des Durchlaufs mit den höchsten NADH-abhängigen GAPDH-Aktivitäten vereinigt und ebenfalls mittels Druckfiltration eingengt.

Anionenaustauscher

Die Proben mit der exprimierten GapCp wurden mit Puffer F auf 50 ml Volumen eingestellt und auf eine zuvor mit Puffer F äquilibrierte Source-15Q (0,12 x 0,73 cm; Merck, Darmstadt) mit einer Flußrate von 1 ml/min aufgetragen. Eluiert wurde in einem Salzgradienten über 60 ml zwischen 0-300 mM NaCl und pH 8,7 auf pH 8,0 in Puffer F mittels des FPLC-Systems (Pharmacia). Die Protein-Detektion erfolgte bei 280 nm über den Durchfluß-UV-Detektor des FPLC-Systems (Pharmacia). Die Fraktionen mit den höchsten NADH-abhängigen GAPDH-Aktivitäten wurden vereinigt und mittels Centricon-30 (Millipore Corporation) eingengt.

Puffer F:	20 mM	Tris/HCl; pH 8,0
	14 mM	2-Mercaptoethanol
	0,14 mM	NAD

Gelfiltration

Die eingengte Probe wurde auf eine zuvor mit Puffer G äquilibrierte Superdex-200 (1,6 x 60 cm; Pharmacia) aufgetragen. Die Auftragung und die Elution erfolgten im gleichen Puffer mit einer Flußrate von 1,5 ml/min mittels des FPLC-Systems (Pharmacia). Die Protein-Detektion erfolgte bei 280 nm über den Durchfluß-UV-Detektor mittels des FPLC-Systems. Fraktionen mit den höchsten NADH-abhängigen GAPDH-Aktivitäten wurden gesammelt, mittels Centricon-30 (Millipore Corporation) eingengt, und für die biochemische Charakterisierung in 50% (v/v) Glycerin bei -20°C aufbewahrt.

Puffer G:	50 mM	Tris/HCl; pH 8,0
	5 mM	EDTA
	14 mM	2-Mercaptoethanol
	150 mM	KCl
	0,14 mM	NAD

2.7. Sequenzierung der rekombinanten GapCp (Rote Paprikafrucht) aus *E. coli*

Die N-terminale Sequenzierung der rekombinanten GapCp aus *E. coli* durch automatisierten Edman-Abbau wurde freundlicherweise von R. Schmid (Universität Osnabrück) mit einem Protein Sequenzer (Model 473 A, Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt. Als Material diente eine aus einem SDS-Gel ausgeschnittene Bande.

2.8. Überexpression der rekombinanten GapA^M-, GapB^M-, GapB^{MΔC}-Untereinheiten und der simultan exprimierten rekombinanten GapA^MB^M- und GapA^MB^{MΔC}-Untereinheiten aus *E. coli*

200 ml YT-Medium (200 µg/ml Ampicillin, 25 µg/ml Chloramphenicol) wurden mit je 0,5 ml der Übernachtskulturen *E. coli*-BL21 oder *E. coli*-BL21 mit den pET-3a-Konstrukten der rekombinanten Untereinheiten GapA^M, GapB^M, GapB^{MΔC}, GapA^MB^M und GapA^MB^{MΔC} angeimpft und bei 37°C bis zu einer OD₆₀₀ von 1,2 aerob angezogen. Es wurden jeweils 50 ml frisches YT-Medium zugegeben und die Expressionen mit 0,4 mM IPTG induziert. Nach zwei Stunden wurden die Zellen getrennt für 15 Minuten und 20000g zentrifugiert (Sorvall RC5B, Rotor GS3, Du Pont), in 100 ml Puffer E (vgl. Kap. 2.6.) resuspendiert und wiederum für zehn Minuten und 20000g zentrifugiert (Sorvall RC5B, Rotor SS34, Du Pont).

Die Pellets wurden in 25 ml Puffer E (vgl. Kap. 2.6.) plus 100 µg/ml Lysozym aufgenommen. Nach 15minütiger Inkubation bei 30°C wurden jeweils 10 mM MgCl₂, 1 µg RNase/ml und 1 µg DNase/ml zugefügt. Nach weiterer 20minütiger Inkubation wurden die Suspensionen 15 Minuten bei 4°C und 10000g (Sorvall RC5B, Rotor SS34) zentrifugiert.

Reinigung der rekombinanten GapA^M-, GapB^M- und GapB^{MΔC}-Formen aus *E. coli*

Nach Induktion der Genexpression mit IPTG und Lyse wurden die in 2.8. erhaltenen Überstände weiterverarbeitet. Gereinigt wurden weiterhin die drei rekombinanten GapA^M-, GapB^M- und GapB^{MΔC}-Formen aus *E. coli*. Die Überstände, in denen die beiden gleichzeitig exprimierten rekombinanten GapA^MB^M- und GapA^MB^{MΔC}-Formen aus *E. coli* vorlagen, wurden mit Centricons-30 (Millipore Corporation) eingengt und ohne weitere Reinigungsschritte direkt zur Molekulargewichtsüberprüfung auf eine Superdex-200 (1,6 x 60 cm; Pharmacia) aufgetragen.

Affinität

Die klaren Überstände, die die drei rekombinanten GapA^M-, GapB^M- und GapB^{MΔC}-Formen enthielten, wurden mit 1 ml/min auf eine mit Puffer E (vgl. Kap. 2.6.) äquilibrierte rote Sepharose (Merck) aufgetragen.

Zur Trennung der *E. coli* eigenen NAD(H)-abhängigen GapC und der jeweiligen rekombinanten NAD(P)(H)-abhängigen Isoenzyme der GAPDH folgten zwei Elutionsschritte:

- Elution von NAD(H)-abhängiger GapC mit 20 ml Puffer E plus 5 mM NAD
- Elution von NAD(P)(H)-abhängigen rekombinanten Proteinen mit 20 ml Puffer E plus 5 mM NADP

Die Protein-Detektion erfolgte bei 280 nm über den Durchfluß-UV-Detektor (BioRad) des Econo-Systems (BioRad). Die Fraktionen des zweiten Elutionsschrittes wurden auf NADPH-abhängige GAPDH-Aktivitäten getestet, vereinigt, und auf 5 ml mit Centricons-30 (Millipore Corporation) eingengt.

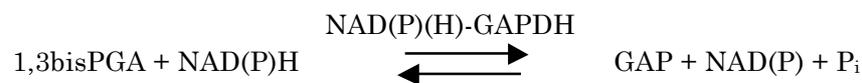
Anionenaustauscher

Die eingengten Proben wurden auf eine zuvor mit Puffer F (vgl. Kap. 2.6.) äquilibrierte Source-15Q (Merck) mit einer Flußrate von 1 ml/min aufgetragen. Eluiert wurden die Proteine mit der gleichen Flußrate in einem Salzgradienten über 40 ml von 0-500 mM NaCl und pH 8,5 auf pH 8,0 in Puffer F mittels des FPLC-Systems (Pharmacia). Die Protein-Detektion erfolgte über den Durchfluß-UV-Detektor des FPLC-Systems (Pharmacia). Die Fraktionen mit den höchsten NADPH-abhängigen Aktivitäten wurden vereinigt und mittels Centricon-30 (Millipore Corporation) eingengt.

Gelfiltration

Die eingeeengten Proben wurden jeweils auf eine Superdex-200 (1,6 x 60 cm; Pharmacia) bei einer Flußrate von 1,5 ml/min aufgetragen, die zuvor mit Puffer G (vgl. Kap. 2.6.) äquilibriert wurde. In einem weiteren Versuch wurde GapB^M zuvor mittels einer NAP5-Säule in Puffer G ohne 2-Mercaptoethanol und NAD entsalzt, um das NAD zu entfernen, welches in dem Puffer enthalten ist, in dem GapB^M vorliegt. Die Protein-Detektion erfolgte bei 280 nm über den Durchfluß-UV-Detektor des FPLC-Systems (Pharmacia, Freiburg). Das Protein wurde mit Puffer G (vgl. Kap. 2.6.) mittels des FPLC-Systems (Pharmacia) eluiert und die Fraktionen mit hoher spezifischer NADPH-abhängiger Aktivität vereinigt. Die Suspensionen wurden mit Centricons-30 (Millipore Corporation) eingeeengt, mit 50% (v/v) Glycerin versetzt und bei -20°C aufbewahrt.

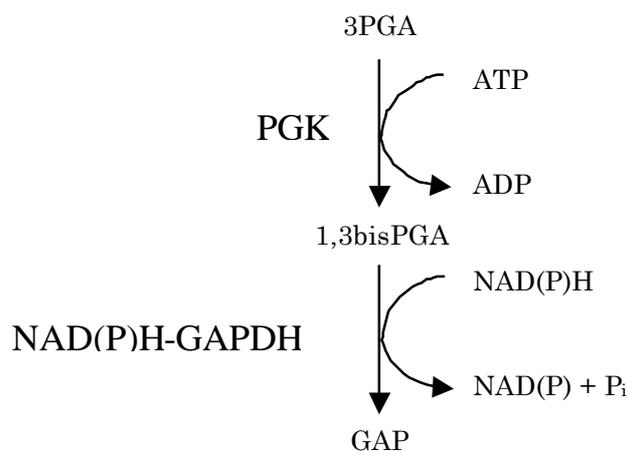
2.9. Enzymaktivitätsbestimmung von NAD(P)(H)-GAPDH



Die Enzymaktivität wurde sowohl in Richtung der 1,3bisPGA-Reduktion, als auch in Richtung der GAP-Oxidation gemessen, wobei entweder die Oxidation von NAD(P)H oder die Reduktion von NAD(P) pro Zeiteinheit im Spektralphotometer 1001 (Eppendorf, Hamburg) oder Uvikon 810 (Kontron, Watford UK) mindestens fünf Minuten bei 340 nm (334 nm) und 25°C verfolgt wurde. Der Extinktionskoeffizient ϵ für NAD(P)H beträgt bei 340nm $6,22 \times 10^6 \text{ cm}^2/\text{mol}$ (BERGMEYER 1974). Die spezifischen Aktivitäten wurden für das isolierte Enzym in U/ml oder U/mg Protein, für NAD(P)(H)-GAPDH im Chloroplastenextrakt in $\mu\text{mol} (\text{mg Chl})^{-1} \text{ h}^{-1}$ umgerechnet, wobei ein Unit als Umsatz von einem μmol Substrat pro Minute definiert ist.

Aktivitätsnachweis: Oxidation von NAD(P)H mit 1,3bisPGA als Substrat

Der Enzymtest mit 1,3bisPGA als Substrat erfolgte in Anlehnung an die Methode von CERFF (1982). Für diesen Enzymtest wurde die PGK aus Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) von Boehringer, Mannheim verwendet.



Der Meßansatz setzte sich aus folgenden Komponenten zusammen:

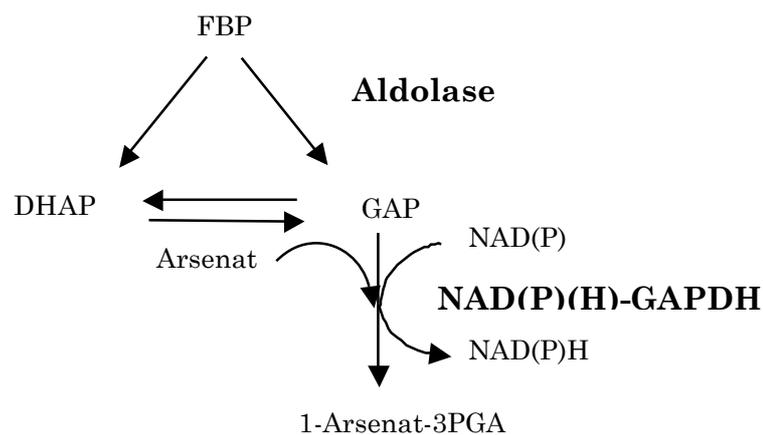
Gesamtvolumen:	100 mM	Tris/HCl; pH 7,8
(1ml)	4,5 mM	3PGA
	2 mM	ATP
	8 mM	MgSO ₄
	1 mM	EDTA
	1,8 Units	PGK
	0,32 mM	NAD(P)H

Dieser Testansatz wurde mit NADPH als Coenzym als Standard-Enzymtest verwendet, falls nicht anders angegeben. Aus 3PGA und ATP wurde in der Küvette durch die PGK das Substrat 1,3bisPGA synthetisiert (Inkubationszeit bei Raumtemperatur: zehn Minuten). Anschließend wurde der Enzymtest durch Zugabe von Aliquots der Probe gestartet. Zur Bestimmung der Enzymaktivität wurde ausschließlich die erste Minute nach Start des Enzymtests ausgewertet (vgl. Kap. 3.6., s. Abb. 13). Mittels der Gleichgewichtskonstanten der PGK ($K_{eq} = 3,1 \times 10^{-4}$, BÜCHER 1963) errechnet sich eine 1,3bisPGA-Konzentration von 52,82 μ M im Testansatz. Die Änderung der Extinktion bei 334 nm oder 340 nm wurde bei 25°C in einem Spektralphotometer 1001 (Eppendorf) oder Uvikon 810 (Kontron) mindestens fünf Minuten lang verfolgt.

$$K_{eq} = \frac{[1,3bisPGA] \times [ADP]}{[3PGA] \times [ATP]}$$

$$[1,3bisPGA] = (3,1 \times 10^{-4} \times [ATP] \times [3PGA])^{1/2} = 52,82 \mu\text{M}$$

Aktivitätsnachweis: Reduktion von NAD(P) mit GAP als Substrat



Der Enzymtest wurde mit einigen Modifikationen in Anlehnung an die Methode von PUPILLO & GIULIANI PICCARI (1973) durchgeführt. Statt GAP als Substrat wurde FBP (Fructose-1,6-bisphosphat) eingesetzt. Durch Zugabe von Aldolase wird FBP in DHAP und das Substrat GAP umgesetzt.

Gesamtvolumen:	50 mM	Tricin/KOH, pH 8,5
(1 ml)	0,4 mM	NAD(P)
	2 Units	Aldolase
	1 mM	FBP
	10 mM	Natriumarsenat

Die Änderung der Extinktion bei 334 nm oder 340 nm wurde bei 25°C in einem Spektralphotometer 1001 (Eppendorf) oder Uvikon 810 (Kontron) mindestens fünf Minuten lang verfolgt.

2.10. Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte in Anlehnung an die Methode von BRADFORD (1976) spektralphotometrisch mit dem Farbstoff Coomassie Brilliant Blue G250/R250. Die Extinktionen wurden bei 595 nm gemessen, wobei BSA als Eichprotein verwendet wurde.

2.11. Molekulargewichtsbestimmung von NAD(P)(H)-GAPDH durch Gelfiltration

Das Molekulargewicht des nativen Enzyms wurde mittels Gelfiltration an der Superdex-200 (1,6 x 60 cm; Pharmacia) bestimmt (Flußrate: 1,5 ml/min). Die Eichung wurde mit Puffer H und den Eichproteinen Cytochrom C (12,5 kDa), Chymotrypsinogen A (25 kDa), Ovalbumin (45 kDa), Albumin B (68 kDa), Katalase (240 kDa) und Ferritin (450 kDa) durchgeführt. Die Äquilibration der Säule sowie die Durchführung der Gelfiltration erfolgte in Puffer I. Die Protein-Detektion erfolgte über den Durchfluß-UV-Detektor des FPLC-Systems (Pharmacia).

Puffer H:	50 mM	Tris/HCl; pH 8,0
	150 mM	EDTA

Puffer I:	50 mM	Tris/HCl; pH 8,0
	5 mM	EDTA
	150 mM	KCl

2.12. SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE)

Diskontinuierliche SDS-PAGE (Gelplatte: 11,5 cm x 11,5 cm x 1,5 mm) wurde in Anlehnung an die Methode von LAEMMLI (1970) bei konstanter Feldstärke durchgeführt. Ein 15%iges Polyacrylamid-Trenngel wurde mit einem 3%igen Sammelgel überschichtet. Die Ermittlung der apparenten Molekulargewichte erfolgte unter Verwendung eines Proteinstandard-Gemisches (SIGMA Dalton Mark VII-L von Sigma, Deisenhofen) für Molekulargewichtsgrößen zwischen 13,2 kDa und 66 kDa nach der Methode von WEBER & OSBORN (1969).

2.13. Gewinnung von polyklonalem Antiserum

Spezifische polyklonale Antiseren gegen NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat wurden durch Immunisierung eines Kaninchens (New Zealand White Rabbits, Linie Z) mit isoliertem Protein gewonnen. Die Immunisierung erfolgte mit 500 µg isolierter NAD(P)(H)-GAPDH in komplettem *Freundschen Adjuvans* (50% v/v; Sigma, Deisenhofen). Nach 12-14 Tagen wurde

die Immunisierung wiederholt. Nach weiteren 12-14 Tagen wurde Blut aus der Ohrvene des Kaninchens entnommen, eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert und über Nacht bei 4°C gelagert. Das Serum wurde am nächsten Morgen dekantiert und zehn Minuten bei 3000g in einer Tischzentrifuge (Herolab, Wiesloch) zentrifugiert, mit 0,04% (w/v) NaN₃ versetzt und portioniert bei -20°C gelagert.

2.14. Western Blotting

Der Proteintransfer auf Nitrocellulose-Membranen (Protran Nitrocellulose BA85 (0,45 µm; Schleicher & Schuell, Dassel) erfolgte in Anlehnung an BURNETTE (1981). Nach der SDS-PAGE erfolgte der Transfer in einer Multiphor II *Blotting* Apparatur (Pharmacia, Freiburg) bei 0,8 mA/cm² h⁻¹.

2.14.1. Quantifizierung von *Western-Blots*

Zur Quantifizierung von GapA und GapB in Spinatblättern, wurde das Blattgesamtprotein mit Extraktionsmedium extrahiert.

Extraktionsmedium:	50 mM	Hepes/KOH; pH 7,0
	0,1%	SDS
	2 mM	Na(SO ₃) ₂
	0,01%	BSA

Mit einem Aliquot wurde eine SDS-PAGE (vgl. Kap. 2.12.) und anschließend ein *Western-Blotting* (vgl. Kap. 2.14.) durchgeführt. Für einen *Western-Blot* wurde Antikörper gegen gereinigte NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat verwendet. Die erhaltenen Banden GapA und GapB wurden mit einem Gelscanner (Modell 1650, BioRad, München) gescannt, um festzustellen, ob GapA und GapB in Spinat in identischen Mengen vorhanden sind.

2.15. Aktivierungsmöglichkeiten von NAD(P)(H)-GAPDH durch 1,3bisPGA und Reduktionsmittel

Zur Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH erfolgte eine Vorinkubation des Enzyms mit dem jeweiligen Aktivator wie 1,3bisPGA und/oder DTT_{red} in einem *E-Cup* für mindestens zehn Minuten. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Aliquots entnommen und die NAD(P)(H)-GAPDH-Aktivität entweder in der NAD(P)(H)-reduzierenden oder -oxidierenden Richtung ermittelt. Alle Versuche, die unter reduzierende Bedingungen stattfanden, wurden mit entgasen, mit Stickstoff durchlüfteten Puffern durchgeführt.

Die Synthese von 1,3bisPGA erfolgte mit folgenden Komponenten in einem *E-Cup* für mindestens zehn Minuten.

Synthese von 1,3bisPGA

Endvolumen: (500 µl)	100 mM	Tris/HCl; pH 7,8
	1 mM	EDTA
	8 mM	MgSO ₄
	9 mM	3PGA
	4 mM	ATP
	3,6 Units	PGK

Die 1,3bisPGA-Konzentration dieses Ansatzes beträgt 105,6 µM.

Anschließend wurden in einem weiteren *E-Cup* Aliquots des synthetisierten 1,3bisPGA mit ca. 0,06 µg NAD(P)(H)-GAPDH in 500 µl Endvolumen versetzt. Wenn nicht anders angegeben, wurde NAD(P)(H)-GAPDH mit 21,12 µM 1,3bisPGA für mindestens zehn Minuten in

kubiert. Die NADP(H)-GAPDH-Aktivität wurde zu verschiedenen Zeitpunkten durch Entnahme entsprechender Volumina im NAD(P)H-reduzierenden oder -oxidierenden Aktivitätstest ermittelt. Als Kontrolle wurde die Aktivität für das nicht aktivierte Enzym vor Zugabe von 1,3bisPGA zum Aktivierungsansatz ermittelt. Eine Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH durch ATP, 3PGA und MgSO_4 allein in den im Bildungsansatz vorhandenen Konzentrationen wurde in Kontrollexperimenten ausgeschlossen.

Zur Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH durch Reduktionsmittel wurden ca. 0,06 μg NAD(P)(H)-GAPDH, falls nicht anders angegeben, mit 10 mM DTT_{red} bei pH 7,8 unter Stickstoffatmosphäre inkubiert. Die Aktivitätsmessungen erfolgten anhand von Aliquots, wie unter 2.9.1. beschrieben.

2.16. Bestimmung der K_m - und V_{max} -Werte für Substrate und Coenzyme verschiedener Isoenzyme der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat und roter Paprikafrucht

K_m - und V_{max} -Wert-Bestimmungen wurden mit der isolierten NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat, der proteolysierten NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat, den rekombinant hergestellten Gap^{AM}-, Gap^{BM}- und Gap^{BM^{AC}}-Formen aus Spinat; der angereicherten NAD(P)(H)-GAPDH aus roter Paprikafrucht, der angereicherten GapCp aus roter Paprikafrucht und der gereinigten rekombinanten GapCp aus roter Paprikafrucht bestimmt. Die K_m - und V_{max} -Wert-Bestimmung erfolgte entweder vollständig oder teilweise für die Substrate 1,3bisPGA und GAP, sowie für die Coenzyme NADPH, NADH und NAD.

Die jeweiligen GAPDH-Isoenzyme wurden zur K_m -Wert-Bestimmung, wie jeweils angegeben, vorbehandelt.

- ohne Vorinkubation
- mit 1,3bisPGA inkubierte GAPDH
- mit DTT_{red} inkubierte GAPDH
- mit 1,3bisPGA und DTT_{red} inkubierte GAPDH

Für die Vorinkubation mit DTT_{red} wurde das Enzym zuvor 30 Minuten mit 20 mM DTT_{red} versetzt. 1,3bisPGA wurde sowohl zur Vorinkubation (30 min) der Isoenzyme in *E-Cups*, als auch als Substrat mit steigenden Konzentration in der Küvette eingesetzt. In beiden Fällen wurde ein 1,3bisPGA-generating system eingesetzt, da 1,3bisPGA sehr instabil ist. Die Synthese von 1,3bisPGA erfolgte entweder in *E-Cups* für die Vorinkubation (21 μM , vgl. Kap. 2.13.), oder in Küvetten. In den Küvetten wurden die ATP-Konzentrationen mit 0,2 mM konstant niedrig eingesetzt, um eventuelle Aktivierungen auszuschalten; die 3PGA-Konzentrationen wurden variiert. Die Enzym-Aktivitäts-Messungen erfolgten mit steigenden Substrat- oder Coenzymkonzentrationen mittels Standard-Enzymtest. Die K_m -Werte wurden nach der Methode von 'Lineweaver-Burk' bestimmt.

2.17. Bestimmung der K_a -Werte für verschiedene Aktivatoren der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat

Für die isolierte NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat wurden die K_a -Werte für ATP, NADP, NADPH und 1,3bisPGA ermittelt. Dazu wurde die NAD(P)(H)-GAPDH unterschiedlich vorbehandelt.

- Vorinkubation mit NAD
- Vorinkubation mit DTT_{red}
- Vorinkubation mit NAD und DTT_{red}

Die Vorinkubation mit DTT_{red} erfolgte, indem das Enzym zuvor 30 Minuten mit 20 mM DTT_{red} versetzt wurde. 1,3bisPGA wurde im Vorinkubationsansatz durch ein 1,3bisPGA-generating system gebildet, da 1,3bisPGA sehr instabil ist. Die Synthese von 1,3bisPGA erfolgte in *E-Cups*. Dazu wurden die ATP-Konzentrationen mit 0,2 mM konstant niedrig gehalten, um eventuelle Aktivierungen auszuschalten; die 3PGA-Konzentrationen wurden variiert. Die Inkubation mit 1,3bisPGA und NAD (0,14 mM) erfolgte ebenfalls für 30 Minuten.

Der K_a -Wert wurde bestimmt, indem die NADPH-abhängige Aktivität der jeweiligen Enzymform (Standard-Enzymtest) mit jeweils steigenden Aktivator-Konzentrationen in der Küvette 32 Minuten lang gemessen wurde. Anschließend wurden nach der Methode von 'Lineweaver-Burk' die zu einem bestimmten Zeitpunkt (z.B. 20 min) erhaltenen V_{max} -Aktivitäten in Abhängigkeit von den eingesetzten Aktivator-Konzentrationen in einer Grafik dargestellt. Nach dem Prinzip der K_m -Wert-Bestimmung wird somit die Aktivierungsrate eines Aktivators bestimmt (doppelt-reziproke Darstellung).

2.18. Isolierung intakter Chloroplasten aus Spinat und intakter Chromoplasten aus roter Paprikafrucht

Isolierung intakter Chloroplasten aus Spinat

Intakte Chloroplasten wurden nach der Methode von BACKHAUSEN et al. (1994) isoliert. Diese Methode zur Isolierung von Chloroplasten aus Spinatblättern wurde als Standard verwendet.

Eine vereinfachte Methode der Isolierung intakter Chloroplasten aus Spinat (nach MOURIOUX & DOUCE 1981) wurde als Ausnahme in Versuchen angewendet, in denen in intakten Spinat-Chloroplasten und intakten Chromoplasten roter Paprikafrüchte die Enzymaktivitäten und Molekulargewichte der NAD(P)(H)-GAPDH und der GapCp verglichen wurden (vgl. Kap. 3.14.1., s. Abb. 36).

Isolierung intakter Chromoplasten aus roter Paprikafrucht

Intakte Chromoplasten aus roter Paprikafrucht wurden in Anlehnung an die Methode von CAMARA (1993) isoliert. Die Spinat- und Paprika-Plastiden wurden von J. E. Backhausen und S. Vetter (Universität Osnabrück) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.19. Bestimmung des Chlorophyll-Gehalts

Der Chlorophyll-Gehalt wurde bestimmt, indem 200 µl der Chloroplasten-Proben mit 800 µl Aceton p.A. für fünf Minuten bei 4°C inkubiert wurden. Die Proben wurden eine Minute bei höchster Drehzahl zentrifugiert (Tischzentrifuge, Herolab). Die Extinktion des Überstandes wurde bei 652 nm gegen Aceton p.A. (80%) als Referenz gemessen. Die Berechnung des Chlorophyll-Gehalts erfolgte nach ARNON (1949):

$$\frac{E_{652}}{36} = \text{Chlorophyllgehalt (mg/ml Acetonextrakt)}$$

2.20. Bestimmung des Intaktheitsgrade

Bestimmung des Intaktheitsgrades isolierter Chloroplasten aus Spinat

Für jede einzelne Präparation wurde der prozentuale Anteil intakter Spinat-Chloroplasten nach der Methode von LILLEY et al. (1975) bestimmt. Es wurden nur Chloroplasten verwendet, die einen Intaktheitsgrad von mindestens 90% aufwiesen.

Bestimmung des Intaktheitsgrades isolierter Chromoplasten aus roter Paprikafrucht

Die Intaktheit von Chromoplasten aus roter Paprikafrucht wurde mittels Latency-Test (QUAIL 1979) von NAD(P)(H)-GAPDH überprüft und mit 78-86% bestimmt. Kontaminierungen mit anderen Kompartimenten wurden durch Marker-Enzym-Messungen (QUAIL 1979) ausgeschlossen. Für Mitochondrien wurde Citrat-Synthase-, für das Cytosol Pyrophosphorylase- und für Peroxisomen Hydroxypyruvat-Reduktase- oder Katalase-Aktivität gemessen.

2.21. Messung von NAD(P)(H)-GAPDH-Aktivität in isolierten intakten Spinat-Chloroplasten

Isolierte Chloroplasten wurden in der Sauerstoffelektrode (Hansatech, Kings Lynn) in einem Inkubationsansatz verschiedenen Bedingungen (Dunkelheit, Belichtung bei 700 μ E oder Zugabe von Stoffwechselintermediaten) ausgesetzt.

Reaktions-

ansatz:	330 mM	Sorbit
(1 ml)	20 mM	Hepes/KOH; pH 7,6
	2 mM	EDTA
	1 mM	MgCl ₂
	1 mM	MnCl ₂
	0,2%	BSA, entfettet

Inkubations-

ansatz:	0,2 mM	KH ₂ PO ₄
	500 Units	Katalase
	5 mM	NaHCO ₃
	15 μ l	isolierte Chloroplasten (ca. 50 μ g Chl/ml Gesamtvolumen)

Die Chloroplasten wurden im Dunkeln zugegeben, wobei nach 2minütiger Adaptation der 'Dunkel-Wert' entnommen wurde. Daraufhin wurden Stoffwechselintermediate (ATP und 3PGA) und K₂HPO₄ in verschiedenen Konzentrationen, oder DTT_{red} zugegeben. Der Zeitpunkt der Zugabe wurde gleich Null gesetzt. In weiteren Versuchen wurden die dunkel gehaltenen Chloroplasten, denen entweder kein oder ein Effektor zugesetzt wurde, nach fünf Minuten belichtet. Proben belichteter Chloroplasten wurden nach sechseinhalb Minuten der Belichtung entnommen oder nach vier Minuten der Belichtung wurde ATP zugesetzt. Aliquots (ca. 1,5 μ g Chlorophyll - 50 μ l der Chloroplastensuspension) wurden zu verschiedenen Zeitpunkten in 250 μ l entgasten Puffer J überführt, geschüttelt und in flüssigem Stickstoff bis zur Messung gelagert.

Puffer J:	4 mM	EDTA; pH 8,0
	0,05% (v/v)	Triton X-100; pH 7,8 (KOH)

2.22. Herstellung der Proben zur Metabolitenbestimmung im Chloroplasten durch Silikonölzentrifugation

Zur Bestimmung der Metabolitengehalte im Stroma der Chloroplasten wurden sie mittels Silikonölzentrifugation (HELDT 1980, STITT et al. 1989) vom umgebenden Medium abgetrennt. Dazu wurden 400 μ l Polyethylenröhrchen (Sarstedt, Nürnberg) folgendermaßen beschichtet:

Perchlorsäure-Lösung:	700 mM	Saccharose
	8%	HClO ₄
	1 mM	EDTA
	0,025% (v/v)	Triton X-100
	70 µl	Silikonöl AR20/AR200 (Wacker München) (1/5)
	200 µl	Chloroplastensuspension

Zuerst wurden 50 µl Perchlorsäure-Lösung in die Polyethylenröhrchen gefüllt, die durch kurze Zentrifugation in die Spitze des *E-Cups* befördert wurde. Darauf wurden 50 µl Silikonöl pipettiert und erneut kurz zentrifugiert. Auf zwei bis sechs Gradienten wurden jeweils 200 µl Chloroplastensuspension zügig aufgetragen und 30 Sekunden in einer Tischzentrifuge mit Horizontalrotor (Mikrofuge E, Beckman) zentrifugiert. Proben, die während der Belichtung genommen wurden, wurden während der Zentrifugation mit der gleichen Lichtstärke mittels eines Diaprojektors belichtet, der über der Zentrifuge angebracht war. Anschließend wurden sie in flüssigem Stickstoff bis zur Messung gelagert. Zur Analyse der Metaboliten im Stroma wurden die Gradienten im Eisbad aufgetaut. Aus der unteren Phase wurde mit einer 50 µl-Hamiltonspritze 45 µl-Aliquots entnommen.

2.23. Neutralisierung der Proben

Nach dem Auftauen der Perchlorsäure-Extrakt-Proben im Eisbad wurde durch Zugabe des doppelten Volumens Neutralisierungs-Lösung ein pH-Wert von 7,5 eingestellt. Zur Neutralisierung wurde 15 Minuten auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das ausgefallene Kaliumchlorat durch 5minütige Zentrifugation entfernt.

Neutralisierungs-Lösung:	8 ml	3 M KHCO ₃ (gesättigt)
	1 ml	1 M Triethanolamin/HCl, ungepuffert ad pH 9,0 mit
	0,5-1 ml	3 M K ₂ CO ₃ (gesättigt)

2.24. Metabolitenbestimmung im Chloroplasten: ATP, ADP, 3PGA und DHAP

ATP- und ADP-Konzentrationen im isolierten intakten Chloroplasten

Die Bestimmung der ATP- und ADP-Konzentrationen im Chloroplasten erfolgte nach der luminometrischen Methode von HAMPP (1985). Dazu wurden aliquote Anteile der neutralisierten Proben aus der unteren Phase verwendet (vgl. Kap. 2.23.). Die ATP- und ADP-Bestimmungen wurden freundlicherweise von J. E. Backhausen (Universität Osnabrück) und C. Kitzmann (TU Berlin) durchgeführt.

3PGA- und DHAP-Konzentrationen im isolierten intakten Chloroplasten

Die Bestimmung der 3PGA- und DHAP-Konzentrationen im Chloroplasten erfolgte nach der Methode von LOWRY & PASSONEAU (1972) am Sigma ZFP 22 Doppelwellenlängenphotometer bei einer Wellenlänge von 334 nm und einer Referenzwellenlänge von 405 nm. Dazu wurden aliquote Anteile der neutralisierten Proben aus der unteren Phase verwendet (vgl. Kap. 2.23.). Die 3PGA- und DHAP-Bestimmung wurde freundlicherweise von J. E. Backhausen (Universität Osnabrück) durchgeführt.

Die Konzentrationen von 3PGA und DHAP wurden mit folgendem Enzymtest ermittelt.

Gesamtvolumen: (1 ml)	100 mM	Tris/HCl; pH 8,1
	5 mM	MgCl ₂
	2 mM	ATP
	0,05 mM	NADH
		Chloroplastenprobe
zur DHAP- Bestimmung:	0,5 Units	Glycerin-3-Phosphat-Dehydrogenase
	0,5 Units	Triosephosphat-Isomerase
	2 Units	PGK
zur 3PGA- Bestimmung:	2 Units	NAD(H)-GAPDH

Durch sukzessive Zugabe der Hilfsenzyme konnten beide Metabolite in einem Testansatz gemessen werden.

2.25. Molekulargewichtsbestimmung der NAD(P)(H)-GAPDH in Spinat-Chloroplastenextrakten

Die Chloroplastenisolierung erfolgte wie unter 2.18. beschrieben. Inkubation und Belichtung der Chloroplasten erfolgte in der Sauerstoffelektrode unter gleichen Bedingungen, wie in 2.21. beschrieben. Während der Inkubation wurden Proben zur Molekulargewichtsbestimmung an der Superdex-200 entnommen. Dazu wurden jeweils 400 µl der Chloroplastensuspension (ca. 200 µg Chl) in 1600 µl Puffer J überführt. Die erhaltenen 2 ml-Proben wurden entweder bei höchster Drehzahl in einer Eppendorf-Tischzentrifuge zentrifugiert oder durch einen FP 030/3-Nitrocellulosefilter (Schleicher & Schuell, Dassel) gepreßt (klare Chloroplastensuspension) und sofort auf die Superdex-200 (Pharmacia) aufgetragen (vgl. Kap. 2.11., Puffer I). Die Aktivitätsbestimmung in den erhaltenen Fraktionen erfolgte im Standard-Aktivitätstest, wobei, wenn nicht anders angegeben, die Anfangsaktivitäten ermittelt wurden.

2.26. Molekulargewichtsbestimmung der NAD(P)(H)-GAPDH und der NAD(H)-GapCp in roten Paprikafrucht-Chromoplasten

Die Isolierung intakter Chromoplasten aus roter Paprikafrucht erfolgte wie unter 2.18. beschrieben. 1 mg/ml rote Paprika-Chromoplasten wurden in 1600 µl Puffer J (vgl. Kap. 2.21.) überführt, gemischt und für fünf Minuten bei 10000g zentrifugiert und gegebenenfalls durch einen 0,2 µm-Filter (Schleicher & Schuell, Dassel) gepreßt. Anschließend wurde der Überstand (2 ml) auf die Superdex-200 (Pharmacia) aufgetragen (vgl. Kap. 2.4.1., Puffer I). In den erhaltenen Fraktionen wurden die Aktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH und der NAD(H)-GapC im Standard-Enzymtest bestimmt.

2.27. Limitierte Proteolyse der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat

Die limitierte Proteolyse wurde in Anlehnung an die Methode von ZAPPONI et al. (1993) durchgeführt. NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat (1mg/ml) wurde zunächst mittels einer NAP5-Säule entsalzt und in 50 mM Tes/KOH-Puffer, pH 7,4 umgepuffert. Anschließend wurde die Proteinlösung im Thermoblock bei 37°C mit 10% (w/w) V8-Endoproteinase aus *Staphylococcus aureus* inkubiert. Für die Aktivitätsmessungen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten Aliquots entnommen und mit 10% (w/w) Protease-Inhibitor (α_2 -Makroglobulin) versetzt, um die Proteolyse zu stoppen. Parallel dazu wurden Aliquots entnommen, ebenfalls mit α_2 -Makroglobulin gestoppt und mit den Proben eine SDS-PAGE durchgeführt. Um die Inten

sität der Banden zu bestimmen, wurde das Gel mit einem Gelscanner (Modell 1650, BioRad, München) gescannt. In weiteren Versuchen wurden nach verschiedenen Zeiten der Proteolyse Proben entnommen und mit ihnen Gelfiltrationen an der Superdex-200 (Pharmacia) durchgeführt.

2.28. Bioinformatische Analysen

Die in dieser Arbeit benötigten Aminosäuresequenzen verschiedener Isoenzyme der GAPDH wurden über den "*ExpPASy Molecular Biology Server*" des Swiss Institute of Bioinformatics unter (<http://www.expasy.ch>) aufgerufen.

Identitäten und Homologien der GAPDH-Isoenzyme wurden mit Hilfe des Programms "LALIGN" (http://www.ch.embnet.org/software/LALIGN_form.html) nach dem Algorithmus von HUANG & MILLER (1991) erstellt.

2.29. Darstellung der Ergebnisse

Die im Laufe dieser Arbeit erzielten Ergebnisse mit intakten isolierten Chloroplasten waren nicht in allen Fällen völlig identisch. Da Spinat hydroponisch in der Klimakammer angezogen wurde, traten entwicklungs- und jahreszeitliche Schwankungen auf, jedoch nur in geringem Umfang. Die beobachteten Abweichungen rühren zum Teil von Schwankungen des Chlorophyllgehaltes her, welcher als Bezugsgröße für alle Messungen diente. Die im Ergebnisteil dargestellten Abbildungen führen daher typische Ergebnisse, die mit einer repräsentativen Chloroplastenpräparation erhalten wurden, auf. Die einzelnen Experimente wurden mindestens dreimal wiederholt, und in allen Fällen wurden tendenziell gleiche Resultate erzielt

3. Ergebnisse

3.1. Untersuchungen zur NAD(P)(H)-GAPDH-Aktivierung in isolierten intakten Spinat-Chloroplasten

3.1.1. Chloroplasten in der Dunkelphase

Die NADPH-abhängige Aktivität der isolierten chloroplastidären NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat wird durch Reduktion sowie durch Metabolite wie 1,3bisPGA, ATP, NADP und NADPH gesteigert.

Zum Verständnis der Regulation *in vivo* ist es wichtig, die Zusammenhänge zwischen Reduktion und Effekten spezifischer Metabolite im intakten System zu untersuchen. Die Manipulation der Metabolitgehalte in isolierten intakten Chloroplasten ist wesentlich komplizierter als beim isolierten Enzym, da nur wenige Metabolite durch spezifische Translokatoren in das Stroma transportiert werden können. Pyridinnucleotide werden nicht über *Envelope*-Membranen transportiert, wodurch eine Manipulation der NAD(P)(H)-Gehalte nicht möglich ist. Die Aufnahme von 3PGA in die Chloroplasten erfolgt im Gegentausch mit P_i über den Phosphattranslokator (FLIEGE et al. 1978). Für ATP ist ein von HELDT (1969) beschriebener Adeninnucleotid-Translokator vorhanden. Die Berechnung der 1,3bisPGA-Konzentration im Chloroplasten erfolgt mittels der Gleichgewichtskonstanten der PGK (vgl. Kap. 2.9.), und es wird davon ausgegangen, dass die externe Zugabe von ATP zu einem gleichzeitigen Export von ADP führt, so dass die ADP-Konzentrationen im Spinat-Chloroplasten gleich Null gesetzt werden können (HELDT 1969).

Als in Frage kommender Metabolit-Effektor wurde zunächst 1,3bisPGA ausgewählt, um zu überprüfen, ob es die NAD(P)(H)-GAPDH in isolierten intakten Spinat-Chloroplasten aktiviert. Durch externe Zugabe von 3PGA und ATP kann im Chloroplasten während der Dunkelphase die Konzentration von 1,3bisPGA manipuliert werden. Im Chloroplasten ist die Aktivität der PGK ausreichend vorhanden, um selbst im Dunkeln das Gleichgewicht zwischen 3PGA, ATP und 1,3bisPGA einzustellen (EDWARDS & WALKER 1983). Im Dunkeln können nicht nur die metabolischen Verhältnisse, sondern auch die Reduktionen von Zielenzymen simuliert werden. Dies kann durch Zugabe von Reduktionsmitteln wie DTT_{red} erreicht werden.

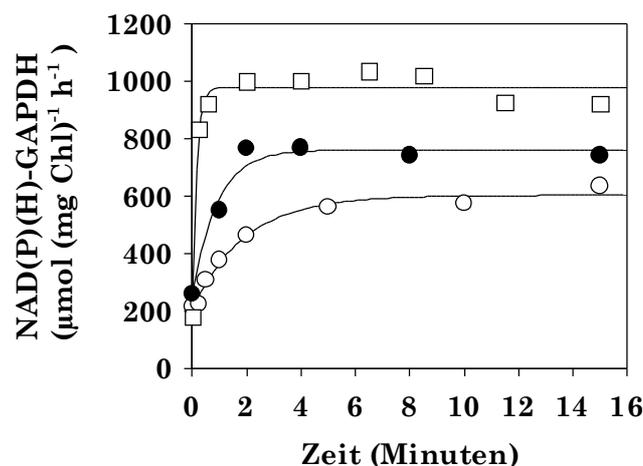


Abbildung 6: Zeitlicher Verlauf der Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH in intakten Spinat-Chloroplasten im Dunkeln unter verschiedenen Zusätzen zum Medium. Die Chloroplasten wurden dunkel gehalten und entweder (○) 20 mM DTT_{red} oder (●) 5 mM 3PGA und 2 mM ATP (55,6 μ M 1,3bisPGA) oder (□) zusammen zum Zeitpunkt Null zugesetzt. Die Anfangsaktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH in den Proben wurden im Standard-Enzymtest zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Der Aktivitätstest wurde mit NADPH als Co-enzym durchgeführt.

In Abbildung 6 ist dargestellt, wie NAD(P)(H)-GAPDH in Spinat-Chloroplasten im Dunkeln auf die Zugabe von 20 mM DTT_{red} alleine, 5 mM 3PGA und 2 mM ATP (55,6 μ M 1,3bisPGA) alleine, sowie in Kombination reagiert. Der zeitliche Verlauf der Aktivität des Enzyms wurde 16 Minuten lang verfolgt.

Durch Zugabe von 20 mM DTT_{red} verdreifacht sich die Aktivität der NAD(P)(H)-GAPDH-Grundaktivität auf ca. 60%. Die Errechnung der 1,3bisPGA-Konzentration im Stroma der Dunkel-inkubierten Chloroplasten erfolgte mittels der Gleichgewichtskonstanten der PGK unter der Annahme, dass die ADP-Konzentration aufgrund des Austausches gegen externes ATP vernachlässigbar gering ist. Mit 55,6 μ M 1,3bisPGA, welches aus 2 mM ATP und 5 mM 3PGA im Chloroplasten gebildet wird, wird das Enzym auf ca. 70% aktiviert. Die Maximalaktivität von 1000 μ mol (mg Chl)⁻¹ h⁻¹ wurde nur erreicht, wenn das Enzym mit beiden Effektoren inkubiert wurde. Hier nicht aufgeführte Versuche ergaben, dass bei gleichzeitiger Inkubation mit 20 mM DTT_{red} eine Konzentration von 5 μ M 1,3bisPGA ausreicht, um die NAD(P)(H)-GAPDH ebenfalls maximal zu aktivieren. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass bei externer Zugabe sehr hoher Mengen an ATP und 3PGA zu Spinat-Chloroplasten im Dunkeln der Umsatz der von der NAD(P)(H)-GAPDH katalysierten Reaktion zunimmt und ADP in signifikanten Mengen akkumulieren kann. Aus diesem Grund können die realen 1,3bisPGA-Konzentrationen geringer sein als die errechneten.

Durch Zugabe variierender Konzentrationen von ATP und gleichbleibender Konzentrationen von 3PGA zu Spinat-Chloroplasten in der Dunkelphase wurde die Aktivierungskonstante (K_a) der NAD(P)(H)-GAPDH bestimmt. Die *steady-state*-Aktivitäten, die nach 20 Minuten gemessen wurden, wurden gegen die errechneten 1,3bisPGA-Konzentrationen aufgetragen.

Tabelle 4: Aktivierungsstatus der NAD(P)(H)-GAPDH in Chloroplasten während der Dunkelphase, der sich abhängig aus der Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von ATP und gleichbleibender Konzentration von 3PGA ergibt. Die NADPH-abhängige Aktivität der GAPDH war zwischen zwei und sechs Minuten nach der Zugabe konstant. Die resultierende 1,3bisPGA-Konzentration wurde anhand der Gleichgewichtskonstanten der PGK-Reaktion ($K_{eq} = 3,1 \times 10^{-4}$) errechnet.

ATP (mM)	3PGA (mM)	1,3bisPGA (μ M)	NAD(P)(H)-GAPDH (μ mol (mg Chl) ⁻¹ h ⁻¹)
-	-	0,08 ^a	180
0,05	2,0	5,0	344
0,20	2,0	11,0	495
0,50	2,0	17,6	586
1,00	2,0	24,8	701
2,00	2,0	35,2	741

a: Dieser Wert wurde aus endogenen Konzentrationen von ATP und 3PGA ermittelt.

Aus den Werten in Tabelle 4 ergibt sich in Spinat-Chloroplasten im Dunkeln ein K_a -Wert für NAD(P)(H)-GAPDH für den Effektor 1,3bisPGA von 11-17 μ M.

3.1.2. Belichtete Chloroplasten

In Abbildung 7 wurden die Spinat-Chloroplasten zunächst fünf Minuten dunkel inkubiert und der zeitliche Verlauf der NADPH-Aktivität der NAD(P)(H)-GAPDH ohne weitere Zugaben, nach Zugabe von 1 mM ATP oder nach Zugabe von 2 mM 3PGA und 0,2 mM ATP (11 μ M 1,3bisPGA) verfolgt.

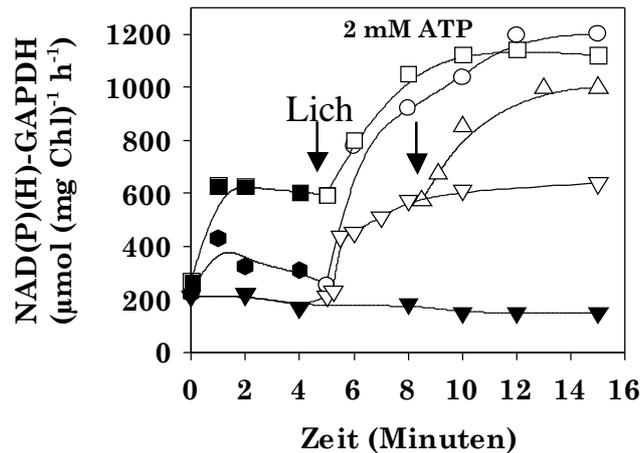


Abbildung 7: Zeitlicher Verlauf der Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH in intakten Spinat-Chloroplasten. Die Chloroplasten wurden vor der Belichtung (Pfeil und offene Symbole) fünf Minuten dunkel gehalten (geschlossene Symbole). Beim Start der Dunkelinkubation wurden entweder (●) 1 mM ATP oder (■) 2 mM 3PGA und 0,2 mM ATP (11 μ M 1,3bisPGA) zugesetzt. Zu der belichteten Probe (▽) ohne Zusätze wurden nach vier Minuten (△) 2 mM ATP zugegeben. Die Anfangsaktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH in den Proben wurden im Standard-Enzymtest zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Der Aktivitätstest wurde mit NADPH als Coenzym durchgeführt.

Unter Kontrollbedingungen, d.h. ohne Zugabe von Metaboliten, blieb die Aktivität der NAD(P)(H)-GAPDH im Dunkeln unverändert. Durch Zugabe von 1 mM ATP stieg die Grundaktivität der NAD(P)(H)-GAPDH von 200-300 μ mol (mg Chl) $^{-1}$ h $^{-1}$ während der Dunkelinkubation nur leicht an, während die Zugabe von ATP und 3PGA zu einer halbmaximalen Aktivität von 600 μ mol (mg Chl) $^{-1}$ h $^{-1}$ führte.

Nach dem Start der Belichtung stieg die Aktivität in allen drei Ansätzen zunächst schnell an. Durch alleinige Belichtung des unbehandelten Chloroplastenextraktes im Dunkeln konnten mit ca. 600 μ mol (mg Chl) $^{-1}$ h $^{-1}$ nur ca. 50% der Maximalaktivität erreicht werden. Wurde nach sechs Minuten 2 mM ATP zugegeben, stieg die Aktivität auf ca. 1000 μ mol (mg Chl) $^{-1}$ h $^{-1}$ an. Die Maximalaktivität von 1200 μ mol (mg Chl) $^{-1}$ h $^{-1}$ wurde im Ansatz mit 3PGA und ATP nach ungefähr fünf Minuten erreicht.

Während der Belichtung des Spinat-Chloroplasten erfolgt nicht nur eine Reduktion der NAD(P)(H)-GAPDH, sondern gleichzeitig erhöhen sich auch die Konzentrationen an 3PGA, ATP und 1,3bisPGA. Um zu klären, ob 1,3bisPGA oder ATP für die Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH in belichteten Spinat-Chloroplasten verantwortlich ist, wurden die ATP-, ADP- und 3PGA-Konzentrationen zu verschiedenen Zeitpunkten während der Belichtung bestimmt. Aus den ermittelten Werten wurden die entsprechenden 1,3bisPGA-Konzentrationen mittels der Gleichgewichtskonstanten der PGK (vgl. Kap. 2.9.) errechnet.

Aus Abbildung 8 ist zu ersehen, dass die Konzentration von ATP zunächst ansteigt, dann aber sinkt, während die 1,3bisPGA- und 3PGA-Konzentrationen in den ersten fünf Minuten der Belichtung kontinuierlich ansteigen. Die gemessenen ADP-Konzentrationen sind in Abbildung 8 nicht aufgeführt, denn der ATP- plus ADP-Level während des Dunkel/Licht-Wechsels bleibt mit 0,6 mM relativ konstant hoch.

Aus den Abbildungen 7 und 8 und der Tabelle 4 geht hervor, dass die Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH während der Belichtung keinerlei Korrelationen mit den Veränderungen der stromalen ATP-Konzentration aufweist. Im Gegensatz dazu verläuft der Anstieg der NADPH-GAPDH-Aktivität ohne Zugabe weiterer Effektoren (s. Abb. 7) parallel zum Anstieg der stromalen 1,3bisPGA-Konzentration (s. Abb. 8).

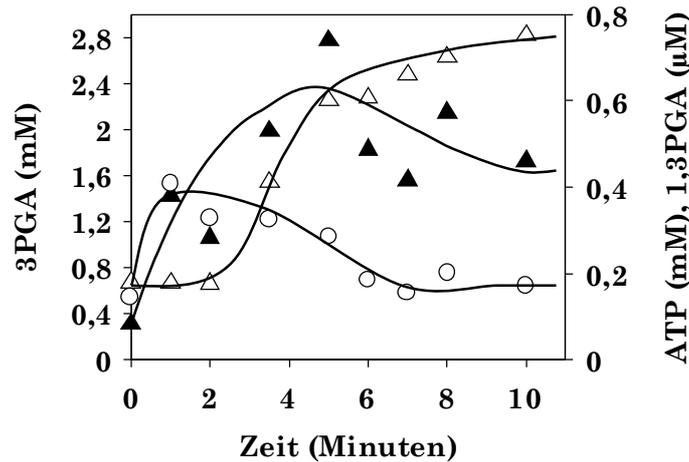


Abbildung 8: Änderungen der stromalen Metabolitengehalte während der Belichtung intakter Spinat-Chloroplasten. Die Konzentrationen von (○) ATP und (△) 3PGA wurden in den Proben zu den angegebenen Zeiten wie in Material und Methoden beschrieben, bestimmt (vgl. Kap. 2.24.). Die (▲) resultierende 1,3bisPGA-Konzentration wurde mit Hilfe der Gleichgewichtskonstanten der PGK-Reaktion kalkuliert ($K_{eq} = 3,1 \times 10^{-4}$).

3.2. Aggregationsformen der NAD(P)(H)-GAPDH in isolierten intakten Spinat-Chloroplasten

Aus bisherigen Ergebnissen ist ersichtlich, dass die NADPH-abhängige GAPDH in Abhängigkeit von Metaboliten oder durch Reduktion verschieden hohe Endaktivitäten erreicht. In weiteren Versuchen wurde untersucht, in wieweit die unterschiedlichen Endaktivitäten mit Änderungen im Molekulargewicht einhergehen. Für diese Versuche wurde die Superdex-200 Gelfiltrationssäule gewählt, um eine zuverlässige Trennung sowohl der tetrameren Form der NAD(P)(H)-GAPDH (150 kDa), als auch der hexadecameren Form der NAD(P)(H)-

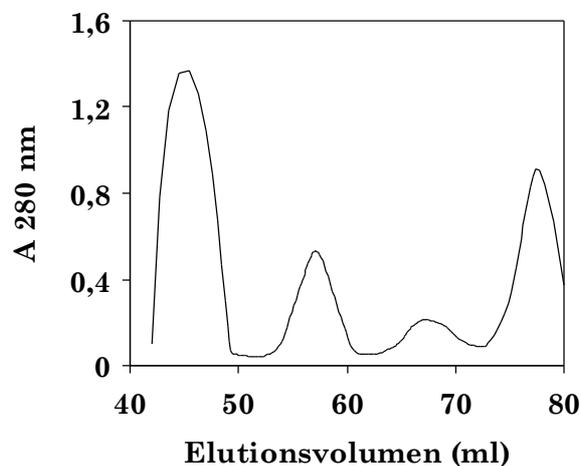


Abbildung 9: Protein-Elutionsprofil (280 nm) einer intakten Spinat-Chloroplastenprobe an der Superdex-200. Die Probe wurde nach sechseinhalb Minuten der Belichtung entnommen. Das Protein-Elutionsprofil eines Dunkel-gehaltenen Spinat-Chloroplasten unterscheidet sich nicht von belichteten Spinat-Chloroplasten (Daten nicht gezeigt).

GAPDH (600 kDa) zu erzielen. Diese Säule trennt Proteine in einem Molekulargewichtsbereich von 10 kDa bis 600 kDa. Somit ist gewährleistet, dass NAD(P)(H)-GAPDH in der hohen Molekulargewichtsform erst nach dem Ausschlußvolumen eluiert (PHARMACIA 1998). Gelfiltrationen von Chloroplastenextrakten ergaben ein charakteristisches Protein-Elutionsprofil (s. Abb. 9) mit vier Extinktionsmaxima bei 280 nm.

Das erste Maximum wurde bei der Elution des Gesamt-Chlorophyllgehalts mit Tritonvesikeln erreicht (Ausschlußvolumen bis 50 ml). Der zweite Peak (57 ml) bei 550 kDa enthält die RubisCo. Die meisten löslichen Proteine der Spinat-Chloroplasten eluierten im dritten Peak bei einem Elutionsvolumen von 67 ml (150 bis 200 kDa). Das dem Reaktionsansatz zugeetzte BSA eluierte bei einem Elutionsvolumen von 78 ml mit einem Molekulargewicht von 70 kDa.

3.2.1. Aggregationsformen der NAD(P)(H)-GAPDH in Chloroplasten während der Dunkelphase

In Abbildung 10 ist der Aggregationszustand der NAD(P)(H)-GAPDH in Chloroplasten im Dunkeln dargestellt. Die Chloroplasten wurden entweder nicht oder mit 10 mM DTT_{red}, oder ATP und 3PGA in verschiedenen hohen Konzentrationen inkubiert.

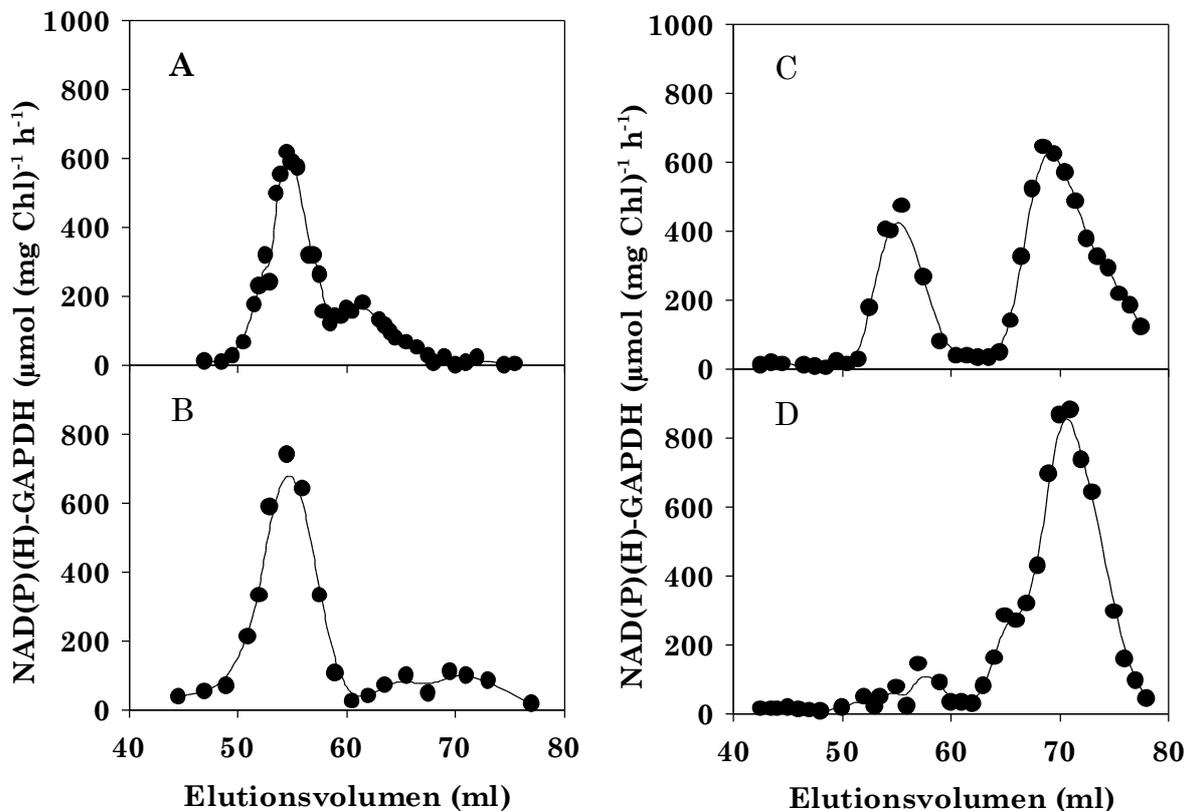


Abbildung 10: Aggregationszustände der NAD(P)(H)-GAPDH in intakten Spinat-Chloroplasten während der Dunkelphase in Abhängigkeit von Zusätzen zum Medium. Die Fraktionen wurden nach Vorinkubation mit 10 mM DTT_{red} in der Küvette und Start der Reaktion mit NADPH im Standard-Aktivitätstest gemessen. (A) ohne Zusatz, (B) 10 mM DTT_{red}, (C) 2 mM 3PGA und 0,2 mM ATP (11 μM 1,3bisPGA), (D) 5 mM 3PGA und 2 mM ATP (55,6 μM 1,3bisPGA). Das Elutionsvolumen von 53 ml entspricht dem Molekulargewicht von 600 kDa; von 70 ml dem von 150 kDa.

In den Chloroplasten erscheint die NAD(P)(H)-GAPDH im Dunkeln fast ausschließlich in der 600 kDa-Form, jedoch eluiert auch ein kleiner Anteil bei 300 kDa (s. Abb. 10A). Die Zugabe von 10 mM DTT_{red} zu Chloroplasten im Dunkeln resultierte überwiegend in der 600 kDa großen NAD(P)(H)-GAPDH-Form und nur ein geringer Anteil eluierte bei geringeren Molekulargewichten (s. Abb. 10B). Im Gegensatz dazu konnte in den mit den resultierenden 11 μM (s. Abb. 10C) und 55,6 μM (s. Abb. 10D) 1,3bisPGA-Konzentrationen behandelten Chloroplastenproben eine teilweise oder absolute Dissoziation in die 150 kDa-Form erzielt werden. In den Abbildungen 10A-D sind die Maximalaktivitäten der NADPH-abhängigen

Aktivität der NAD(P)(H)-GAPDH aufgeführt, da die NAD(P)(H)-GAPDH vor der Bestimmung der Aktivität im Enzymtest mit 10 mM DTT_{red} inkubiert wurde.

3.2.2. Aggregationsformen der NAD(P)(H)-GAPDH in belichteten Spinat-Chloroplasten

In weiteren Experimenten wurden Gelfiltrationen an der Superdex-200 mit sechseinhalb Minuten lang belichteten Chloroplasten (s. Abb. 11A) und Chloroplastenproben, denen nach

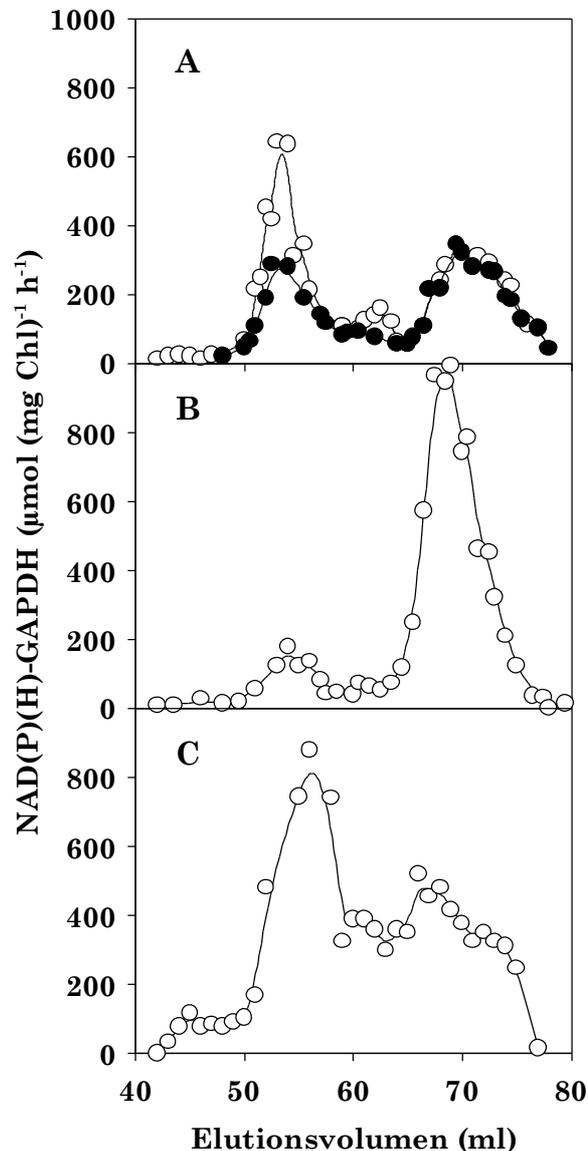


Abbildung 11: Aggregationszustände der NAD(P)(H)-GAPDH in belichteten intakten Spinat-Chloroplasten. Die Chloroplastenproben wurden nach sechseinhalb Minuten der Belichtung entnommen und im Standard-Aktivitätstest mit NADPH als Coenzym gemessen. (A) Die Fraktionen wurden ohne Vorinkubation (●) und nach Inkubation mit 10 mM DTT_{red} in der Küvette und Start der Reaktion mit NADPH gemessen (○). (B) ATP (2 mM) wurden nach vier Minuten Belichtung zugegeben und nach weiteren sechseinhalb Minuten die Probe gemessen. (C) Die Chloroplasten wurden zehn Minuten belichtet und dann verdunkelt. Die Probe wurde nach fünf Minuten im Dunkeln gemessen. Das Elutionsvolumen von 53 ml entspricht dem Molekulargewicht von 600 kDa; von 69 ml dem von 150 kDa.

vier Minuten Belichtung 2 mM ATP zugesetzt wurden (s. Abb. 11B), durchgeführt. In Abbildung 11C sind das Elutionsprofil und die NADPH-GAPDH-Aktivität, nachdem die Chlo

roplasten zehn Minuten belichtet und anschließend fünf Minuten dunkel gehalten wurden, aufgeführt.

In den Proben aus belichteten Chloroplasten findet sich die NADPH-abhängige Aktivität der NAD(P)(H)-GAPDH zu etwa gleichen Teilen in der 600- und 150 kDa-Form. Ein geringer Teil der Aktivität eluiert bei 300 kDa. Werden die einzelnen Fraktionen durch Zugabe von 10 mM DTT_{red} im Enzymtest aktiviert, steigt lediglich die Aktivität der 600 kDa-Form, nicht aber die der 150 kDa-NAD(P)(H)-GAPDH (s. Abb. 11A). Die Zugabe von 2 mM ATP zu belichteten Chloroplasten führt zu einer fast ausschließlichen Dissoziation der NAD(P)(H)-GAPDH in die tetramere Form (s. Abb. 11B). Nach der 5minütigen Dunkelinkubation von belichteten Chloroplasten aggregiert die NAD(P)(H)-GAPDH teilweise wieder in die 600 kDa-Form (s. Abb. 11C). Im Vergleich zur belichteten Probe findet sich nur unwesentlich mehr GAPDH-Aktivität im 600 kDa-Bereich. Die restliche Aktivität verteilt sich auf geringere Molekulargewichte. In diesem Experiment (s. Abb. 11C) parallel gemessene NADPH-GAPDH-Aktivität (nicht gezeigt) ohne Vorinkubation mit DTT_{red} im Enzymtest verringerte sich um etwa 50% der belichteten Probe (s. Abb. 11A).

3.3. Einfluß der Zugabe von Phosphat zu belichteten Chloroplasten und zu Chloroplasten während der Dunkelphase

Anorganisches Phosphat (P_i) im Inkubationsmedium der Chloroplasten beeinflusst signifikant die Rate der CO₂-Fixierung (FURBANK et al. 1987). Durch Zugabe einer geringen Phosphatkonzentration von 0,02 mM ist das ATP/ADP-Verhältnis relativ niedrig, während die 3PGA-Konzentration mit 2,7 mM relativ hoch liegt. Unter optimalen Bedingungen (0,2 mM Phosphat) steigt die ATP-Konzentration, während die 3PGA-Konzentration abnimmt. Die hohe Phosphatkonzentration von 2 mM Phosphat führt zu einem erhöhten ATP/ADP-Level, während die 3PGA-Konzentration sehr gering ist. Dieses Phänomen ist durch den Phosphat-Translokator, der Phosphat im Austausch mit Triose-Phosphaten und 3PGA vermittelt, bedingt (HELDT & RAPLEY 1970).

Tabelle 5: Metabolit-Gehalte, NADPH-GAPDH-Aktivierung und Aggregationszustände in isolierten intakten Spinat-Chloroplasten, die in Gegenwart verschiedener Phosphatkonzentrationen belichtet wurden. Die Proben wurden nach dreieinhalb Minuten der Belichtung in Parallel-Experimenten auf die Metabolit-Gehalte und Aktivitäten überprüft. Die Aggregationszustände wurden nach Gelfiltrationsexperimenten mit der Superdex-200 ermittelt und die Flächen unter den Peaks der Elutionsprofile bestimmt (die 300 kDa-Form wurde nicht berücksichtigt). Das Stroma-Volumen wurde mit 27 µl bestimmt (HELDT 1980). Die 1,3bisPGA-Konzentration wurde anhand der Gleichgewichtskonstanten der PGK-Reaktion ($K_{eq} = 3,1 \times 10^{-4}$) errechnet. Der Enzymtest wurde mit NADPH als Coenzym durchgeführt.

P _i (mM)	ATP (mM)	ADP (mM)	3PGA (mM)	1,3bisPGA (µM)	NADPH-GAPDH (µmol (mg Chl) ⁻¹ h ⁻¹)	150 kDa (%)	600 kDa (%)
0,02	0,133	0,301	2,722	0,370	700	34	41
0,2	0,326	0,295	1,538	0,527	750	39	42
2,0	0,379	0,215	0,382	0,210	680	39	35
0,2 ^a	0,144	0,360	0,672	0,083	200	6	68
0,2 ^b	0,110	0,307	0,601	0,067	650	15	68

a: Die Chloroplasten wurden dunkel gehalten.

b: Die Chloroplasten wurden im Dunkeln mit 20 mM DTT_{red} inkubiert.

In der Tabelle 5 sind die aus den oben genannten Bedingungen in belichteten Chloroplasten resultierenden 1,3bisPGA-Konzentrationen und die sich daraus ergebenden NADPH-GAPDH-Aktivitäten und Aggregationszustände aufgeführt.

In Tabelle 5 ist dargestellt, dass mit 0,2 mM Phosphat die maximale Aktivität der NADPH-GAPDH von $750 \mu\text{mol (mg Chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ mit der ebenfalls höchsten Konzentration an 1,3bisPGA von $0,527 \mu\text{M}$ korreliert, während die höchste Konzentration von ATP mit 0,379 mM (2 mM P_i) zu einer NADPH-GAPDH-Aktivität von $680 \mu\text{mol (mg Chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ führte.

Die Aggregationszustände der NAD(P)(H)-GAPDH sind unter diesen Bedingungen relativ konstant in der 600 kDa- und 150 kDa-Form verteilt. In Dunkel-adaptierten Chloroplasten ist die 1,3bisPGA-Konzentration so gering, dass die NAD(P)(H)-GAPDH fast ausschließlich in der 600 kDa-Form erscheint. Die Zugabe von DTT_{red} zu Chloroplasten im Dunkeln führt zu einer Aktivitätssteigerung der NADPH-GAPDH, ohne eine signifikante Dissoziation in die tetramere Form zu bewirken (s. Abb. 10B).

Die in den Kapiteln 3.1. bis 3.3. aufgeführten Ergebnisse sind in BAALMANN et al. (1994) publiziert.

3.4. Gibt es eine A₄-Form in Dunkel-adaptierten Spinat-Chloroplasten? Quantitative Überprüfung von GapA und GapB in isolierten Spinatchloroplasten

NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat besteht im gleichen Verhältnis aus GapA und GapB. Die isolierte $(\text{A}_2\text{B}_2)_4$ -Form des Enzyms zeigt auf dem SDS-Gel zwei separate Banden, deren Proteingehalt sich quantitativ nicht unterscheiden (BAALMANN 1993, FERRI et al. 1978). In Chloroplasten aus Spinat *in vivo* wurde darüber hinaus das Vorkommen der NAD(P)(H)-GAPDH in Multienzymkomplexen (CLASPER et al. 1991, 1994, SAINIS & HARRIS 1986, SAINIS et al. 1989, GONTERO et al. 1988, 1993, SÜSS et al. 1993) diskutiert. Außer der $(\text{A}_2\text{B}_2)_4$ -Form der NAD(P)(H)-GAPDH wurde das Enzym als Bestandteil eines GAPDH/PRK/CP12-Komplexes in Grünalgen und Spinat nachgewiesen (POHLMAYER et al. 1996, WEDEL et al. 1997, WEDEL & SOLL 1998, SCHEIBE et al. 2002). Darüberhinaus wurde ein Homotetramer von GapA (A₄-Form) (SCAGLIARINI et al. 1998, FERMANI et al. 2001), welches in Spinat vorkommt, beschrieben.

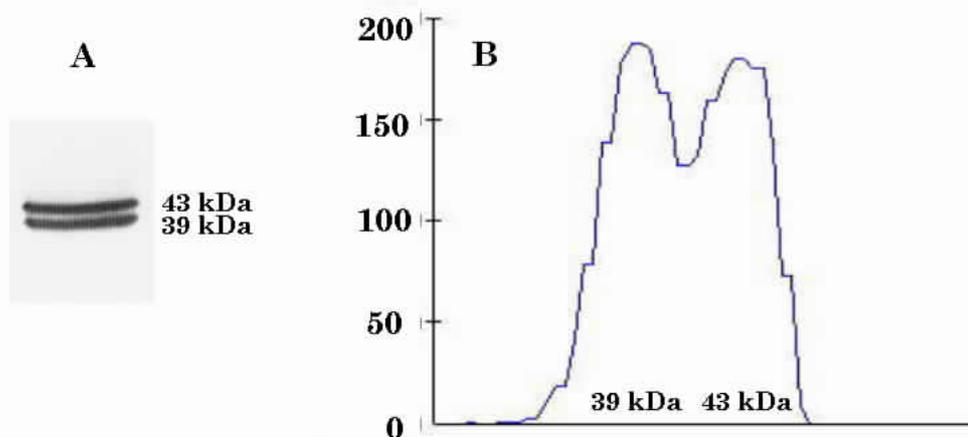


Abbildung 12: Quantitative Bestimmung der Untereinheiten GapA und GapB aus Dunkel-gehaltenen intakten isolierten Spinatchloroplasten. Nach durchgeführter SDS-PAGE (nicht gezeigt) wurden die beiden Banden von GapA (39 kDa) und GapB (43 kDa) mit (A) Antikörper gegen gereinigte NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat geblottet. Die Untereinheiten wurden (B) mit einem Gelscanner (Modell 1650, BioRad, München) gescannt. Linker Peak (GapA), rechter Peak (GapB).

Unabhängig davon, dass NAD(P)(H)-GAPDH Teil eines ME-Komplexes sein könnte, bzw. im GAPDH/PRK/CP12-Komplex auftritt, stellt sich die Frage, ob die A₄-Form der NAD(P)(H)-GAPDH in Spinat vorkommt. Da GapA nicht in der Lage ist, in die 600 kDa-Form zu aggregieren, müsste sie in Dunkel-adaptierten Chloroplasten als Tetramer vorliegen. Die 150 kDa-Form konnte in Spinat-Chloroplasten im Dunkeln jedoch nicht nachgewiesen werden (s. Abb. 10A). Würden parallel in Spinatchloroplasten die (A₂B₂)₄-Form, bzw. der GAPDH/PRK/CP12-Komplex und die A₄-Form der NAD(P)(H)-GAPDH vorkommen, müssten die Plastiden mehr GapA als GapB enthalten.

Mit einem Aliquot von Dunkel-gehaltenen intakten isolierten Spinatplastiden wurde eine SDS-PAGE durchgeführt. Anschließend erfolgte ein Westernblot mit Antikörpern gegen gereinigte NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat. Um festzustellen, ob GapA zu einem höheren prozentualen Verhältnis als GapB vorkommt, wurden die GapA- und GapB-Banden mit einem Gelscanner gescannt.

In Abbildung 12 ist der Anteil der Untereinheiten GapA und GapB aus Dunkel-adaptierten isolierten Spinatchloroplasten dargestellt. Der linke Peak zeigt GapA, der rechte Peak GapB. Beide Untereinheiten treten zwar nicht exakt im gleichen Verhältnis auf, jedoch scheint ausgeschlossen, dass der etwas höhere Anteil von GapA ausreicht, um ein eigenständiges Enzym, die A₄-Form zu bilden. Der Versuch wurde ebenfalls von FERRI et al. (1978) durchgeführt. Sie erhielten GapA und GapB in identischen Mengen.

3.5. Reinigung der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat

Für die Isolierung der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat wurde im Durchschnitt eine Ausbeute von 10-20% und ein Anreicherungsfaktor um das 90-130fache erzielt. Während einer Reinigung wurden ca. 10 mg NAD(P)(H)-GAPDH isoliert. Als letzter Schritt der Reinigung wurde eine Gelfiltration an der Superdex-200 durchgeführt. NADPH-GAPDH-Aktivität eluierte ausschließlich bei dem Molekulargewicht, welches der hexadecameren Form der NAD(P)(H)-GAPDH bei 600 kDa entspricht (BAALMANN 1993). Die spezifische Aktivität der 600 kDa-Form im oxidierten Zustand beträgt 10-30 U/mg Protein, die der 150 kDa-Form im reduzierten Zustand 120-150 U/mg Protein. Letztere spezifische Aktivität wurde auch von CERFF (1982) mit 100-150 U/mg Protein beschrieben.

3.6. 1,3bisPGA und DTT_{red} sind Aktivatoren der NAD(P)(H)-GAPDH im Standard-Aktivitätstest

Aus den Arbeiten von O'BRIEN & Powls (1976), O'BRIEN et al. (1977) und TROST et al. (1993) ist bekannt, dass Zugabe von 1,3bisPGA die NADPH-abhängige Aktivität der NAD(P)(H)-GAPDH aktiviert, und zu einer Dissoziation der 600 kDa- in die 150 kDa-Form führt. Für DTT_{red} ist ebenfalls eine Aktivierung der NADPH-GAPDH beschrieben (WOODROW et al. 1979, BUCHANAN 1980). Eine Aktivierung durch 1,3bisPGA und DTT_{red} der NAD(P)(H)-GAPDH konnte ebenfalls in den Versuchen mit Dunkel-adaptierten intakten Chloroplasten gefunden werden. Jedoch scheint die Aktivierung durch DTT_{red} in intakten Chloroplasten, wie in vorangegangenen Experimenten dargestellt, nicht zu einem signifikanten Molekulargewichtswechsel in die aktive 150 kDa-Form zu führen (s. Abb. 10). 1,3bisPGA alleine aktiviert die NADPH-abhängige Aktivität der NAD(P)(H)-GAPDH jedoch nur in physiologisch irrelevant hohen Konzentrationen. Es ist bislang noch nicht geklärt, welchen Anteil die Reduktion und die Aktivierung durch das Substrat einnehmen. Um dieser Frage nachzugehen, wurde die NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinatblättern isoliert und mit dem Enzym *in vitro* weitere Versuche durchgeführt.

Im Standard-Aktivitätstest wird 1,3bisPGA mittels der PGK aus ATP und 3PGA synthetisiert und kontinuierlich nachgebildet. Im von CERFF (1982) angegebenen Enzymtest sind zusätzlich 2 mM DTT_{red} enthalten. Der verwendete Standard-Aktivitätstest wurde jedoch ohne DTT_{red}-Zugabe durchgeführt, da durch die Kombination von Reduktionsmittel und 1,3bisPGA eine artifizielle Aktivierung während des Enzymtests erfolgt. In Abbildung 13 sind einige Beispiele aufgeführt, dass bei gleicher Zusammensetzung des Enzymtests mit jeweils 2,5 µg NAD(P)(H)-GAPDH in der Küvette unterschiedliche Anfangs- und End-Enzymaktivitäten gemessen werden können.

Unter den in den Abbildungen 13B und 13D gewählten Bedingungen treten *lag*-Phasen auf und die jeweiligen Anfangs- und Endaktivitäten variieren signifikant. In Abbildung 13A wurde das Enzym in den Testansatz ohne NADPH gegeben bzw. mit dem in der Küvette vorhandenen Substrat 1,3bisPGA zehn Minuten lang inkubiert. Anschließend wurde der Enzymtest mit NADPH gestartet. Die spezifischen Aktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH änderten sich unter diesen Bedingungen mit 115 U/mg Protein während der Messung innerhalb von zehn Minuten nicht. Wenn unter gleichen Bedingungen außerdem im Testansatz 2 mM DTT_{red} (s. Abb. 13C) enthalten sind, steigen die Anfangs- und Endaktivitäten der NADPH-abhängigen Aktivität der NAD(P)(H)-GAPDH auf 140 U/mg Protein an. In Abbildung 13B waren das Substrat 1,3bisPGA und NADPH vorhanden, bevor der Start des Enzymtests in diesem Fall nach zehn Minuten durch Zugabe von NAD(P)(H)-GAPDH erfolgte. Unter diesen Bedingungen ist die Anfangsaktivität sehr gering (22 U/mg Protein) und steigt innerhalb von 15 Minuten auf 62 U/mg Protein. In Abbildung 13D wurde unter gleichen Bedingungen dem Testansatz 2 mM DTT_{red} zugesetzt. Dies führte zu einer leichten Aktivitätssteigerung der Anfangs- und der Endaktivität und die *lag*-Phase ist kürzer.

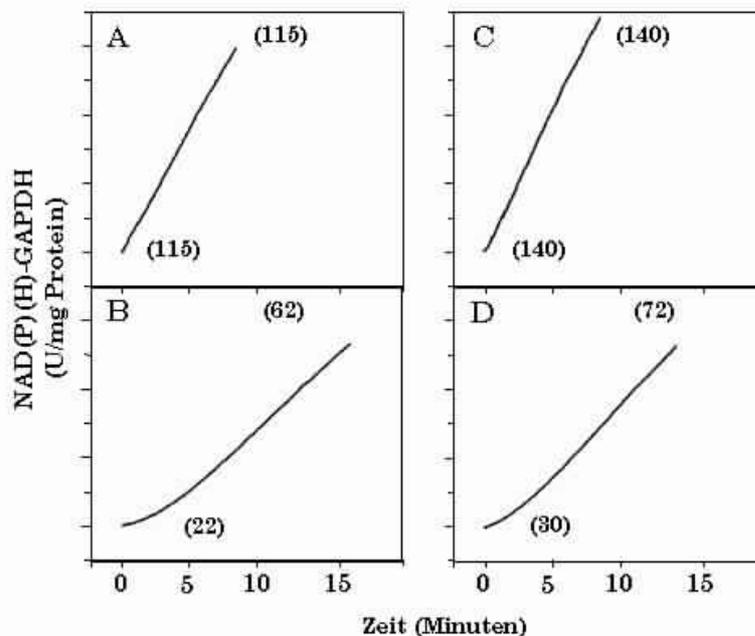


Abbildung 13: Anfangs- und Endaktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat im Standard-Enzymtest. Die Test-Ansätze enthielten identische Zusammensetzungen, außer dass in (B) und (D) zusätzlich 2 mM DTT_{red} zugegeben wurden. (A) und (C): Start der Reaktion mit NADPH. (B) und (D): Start der Reaktion mit NAD(P)(H)-GAPDH. Die Zahlen in Klammern stehen für die Anfangs- bzw. Endaktivitäten der NADPH-abhängigen Aktivität in U/mg Protein.

3.7. Zeitlicher Verlauf der Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH mit verschiedenen Thiolen und 1,3bisPGA

Ähnlich wie in dem Versuch mit isolierten intakten Chloroplasten (s. Abb. 6), kann mit isoliertem Enzym die Wirkung von Reduktion und 1,3PGA auf das Aktivierungsverhalten der NAD(P)(H)-GAPDH untersucht werden. Ein Vorteil der *in vitro*-Messungen liegt darin, dass Reduktion und 1,3PGA-Effekt auf die Aktivierung explizit voneinander getrennt werden können.

In Abbildung 14 ist der zeitliche Verlauf der Aktivierung der 600 kDa-Form der NAD(P)(H)-GAPDH mit DTT_{red} , 1,3bisPGA, sowie DTT_{red} in Kombination mit 1,3bisPGA dargestellt.

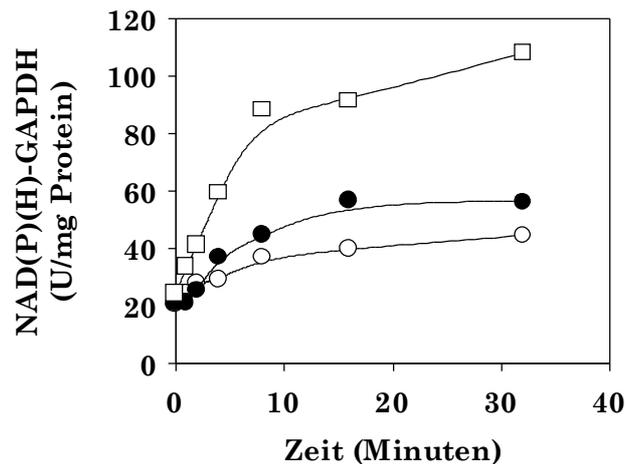


Abbildung 14: Zeitlicher Verlauf der Aktivierung der isolierten NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat mit DTT_{red} und 1,3bisPGA. Zum Zeitpunkt Null wurde das Enzym entweder mit (○) 20 mM DTT_{red} , (●) 19 μM 1,3bisPGA oder mit (□) 20 mM DTT_{red} und 19 μM 1,3bisPGA inkubiert. Es wurden jeweils 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein eingesetzt. Die Anfangsaktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH in den Proben wurden im Standard-Enzymtest zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Der Aktivitätstest wurde mit NADPH als Coenzym durchgeführt.

Ähnlich wie bei Versuchen mit isolierten intakten Chloroplasten im Dunkeln zeigt sich, dass DTT_{red} die NADPH-GAPDH-Grundaktivität etwa verdoppelt, wenn Metaboliteffekte ausgeschlossen wurden. Die Zugabe von 19 μM 1,3bisPGA alleine führte lediglich zu einer Verdreifachung der Grundaktivität. Die maximale Aktivität von ca. 100-120 U/mg Protein wurde nur durch Kombination beider Aktivatoren erzielt. Alle Versuche in der vorliegenden Arbeit wurden mit 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Protein durchgeführt. Es ist zu berücksichtigen, dass bei Aktivierungsversuchen *in vitro* die NAD(P)(H)-GAPDH-Konzentrationen eine sehr wichtige Rolle spielen. Bei sehr geringen Proteinkonzentrationen (ca. 0,8 oder 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$) aktiviert sich das Enzym z.B. durch Verdünnung selbst, während bei sehr hohen Proteinkonzentrationen (ca. 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$) eine Aktivierung nicht oder kaum möglich ist (RAK 1996, REICHERT et al. 2000). Neben DTT_{red} sind auch reduziertes Thioredoxin_f und GSH, ein Monothiol mit einem geringeren Redoxpotential, in der Lage, die NAD(P)(H)-GAPDH zu aktivieren. Während dieser Inkubation mit 10 oder 20 mM DTT_{red} , 10 mM DTT_{red} plus Thioredoxin_f oder 1 mM GSH (s. Abb. 15) sind nur geringe Aktivitätssteigerungen festzustellen. Durch Zugabe von jeweils 10 μM 1,3bisPGA (1,3bisPGA-Bildungsansatz) in Gegenwart von GSH zu den Inkubationsansätzen wird innerhalb von fünf bis 15 Minuten ein Aktivitätsmaximum von ca. 80 U/mg Protein erreicht. Mit DTT_{red} und DTT_{red} plus Thioredoxin_f lagen die Aktivitäten zwischen 90 und 100 U/mg Protein. Um den Einfluß von möglicherweise eingeschleppten Reduktionsmitteln, wie 2-Mercaptoethanol, auszuschließen, wurde das Enzym mit 5 mM GSSG inkubiert

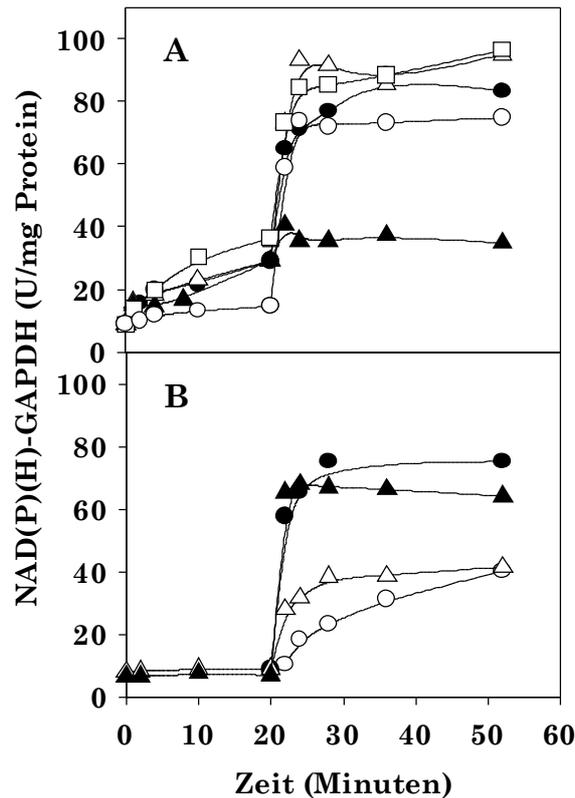


Abbildung 15: Zeitlicher Verlauf der Aktivierung der isolierten NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat. (A) Das Enzym wurde 20 Minuten mit (●,▲) 10 mM DTT_{red}, (△) 10 mM DTT_{red} und Thioredoxin_f, (○) 1 mM GSH oder (□) 20 mM DT_{red} inkubiert. Anschließend wurden (●,△,○,□) 10 µM 1,3bisPGA zugegeben. Als Kontrolle wurde (▲) der 1,3bisPGA-Bildungsansatz ohne PGK zu dem Inkubationsmedium gegeben. (B) Zu (○,●) dem unbehandelten Enzym und (△,▲) nach Vorbehandlung mit 5 mM GSSG (oxidiertes Glutathion) wurden entweder (△,○) 10 oder (▲,●) 50 µM 1,3bisPGA zugegeben. Die Anfangsaktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH in den Proben wurden im Standard-Enzymtest zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Der Aktivitätstest wurde mit NADPH als Coenzym durchgeführt.

(s. Abb. 15B). Nach einer Inkubationszeit von 20 Minuten wurde der NAD(P)(H)-GAPDH entweder 10 µM oder 50 µM 1,3bisPGA zugegeben und die Aktivitätssteigerung 32 Minuten lang verfolgt. Ohne Reduktionsmittel wurde mit 10 µM 1,3bisPGA lediglich eine Aktivitätssteigerung von ca. 40 U/mg Protein erzielt. Selbst nach Inkubation mit 50 µM 1,3bisPGA lag die maximal erzielte Aktivität mit 60-80 U/mg Protein deutlich niedriger als in den Versuchsansätzen mit Reduktionsmitteln (s. Abb. 15A).

Aus diesen Experimenten ergibt sich, dass NAD(P)(H)-GAPDH in vier verschiedenen Aktivitätszuständen vorliegen kann. Die Grundaktivität beträgt im oxidierten Zustand ca. 10 U/mg Protein, durch reduzierte Thiole wird die Aktivität etwa verdoppelt bis verdreifacht. Durch Inkubation mit 1,3bisPGA erreicht die NADPH-GAPDH eine spezifische Aktivität von maximal 60-80 U/mg Protein. Die höchste erzielte Aktivität (80-100 U/mg Protein) wird nur durch die kombinierte Inkubation mit Thiolen und 1,3bisPGA erzielt.

3.8. Katalytische Eigenschaften von NAD(P)(H)-GAPDH in den verschiedenen Aktivitäts-Zuständen

In weiteren Versuchen wurde eine biochemische Charakterisierung der vier verschiedenen NAD(P)(H)-GAPDH-Formen vorgenommen. Dabei wurden die K_m -Werte für die Substrate 1,3bisPGA (mit NADPH und NADH als Coenzyme) und GAP (mit NAD und NADP als Coenzyme), sowie für die Coenzyme NADPH und NADH ermittelt. Es wurde NAD(P)(H)-GAPDH verwendet, die folgendermaßen behandelt worden war.

- ohne Vorinkubation
- mit 1,3bisPGA inkubierte NAD(P)(H)-GAPDH
- mit DTT_{red} inkubierte NAD(P)(H)-GAPDH
- mit 1,3bisPGA und DTT_{red} inkubierte NAD(P)(H)-GAPDH

Tabelle 6: K_m - und V_{max} -Werte der isolierten NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat für die Substrate 1,3bisPGA und GAP.

Vorinkubation	Coenzym	K_m -Werte der Enzym-Formen (μM)		V_{max} -Werte der Enzym-Formen (U/mg Protein)	
		1,3bisPGA ^a	GAP ^b	V_{max} (1,3bisPGA) ^{a,c}	V_{max} (GAP) ^{b,d}
Ohne	NADP(H)	> 100	30,2 ± 10	n.b.	5 ± 0,7
	NAD(H)	35 ± 8	12,6 ± 1	42 ± 4	12 ± 0,9
21 μM 1,3bisPGA	NADP(H)	20 ± 10	27 ± 2	n.b.	15 ± 0,5
	NAD(H)	24 ± 5	19 ± 3	44 ± 3	12 ± 0,6
20 mM DTT _{red}	NADP(H)	90 ± 10	23 ± 4	>110	15 ± 0,91
	NAD(H)	27 ± 13	18 ± 1	57 ± 10	12 ± 0,3
21 μM 1,3bisPGA + 20 mM DTT _{red}	NADP(H)	20 ± 8	22 ± 6	>100	14 ± 1,4
	NAD(H)	16 ± 10	20 ± 3	52 ± 4	14 ± 0,6

a: mit 320 μM NADPH, bzw. NADH

b: mit 400 μM NADP, bzw. NAD

c: mit 55 μM 1,3bisPGA

d: mit 1 mM FbP

n.b.: nicht bestimmt

Die Affinitäten der NAD(P)(H)-GAPDH für das Substrat 1,3bisPGA steigen um das vier- bis fünffache an, wenn das Enzym mit 1,3bisPGA alleine oder in Kombination mit DTT_{red} vorinkubiert wurde (s. Tab. 6). Dieser Effekt wird jedoch nur dann erzielt, wenn NADPH als Coenzym verwendet wurde. Im Gegensatz dazu ändern sich die K_m -Werte der vier NAD(P)(H)-GAPDH-Formen kaum, wenn die K_m -Wert-Bestimmung für 1,3bisPGA mit NADH durchgeführt wurde. Für das Substrat GAP sind die K_m -Werte unabhängig von den Vorinkubationen. Die Affinitäten der NAD(P)(H)-GAPDH für GAP sind mit NADP gegenüber NAD leicht erhöht, aber es zeigen sich keine so deutlichen Unterschiede wie für das Substrat 1,3bisPGA.

Die V_{max} -Bestimmung der NAD(P)(H)-GAPDH in der reduzierenden Richtung mit NADPH als Coenzym (V_{max} (1,3bisPGA)) gestaltete sich schwierig, da die Kinetik nicht der Michaelis-Menten-Kinetik gehorchte. Ein Grund dafür ist, dass die ansteigenden Konzentrationen von 1,3bisPGA in den Küvetten zunehmend zu einer Aktivierung des Enzyms während der Messungen führt. Daher sind die realen V_{max} -Werte zum Teil nicht bestimmbar. Es konnten jedoch für die Enzymformen, die durch Vorinkubation mit 20 mM DTT_{red} und 20 mM DTT_{red} plus 21 μM 1,3bisPGA erhalten wurden, V_{max} -Werte von über 100 U/mg Protein bestimmt werden. Es wird angenommen, dass auch die V_{max} -Werte der unbehandelten, und der mit 1,3bisPGA vorinkubierten NAD(P)(H)-GAPDH in dieser Größenordnung liegen, denn steigende 1,3bisPGA-Konzentrationen in der Küvette oder in der Vorinkubation führen in jedem Fall zu einem Anstieg der NADPH-abhängigen GAPDH-Aktivität (s. Abb. 15A,B). Wird die V_{max} -Bestimmung mit NADH durchgeführt, so bleiben die V_{max} -Werte hingegen unter den

verschiedenen Bedingungen der Vorinkubation relativ konstant und, im Gegensatz zu den Messungen mit NADPH, bei Werten von 42-57 U/mg Protein. Im Vergleich dazu zeigen auch die V_{max} -Werte, die für GAP mit den vier verschiedenen Enzymformen und mit NAD und NADP in der anderen Richtung bestimmt wurden, generell keine nennenswerten Unterschiede. Sie liegen zwischen fünf und 15 U/mg Protein und sind damit wesentlich niedriger als die V_{max} -Werte, die mit 1,3bisPGA, NADPH und NADH bestimmt wurden. Zusammenfassend läßt sich sagen, dass große Unterschiede in der K_m -Wert-Bestimmung nur dann auftreten, wenn einerseits mit 1,3bisPGA vorinkubiert, und die Bestimmung für 1,3bisPGA mit NADPH durchgeführt wurde. Weitere Unterschiede sind in der V_{max} -Wert-Bestimmung festzustellen, wenn sie für 1,3bisPGA durchgeführt wurden und entweder mit NADPH oder NADH gemessen wurden.

Tabelle 7: K_m -Werte der isolierten NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat für die Coenzyme NADPH und NADH.

Vorinkubation	K_m -Werte der Enzym-Formen (μM)	
	NADPH ^a	NADH ^a
Ohne	30 ± 10	120 ± 10
21 μM 1,3bisPGA	50 ± 8	106 ± 29
20 mM DTT _{red}	40 ± 10	210 ± 20
21 μM 1,3bisPGA + 20 mM DTT _{red}	60 ± 9	290 ± 20

a: mit 55 μM 1,3bisPGA

In der Tabelle 7 sind die K_m -Werte für die beiden Coenzyme der NAD(P)(H)-GAPDH, NADPH und NADH aufgeführt. Für NADPH variieren die K_m -Werte zwischen 30 und 60 μM für die vier verschiedenen Enzymformen. Die K_m -Werte für NADH sind für die unbehandelte und mit 1,3bisPGA inkubierte NAD(P)(H)-GAPDH mit 106-120 μM relativ konstant. Wird die NADH-GAPDH mit DTT_{red} alleine oder zusätzlich mit 1,3bisPGA inkubiert, so steigen die K_m -Werte auf 210-290 μM an. Im Vergleich jedoch scheinen jeweils die Unterschiede der Affinitäten für die vier verschiedenen Enzymformen nicht von Bedeutung zu sein. Der bedeutsamste Unterschied besteht in der wesentlich höheren Affinität der NAD(P)(H)-GAPDH für das Coenzym NADPH.

3.9. Einfluß von NAD auf die Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH

Ein weiterer Metabolit, der *in vivo* im Dunkeln sowie im Licht in Konzentrationen von ca. 0,14 mM vorliegt, ist NAD. Dieses Coenzym der NAD(P)(H)-GAPDH wird als Metabolit beschrieben, welches die Aggregation in die hexadecamere Form der NAD(P)(H)-GAPDH unterstützt (PUPILLO & GIULIANI PICCARI 1975). Daher wurde zunächst untersucht, ob NAD die Aktivierung der NADPH-abhängigen Aktivität der NAD(P)(H)-GAPDH durch 1,3bisPGA und DTT_{red} negativ beeinflusst. Darüberhinaus wurden die Aktivierungen der NAD(P)(H)-GAPDH durch ATP, NADPH und NADP, die ebenfalls als Aktivatoren beschrieben wurden, ebenfalls in Kombination mit NAD gemessen.

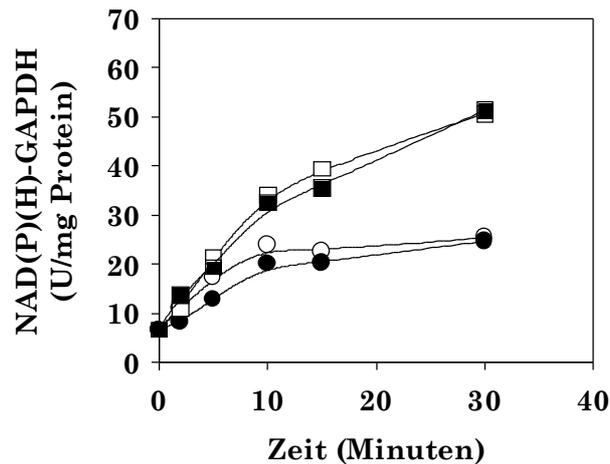


Abbildung 16: Zeitlicher Verlauf der Aktivierung der isolierten NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat. Zum Zeitpunkt Null wurde das Enzym entweder mit (○) 2 µM 1,3bisPGA, (●) 2 µM 1,3bisPGA und 0,14 mM NAD, (□) 2 µM 1,3bisPGA und 20 mM DTT_{red}, oder mit (■) 2 µM 1,3bisPGA und 20 mM DTT_{red} und 0,14 mM NAD inkubiert. Die Anfangsaktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH in den Proben wurden im Standard-Enzymtest zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Der Aktivitätstest wurde mit NADPH als Coenzym durchgeführt.

Wie schon in den Abbildungen 14 und 15 aufgeführt wurde, wird die maximale NADPH-abhängige Aktivität der NAD(P)(H)-GAPDH durch die kombinierte Inkubation von 1,3bisPGA und DTT_{red} im Vergleich zur Inkubation von jeweils 1,3bisPGA oder DTT_{red} alleine gesteigert. Aus Abbildung 16 ist ersichtlich, dass die gleichzeitige Inkubation von 0,14 mM NAD die Aktivitätssteigerungen durch entweder 2 µM 1,3bisPGA oder 20 mM DTT_{red} jedoch nicht beeinflussen.

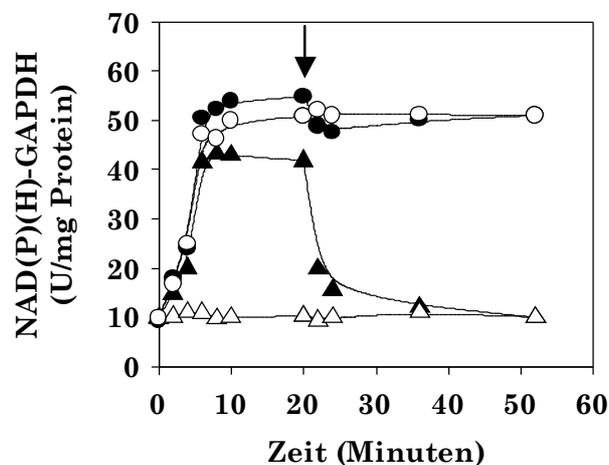


Abbildung 17: Zeitlicher Verlauf der Aktivierung der isolierten NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat. Das Enzym wurde in Anwesenheit von (△,▲) 2 mM ATP oder (○,●) 21 µM 1,3bisPGA inkubiert. NAD (0,14 mM) war in den Versuchsansätzen von Beginn der Inkubation an vorhanden (offene Symbole) oder wurde nach 20 Minuten der Inkubation zugegeben, wie durch den Pfeil angegeben (geschlossene Symbole). Die Anfangsaktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH in den Proben wurden im Standard-Enzymtest zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Der Aktivitätstest wurde mit NADPH als Coenzym durchgeführt.

Weiterhin wurde untersucht, ob NAD die beschriebene Aktivierung der NADPH-abhängigen Aktivität der NAD(P)(H)-GAPDH durch ATP beeinflusst. Dazu wurde das Enzym von Beginn an in Anwesenheit von NAD zunächst mit ATP oder 1,3bisPGA inkubiert und der zeitliche Verlauf der Aktivierung gemessen, oder es wurden die zeitlichen Verläufe der Aktivierungen

mit ATP oder 1,3bisPGA der NADPH-GAPDH gemessen und nach 20 Minuten NAD zugesetzt.

In Abbildung 17 ist dargestellt, dass durch Inkubation mit 2 mM ATP bei Anwesenheit von 0,14 mM NAD zu Beginn der Messung kein Anstieg der NADPH-abhängigen Aktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH stattfindet. Jedoch steigt die Aktivität unter gleichen Bedingungen mit 21 μ M 1,3bisPGA auf ca. 50 U/mg Protein an. Die Zugabe von NAD nach 20 Minuten zu identischen Inkubationsansätzen ohne NAD führt zu einer schnellen Aktivitätsabnahme, wenn das Enzym zuvor mit ATP inkubiert und dadurch aktiviert wurde, während die Aktivität nach Inkubation mit 1,3bisPGA konstant hoch bleibt.

Um zu klären, ob NAD die Aktivierung der NADPH-abhängigen Aktivität der NAD(P)(H)-GAPDH durch NADP und NADPH ebenfalls beeinflusst, bzw. unterbindet, wie es der Fall bei ATP ist, wurden die K_a -Werte für die drei Metabolite im Vergleich mit 1,3bisPGA bestimmt. Der K_a -Wert eines Enzyms gibt Aufschluß darüber, in welcher Konzentration es halbmaximal durch den jeweiligen Effektor aktiviert wird. Da bekannt ist, dass DTT_{red} die Aktivierung außer mit 1,3bisPGA auch mit ATP, NADPH und NADP erleichtert, wurden die Aktivitätskonstanten ebenfalls für das mit DTT_{red} reduzierte Enzym bestimmt. Es wurde NAD(P)(H)-GAPDH verwendet, die folgendermaßen behandelt worden war.

- ohne Vorinkubation
- mit NAD inkubierte NAD(P)(H)-GAPDH
- mit DTT_{red} inkubierte NAD(P)(H)-GAPDH
- mit NAD und DTT_{red} inkubierte NAD(P)(H)-GAPDH

Tabelle 8: K_a -Werte der isolierten NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat für die Coenzyme NADP und NADPH, sowie für 1,3bisPGA und ATP.

Vorinkubation	K_a -Werte der Enzymformen			
	1,3bisPGA (μ M)	ATP (mM)	NADP (mM)	NADPH (mM)
Ohne	19,5 \pm 4,1	1-2	0,185 \pm 0,037	0,55 \pm 0,05
NAD (0,14 mM)	16,0 \pm 7,1	n.a.	n.a.	n.a.
DTT_{red} (20 mM)	2,0 \pm 1,4	1-2	0,05 \pm 0,019	0,30 \pm 0,029
DTT_{red} (20 mM) + NAD (0,14 mM)	1,0 \pm 1,9	n.a.	n.a.	n.a.

n.a.: nicht aktiviert

In Tabelle 8 ist aufgeführt, dass der K_a -Wert der unbehandelten NAD(P)(H)-GAPDH für 1,3bisPGA vergleichbar hoch ist wie für das mit NAD vorinkubierte Enzym (16-19,5 μ M). Der K_a -Wert von 19,5 μ M ist der errechneten Aktivierungskonstante in isolierten intakten Chloroplasten (oxidiert vorliegende NAD(P)(H)-GAPDH) für 1,3bisPGA mit 11-17 μ M erstaunlich übereinstimmend. Durch Reduktion mittels DTT_{red} allein und in Kombination mit NAD sinkt der K_a -Wert jedoch auf 1-2 μ M ab. Im Gegensatz dazu ändert sich der K_a -Wert der unbehandelten NAD(P)(H)-GAPDH für ATP durch Inkubation mit DTT_{red} nicht (1-2 mM), und durch Inkubation des Enzyms mit NAD alleine, sowie in Kombination mit

DTT_{red} findet keine Aktivierung statt. Die K_a -Werte für NADP und NADPH sinken anders als für ATP durch Reduktion der NAD(P)(H)-GAPDH. Jedoch wird bei der K_a -Wert-Bestimmung für NADP und NADPH die NAD(P)(H)-GAPDH bei Inkubation mit NAD alleine, sowie in Kombination mit DTT_{red} wiederum, wie schon für ATP gezeigt, nicht aktiviert.

3.10. Untersuchungen zum Aggregations-Status der verschiedenen Formen der NAD(P)(H)-GAPDH

In weiteren Versuchen wurde, wie schon in Versuchen mit NAD(P)(H)-GAPDH aus isolierten intakten Spinat-Chloroplasten, untersucht, ob Korrelationen zwischen den Aktivitäten und den Molekulargewichten der vier verschiedenen NAD(P)(H)-GAPDH-Formen *in vitro* bestehen. Dazu wurden wiederum Gelfiltrationen an der Superdex-200 durchgeführt. Zunächst wurden die Molekulargewichte der unbehandelten und der mit DTT_{red} und Thio-redoxin_f vorbehandelten NAD(P)(H)-GAPDH bestimmt.

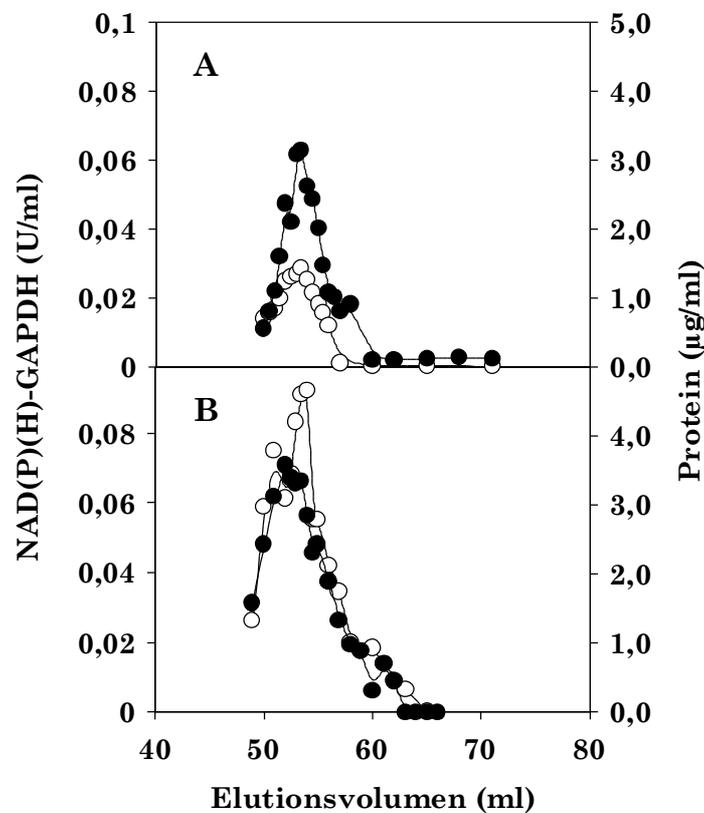


Abbildung 18: Aggregationszustände der isolierten chloroplastidären NAD(P)(H)-GAPDH. (○) Die Anfangsaktivität der NAD(P)(H)-GAPDH im Standard-Aktivitätstest mit NADPH als Coenzym und (●) der Protein-Gehalt wurden in den Fraktionen bestimmt. (A) Die Fraktionen wurden ohne Vorinkubation und ohne Zusätze im Puffer gemessen. (B) Die Fraktionen wurden nach 20minütiger Vorinkubation mit 10 mM DTT_{red} und Thioredoxin_f vor Beginn des Säulenlaufs und Zusatz von 10 mM DTT_{red} im Puffer gemessen. Das Elutionsvolumen von 54 ml entspricht dem Molekulargewicht von 600 kDa.

Aus Abbildung 18A ist ersichtlich, dass die unbehandelte NAD(P)(H)-GAPDH ausschließlich in der hexadecameren Form eluiert. Das mit 10 mM DTT_{red} und Thioredoxin_f vorbehandelte Enzym eluiert ebenfalls ausschließlich in der 600 kDa-Form (s. Abb. 18B). Die spezifische Aktivität in den Fraktionen wird jedoch etwa verdoppelt.

Weitere Versuche wurden durchgeführt, in denen die NAD(P)(H)-GAPDH mit 1,3bisPGA alleine oder in Kombination mit DTT_{red} vorinkubiert, und anschließend die Molekularge

wichte der Enzym-Formen mittels Gelfiltration an der Superdex-200 bestimmt wurden. Zunächst wurde in einem hier nicht gezeigten Versuch das Molekulargewicht der NAD(P)(H)-GAPDH bestimmt, welches mit $2\ \mu\text{M}$ 1,3bisPGA vorinkubiert worden war. Diese Konzentration entspricht dem K_a -Wert des reduzierten Enzyms für 1,3bisPGA. Die NAD(P)(H)-GAPDH verbleibt unter diesen Bedingungen zum größten Teil in der 600 kDa-Form und nur ein kleiner Anteil erscheint als Tetramer.

In einem weiteren Versuch wurde die NAD(P)(H)-GAPDH zusätzlich zu $2\ \mu\text{M}$ 1,3bisPGA mit $10\ \text{mM DTT}_{\text{red}}$ vorinkubiert und das Molekulargewicht bestimmt (s. Abb. 19).

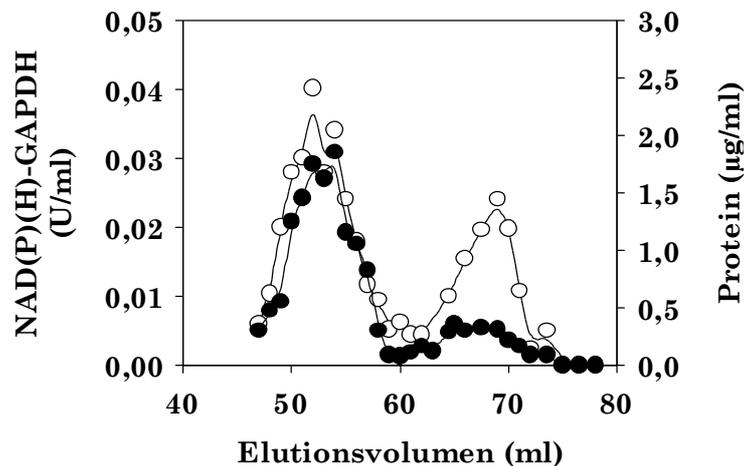


Abbildung 19: Aggregationszustand der isolierten chloroplastidären NAD(P)(H)-GAPDH. (○) Die Anfangsaktivität der NAD(P)(H)-GAPDH im Standard-Aktivitätstest mit NADPH als Coenzym und (●) der Protein-Gehalt wurden in den Fraktionen bestimmt. Die Fraktionen wurden nach 20minütiger Vorinkubation mit $2\ \mu\text{M}$ 1,3bisPGA und $20\ \text{mM DTT}_{\text{red}}$ vor Beginn des Säulenlaufs und ohne Zusätze im Puffer gemessen. Das Elutionsvolumen von $52,5\ \text{ml}$ entspricht dem Molekulargewicht von $600\ \text{kDa}$; von $69\ \text{ml}$ dem von $150\ \text{kDa}$.

Der durchgeführte Versuch (s. Abb. 19) zeigt, dass unter angegebenen Vorinkubationen etwa $3/4$ des Proteins in der $600\ \text{kDa}$ -Form verbleiben. $1/4$ des Proteins eluiert in der $150\ \text{kDa}$ -Form. Im Gegensatz dazu besitzt die NAD(P)(H)-GAPDH in der $150\ \text{kDa}$ -Form jedoch ähnlich hohe Aktivitäten als in der $600\ \text{kDa}$ -Form.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, in welcher Molekulargewichtsform die NAD(P)(H)-GAPDH vorliegt, wenn sie mit 1,3bisPGA in Kombination mit DTT_{red} vorinkubiert wurde. Weiterhin wurde untersucht, ob die tetramere Form der NAD(P)(H)-GAPDH durch Zugabe von NAD wieder in die hexadecamere Form aggregieren kann.

Aus Abbildung 20A geht hervor, dass die NAD(P)(H)-GAPDH nach Vorinkubation mit $50\ \mu\text{M}$ 1,3bisPGA und $20\ \text{mM DTT}_{\text{red}}$ vollständig in die $150\ \text{kDa}$ -Form dissoziiert. Eine Reaggregation der dissoziierten NAD(P)(H)-GAPDH ist in Abbildung 20B dargestellt. Das Enzym wurde mit $50\ \mu\text{M}$ 1,3bisPGA und $20\ \text{mM DTT}_{\text{red}}$ 60 Minuten inkubiert und anschließend mittels einer NAP5-Säule entsalzt. Über Nacht wurde die NAD(P)(H)-GAPDH mit NAD ($0,14\ \text{mM}$) versetzt und am folgenden Tag auf die Superdex-200 aufgetragen.

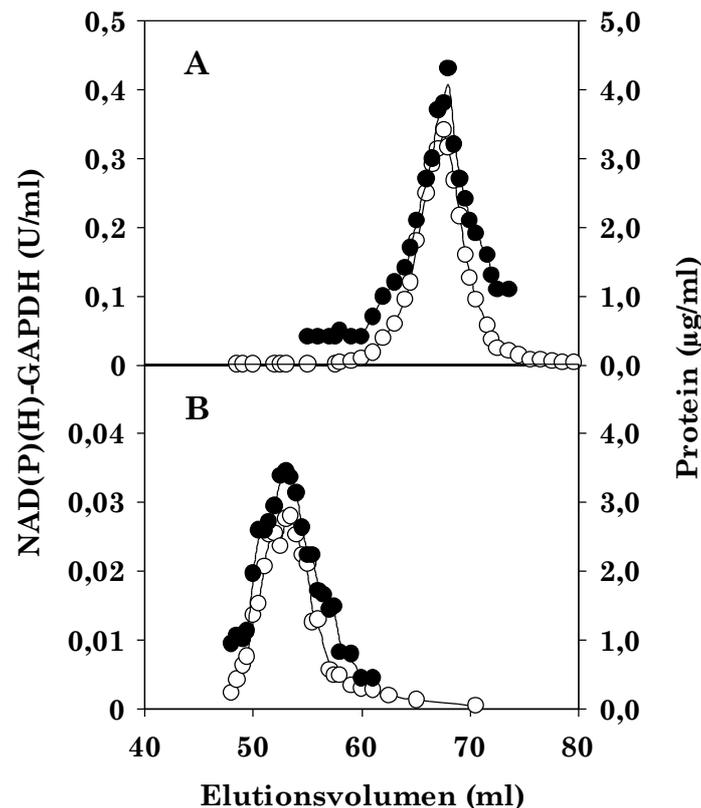


Abbildung 20: Aggregationszustände der isolierten chloroplastidären NAD(P)(H)-GAPDH. (○) Die Anfangsaktivität der NAD(P)(H)-GAPDH im Standard-Aktivitätstest mit NADPH als Coenzym und (●) der Protein-Gehalt wurden in den Fraktionen bestimmt. (A) Die Fraktionen wurden nach 60minütiger Vorinkubation mit 50 µM 1,3bisPGA und 20 mM DTT_{red} vor Beginn des Säulenlaufs und Zusatz von 50 µM 1,3bisPGA und 20 mM DTT_{red} im Puffer gemessen. (B) Das Enzym wurde in gleicher Weise mit 50 µM 1,3bisPGA und 20 mM DTT_{red} 60 Minuten lang vorinkubiert, entsalzt und anschließend über Nacht mit 0,14 mM NAD inkubiert. Für die Elution wurde der gleiche Puffer wie unter A verwendet; statt 1,3bisPGA und DTT_{red} wurden 0,14 mM NAD zugesetzt. Das Elutionsvolumen von 53 ml entspricht dem Molekulargewicht von 600 kDa; von 69 ml dem von 150 kDa.

Zusammenfassung der Kapitel 3.1. bis 3.9.

- Durchgeführte Ergebnisse mit NAD(P)(H)-GAPDH in isolierten intakten Spinat-Chloroplasten, sowie als gereinigtes Enzym, zeigen übereinstimmende Ergebnisse:
- *In vivo* erscheint die NAD(P)(H)-GAPDH hauptsächlich in der oxidierten inaktiven 600 kDa-Form oder nach Belichtung in der zusätzlich reduzierten aktiven 150 kDa-Form.
- *In vitro* wurden beide Molekulargewichtsformen mit den gleichen Eigenschaften gemessen.
- Die Redoxmodulation ist ein Zusammenspiel von Reduktion und Metaboliteneffekt: Durch zunächst stattfindende Reduktion wird der K_a -Wert für das Substrat 1,3bisPGA gesenkt, welches in Folge zu einer Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH mit gleichzeitiger Dissoziation führt.
- Erstmals konnte aufgrund durchgeführter K_a -Wert-Bestimmungen gezeigt werden, dass die bislang in der Literatur beschriebenen Effektoren NADP, NADPH und ATP *in vivo* als artifiziell anzusehen sind: d.h. in Anwesenheit der physiologisch sinnvoll eingesetzten NAD-Konzentration von 0,14 mM sind NADP, NADPH und ATP nicht in der Lage, die NAD(P)(H)-GAPDH zu aktivieren.
- Die Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH betrifft ausschließlich die NADPH-abhängigen Aktivitäten.

- Möglicherweise stellt die 300 kDa-Zwischenform einen Artefakt dar, der durch methodische Techniken mit der Superdex-200 hervorgerufen wurde. Oder sie ist eine Momentaufnahme während der Aggregation oder Dissoziation.
- Der prozentuale Anteil der aktiven tetrameren Form hängt von der Verfügbarkeit des Reduktanden (vermutlich Thioredoxin_f) und des Substrats 1,3bisPGA ab. Diese Parameter variieren wiederum z.B. durch Belichtungsdauer und Belichtungsstärke.
- Die Dissoziation der NAD(P)(H)-GAPDH ist durch Zugabe von NAD sowohl im intakten Chloroplasten als auch für das gereinigte Enzym revertierbar.

Die in den Kapiteln 3.4. bis 3.9. aufgeführten Ergebnisse sind in BAALMANN et al. (1995) publiziert.

3.11. Die Rolle der CTE von GapB bei der Aktivierung und Aggregation der NAD(P)(H)-GAPDH: Versuche mit proteolysierter NAD(P)(H)-GAPDH

In folgendem Kapitel wird untersucht, welche strukturellen Grundlagen für den Molekulargewichtswechsel der NAD(P)(H)-GAPDH ((A₂B₂)₄) verantwortlich sind. In dem von SCHEIBE et al. (2002) nachgewiesenen GAPDH/PRK/CP12-Komplex in Spinat, sowie in Grünalgen (WEDEL et al. 1997) wird die Aggregation bzw. Dissoziation durch CP12 vermittelt. Hinweise, wodurch der Molekulargewichtswechsel der NAD(P)(H)-GAPDH ((A₂B₂)₄-Form) ermöglicht wird, ergeben sich aus Arbeiten von ZAPPONI et al. (1993). Demnach ist die CTE für die Aggregation/Dissoziation des Enzyms verantwortlich. Eigene Ergebnisse unterstützen diesen Befund, denn die CTE zeigt hohe Homologien zu CP12, und gereinigte NAD(P)(H)-GAPDH in der 150 kDa-Form aggregiert durch Inkubation mit NAD selbständig in die 600 kDa-Form (s. Abb. 20). In folgenden Versuchen wurde mittels limitierter Proteolyse, durch die spezifisch Aminosäuren von GapA und GapB entfernt wurden, untersucht, welche Eigenschaften die NAD(P)(H)-GAPDH besitzt, die die CTE fehlt.

3.11.1. Limitierte Proteolyse führt zur Aktivitätssteigerung der NAD(P)(H)-GAPDH

Die *Staphylococcus aureus* V8-Endoproteinase spaltet spezifisch nach in der Aminosäuresequenz vorhandenen Glutaminsäuren. Limitierte Proteolyse findet in der NAD(P)(H)-GAPDH am C-Terminus statt, da dieser offenbar für die V8-Endoproteinase zugänglich ist. In GapA wird zwischen Glutamat 317 und Tryptophan 318 gespalten. Dadurch werden 20 C-terminale Aminosäuren entfernt. GapB wird zwei mal geschnitten: zwischen Glutamat 342 und Glycin 343, bzw. zwischen Glutamat 320 und Tryptophan 321. Dadurch werden insgesamt 48 Aminosäuren abgetrennt (ZAPPONI et al. 1993).

In Abbildung 21 ist zunächst der zeitliche Verlauf der Proteolyse mit intakter 600 kDa-NAD(P)(H)-GAPDH dargestellt. Aliquots wurden zu verschiedenen Zeitpunkten genommen und auf ein SDS-Gel aufgetragen, um die Kinetik der während der Proteolyse stattfindenden Änderungen der Molekulargewichte von GapA und GapB zu verfolgen. Es sollte geklärt werden, wie groß die beiden Untereinheiten GapA und GapB nach der Proteolyse sind, und zu welchem Zeitpunkt die Proteolyse abgeschlossen ist.

Aus Abbildung 21 ist ersichtlich, dass das Bandenmuster in den Kontrollexperimenten ohne die V8-Proteinase über vier Stunden gleich bleibt. GapA und GapB zeigen über den gesamten Zeitverlauf Molekulargewichte von 36 bzw. 39 kDa. Darüberhinaus konnten keine weiteren Proteine nachgewiesen werden. Während der vierstündigen Inkubation der NAD(P)(H)-GAPDH mit V8-Endoproteinase entwickelt sich im Gegensatz zu der Kontrolle ein neues

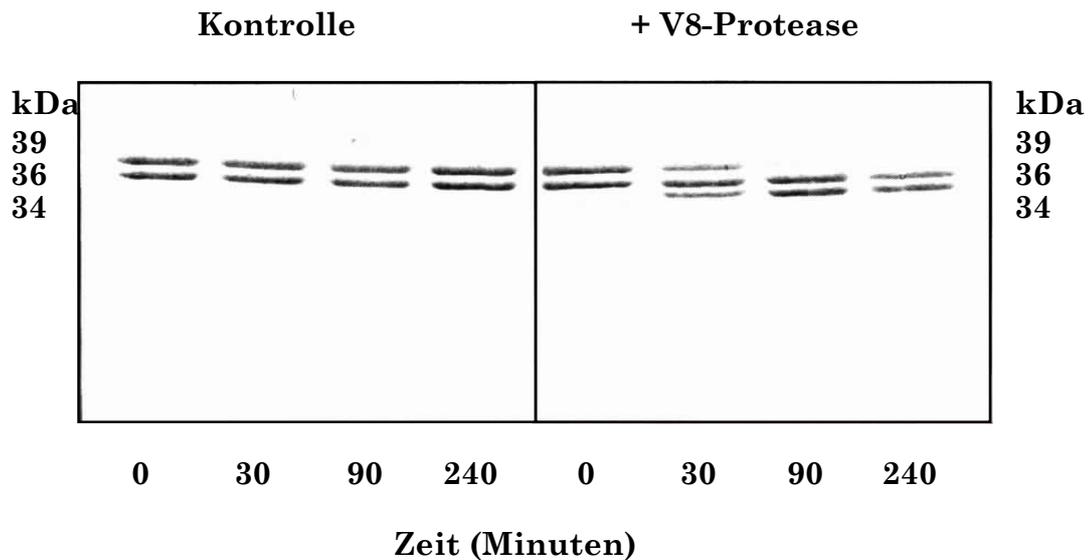


Abbildung 21: Zeitverlauf des Untereinheiten-Musters der NAD(P)(H)-GAPDH während der Inkubation mit V8-Proteinase. Als Kontrolle wurde die NAD(P)(H)-GAPDH unter identischen Bedingungen ohne Proteinase inkubiert (- V8). In Parallelansätzen wurde die NAD(P)(H)-GAPDH mit der Proteinase inkubiert (+ V8). Zu den angegebenen Zeiten wurde die Proteolyse durch Zugabe von 10% (w/w) α_2 -Makroglobulin gestoppt. Daraufhin wurden die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen. In den einzelnen Spuren wurden 8 μ g Protein aufgetragen.

Bandenmuster. Nach 30minütiger Proteolyse tritt zusätzlich eine schwächere Bande bei 34 kDa auf, während die 39 kDa-Bande schwächer wird. Die Ursache dafür ist, dass durch die Proteolyse im Zeitverlauf die 39 kDa-Bande in die 36 kDa-Bande und gleichzeitig die 36 kDa-Bande in die 34 kDa-Bande überführt wird. Nach 90 Minuten ist der Prozeß der Proteolyse der ursprünglich im gleichen Verhältnis vorliegenden Banden GapB (39 kDa) und GapA (36 kDa) in die neuen Banden mit 36 kDa (GapB) und 34 kDa (GapA) abgeschlossen. Nach 240 Minuten tritt keine weitere Veränderung auf.

Um zu überprüfen, wie die limitierte Proteolyse die Aktivität der NAD(P)(H)-GAPDH beeinflusst, wurden während des zeitlichen Verlaufs der Proteolyse von einer Stunde einzelne Proben im Standardaktivitäts-Test gemessen. Weiterhin wurde überprüft, ob sich die jeweiligen spezifischen Aktivitäten durch 10minütige Vorinkubation mit 1,3bisPGA und DTT_{red} (Vollaktivierung) ändern. Als Kontrolle wurden Versuche mit nicht proteolysierter oxidierter NAD(P)(H)-GAPDH durchgeführt.

Die intakte 600 kDa-Form der NAD(P)(H)-GAPDH zeigt ohne Zugabe der V8-Proteinase und ohne vorherige Vorinkubation mit der Effektor-Kombination 1,3bisPGA und DTT_{red} über den Zeitraum von 60 Minuten, wie erwartet, konstant eine Grundaktivität von 10-20 U/mg Protein (s. Abb. 22, 15). Nach Vorinkubation mit 21 μ M 1,3bisPGA und 20 mM DTT_{red} (ohne V8-Proteinase) ist die NAD(P)(H)-GAPDH von Beginn des Versuchs an maximal aktiv (80-100 U/mg Protein, s. Abb. 15). Im Gegensatz dazu verändern sich die spezifischen Aktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH während der Proteolyse auch ohne Vorinkubation. Durch Zugabe der V8-Proteinase während des Zeitverlaufs von 60 Minuten steigt die Aktivität der NAD(P)(H)-GAPDH kontinuierlich an und erreicht nach 60 Minuten ebenfalls die Maximalaktivität von 80 U/mg Protein. Die spezifischen Aktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH ändern sich während 60 Minuten hingegen nicht, wenn das proteolysierte Enzym zuvor mit

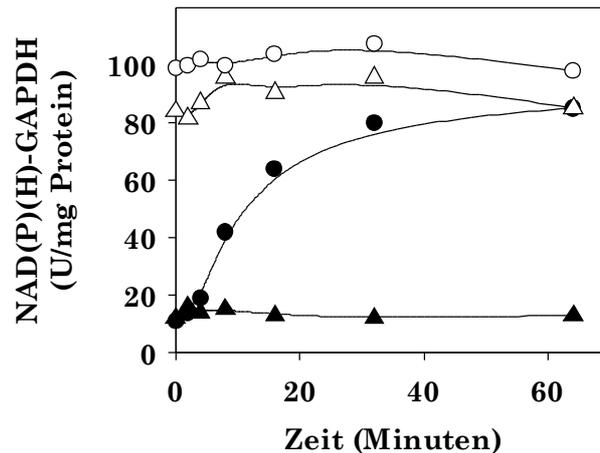


Abbildung 22: Zeitlicher Verlauf der Aktivierung der isolierten NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat während der Proteolyse mit V8-Proteinase. Die Proteolyse wurde zu den angegebenen Zeiten durch Zugabe von Γ_2 -Makroglobulin gestoppt. Zu den verschiedenen Zeiten wurde die Aktivität (●) direkt mit den jeweiligen Proben oder (○) nach Vollaktivierung durch 21 μ M 1,3bisPGA und 10 mM DTT_{red} bestimmt. In einem parallelen Ansatz wurde die Aktivität der oxidierten 600 kDa-NAD(P)(H)-GAPDH ohne Anwesenheit der Proteinase zu den verschiedenen Zeiten (▲) direkt oder (△) nach der Vollaktivierung bestimmt. Die Anfangsaktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH in den Proben wurden im Standard-Enzymtest zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Der Aktivitätstest wurde mit NADPH als Coenzym durchgeführt.

der Effektor-Kombination vorinkubiert wurde. Es verhält sich wie das intakte vorinkubierte Enzym, d.h. von Beginn des Versuchs liegen die spezifischen Aktivitäten maximal bei ca. 100 U/mg Protein. Die in Abbildung 22 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass durch das fortschreitende Entfernen von C-terminalen Aminosäuren von GapA und GapB während der Proteolyse ein Enzym produziert wird, welches sich in Bezug auf die spezifische Aktivität wie das intakte aktive 150 kDa-Tetramer verhält.

3.11.2. Aggregationszustände und Größe der Untereinheiten der NAD(P)(H)-GAPDH während der Proteolyse

Durch die Proteolyse steigt die NADPH-abhängige Aktivität der NAD(P)(H)-GAPDH bis zur maximalen Aktivität an. Um zu überprüfen, ob die in dieser Arbeit durch Proteolyse hergestellte NAD(P)(H)-GAPDH ebenfalls, wie von ZAPPONI et al. (1993) beschrieben, in die tetramere Form, die kleiner ist als die 150 kDa-Form, dissoziiert, wurden Gelfiltrationen mit intakter und proteolysierter NAD(P)(H)-GAPDH durchgeführt. Mit einzelnen während der Gelfiltrationen erhaltenen Fraktionen wurden SDS-Gele durchgeführt, um die Größen der Untereinheiten der proteolysierten NAD(P)(H)-GAPDH im Vergleich zum intakten Enzym zu bestimmen (s. Abb. 21).

In Abbildung 23A sind die Aggregationszustände der intakten 600- und durch Inkubation mit 21 μ M 1,3bisPGA und 20 mM DTT_{red} erhaltenen 150 kDa-NAD(P)(H)-GAPDH aufgeführt. In Abbildung 23B ist das Molekulargewicht der proteolysierten NAD(P)(H)-GAPDH nach drei Stunden Inkubation mit V8-Proteinase dargestellt. Die proteolysierte NAD(P)(H)-GAPDH wurde in die tetramere Form überführt und zeigt ein Molekulargewicht von ca. 110 kDa. Darüberhinaus liegt ein geringer Anteil in der 300 kDa-Form vor. Nach 15minütiger Proteolyse liegt die NAD(P)(H)-GAPDH noch überwiegend in der 600 kDa-Form vor, während sich ein kleiner Teil in der 300 kDa-Form befindet. Ein quantitativ gleiches Verhältnis der 600 kDa-, 300 kDa- und 110 kDa-Formen tritt nach 50 Minuten Proteolyse auf (SCHEIBE et al. 1996). Drei Fraktionen der 600 kDa-Form der NAD(P)(H)-GAPDH

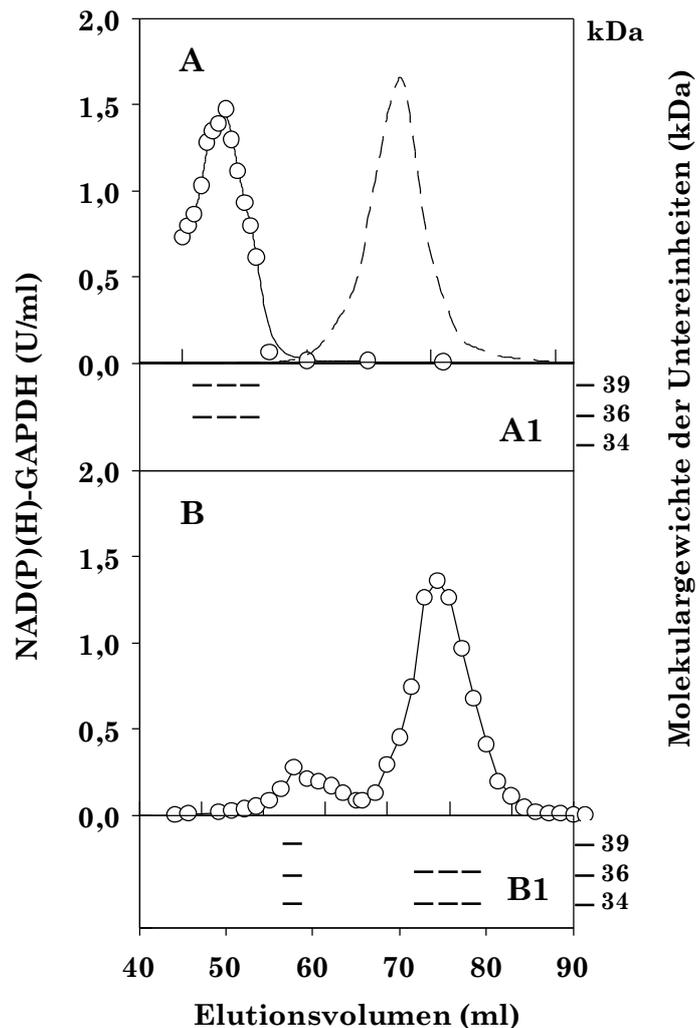


Abbildung 23: Molekulargewicht- und Untereinheiten-Struktur der intakten NAD(P)(H)-GAPDH (A) und der vollständig proteolysierten NAD(P)(H)-GAPDH (B). Die Proben wurden auf eine Konzentration von 0,5 mg Protein/ml eingestellt und auf eine Superdex-200 Säule aufgetragen. Die Fraktionen wurden mit 10 mM DTT_{red} und 21 μ M 1,3bisPGA inkubiert und die Anfangsaktivitäten gemessen (○). Zusätzlich wurden Fraktionen unter den Peaks auf ein SDS-Gel aufgetragen (A1, B1). In (A) ist die inaktive 600 kDa-Form der NAD(P)(H)-GAPDH (○) aufgeführt. Darüberhinaus zeigt die gestrichelte Linie das Elutionsprofil der zuvor mit 20 mM DTT_{red} und 21 μ M 1,3bisPGA aktivierten Form der NAD(P)(H)-GAPDH (150 kDa). In (B) ist die nach 180 Minuten proteolysierte Form der NAD(P)(H)-GAPDH dargestellt. Der Enzym-Test wurde mit NADPH als Coenzym durchgeführt. Das Elutionsvolumen von 51,5 ml entspricht dem Molekulargewicht von 600 kDa; von 70 ml dem von 150 kDa; von 75 ml dem von ca. 110 kDa.

(s. Abb. 23A) wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Untereinheiten sind jeweils 39 und 36 kDa groß (s. Abb. 23A1). In der 300 kDa-Form der proteolysierten NAD(P)(H)-GAPDH (s. Abb. 23B) tritt auf dem SDS-Gel zusätzlich eine 34 kDa-Bande auf (s. Abb. 23B1). Das vollständig proteolysierte Enzym besitzt dagegen in der 110 kDa-Form (s. Abb. 23B) ausschließlich das Untereinheitenmuster in den Größen 36 und 34 kDa (s. Abb. 23B1). Es handelt sich um die gleichen Untereinheiten-Größen, die mittels SDS-PAGE in Abbildung 21 bestimmt wurden.

3.11.3. Kinetische Eigenschaften der proteolysierten NAD(P)(H)-GAPDH

Mit der proteolysierten 110 kDa-NAD(P)(H)-GAPDH wurde eine biochemische Charakterisierung durchgeführt. Dazu wurden die K_m -Werte für das Substrat 1,3bisPGA und das Co

enzym NADPH, sowie die jeweiligen V_{max} -Werte bestimmt. Es wurde NAD(P)(H)-GAPDH verwendet, die folgendermaßen behandelt worden war:

- ohne Vorinkubation
- mit 21 μM 1,3bisPGA und 10 mM DTT_{red} inkubierte NAD(P)(H)-GAPDH
- mit V8-Endoproteinase inkubierte NAD(P)(H)-GAPDH

Tabelle 9: K_m - und V_{max} -Werte der isolierten und der proteolysierten NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat für das Substrat 1,3bisPGA und das Coenzym NADPH.

Enzym-Form	K_m -Werte der Enzymformen (μM)		V_{max} -Werte der Enzymformen (U/mg Protein)
	1,3bisPGA ^b	NADPH ^c	V_{max} (1,3bisPGA, NADPH) ^{b,c}
NAD(P)(H)-GAPDH, (oxidiert, 600 kDa)	80-100	34 \pm 10	> 48
NAD(P)(H)-GAPDH, (reduziert, 150 kDa)	19 \pm 9	34 \pm 7	138
V8-NAD(P)(H)- GAPDH ^a (110 kDa)	16 \pm 6	38 \pm 2	98

a: Die Proteolyse wurde eine Stunde lang durchgeführt. Anschließend wurde die Reaktion durch Zugabe von \square_2 -Makroglobulin (10%) gestoppt. Die Enzym-Präparation wurde direkt für die Messungen verwendet.

b: mit 320 μM NADPH

c: mit 55 μM 1,3bisPGA

Die Affinität der V8-NAD(P)(H)-GAPDH ist für 1,3bisPGA mit 16 μM im Gegensatz zu der oxidiert vorliegenden 600 kDa-Form um das etwa 5fache gestiegen und entspricht dem K_m -Wert der intakten reduzierten tetrameren NAD(P)(H)-GAPDH (s. Tab. 9). Die K_m -Werte der proteolysierten NAD(P)(H)-GAPDH für NADPH sind mit 38 μM denen der hexadecameren und tetrameren NAD(P)(H)-GAPDH (30-60 μM , s. Tab. 7) vergleichbar groß. Die maximale Aktivität der 600 kDa-NAD(P)(H)-GAPDH wurde hier mit mehr als 48 U/mg Protein bestimmt. Grundsätzlich gilt jedoch für diese Form, dass die Maximalaktivität der NAD(P)(H)-GAPDH nicht bestimmbar ist, da die steigenden 1,3bisPGA-Konzentrationen im Standard-Aktivitätstest dazu führen, dass die Michaelis-Menten-Kinetik nicht angewandt werden kann (s. Tab. 6). Die V_{max} -Werte der proteolysierten NAD(P)(H)-GAPDH entspricht mit 98 U/mg Protein den erhaltenen maximalen Aktivitäten der voll aktivierten tetrameren NAD(P)(H)-GAPDH (s. Abb. 24). Aus Tabelle 9 geht hervor, dass die kinetischen Eigenschaften der proteolysierten 110 kDa-Form mit den kinetischen Eigenschaften der intakten 150 kDa-Form der NAD(P)(H)-GAPDH weitgehend übereinstimmen.

3.11.4. Kann proteolysierte NAD(P)(H)-GAPDH reaggregieren?

Unter 3.6. wurden Versuche beschrieben, in denen die durch ATP und 1,3bisPGA dissoziierte aktivierte Form der NAD(P)(H)-GAPDH mit NAD inkubiert wurde. Es wurde untersucht, ob die tetramere Form durch die Zugabe von NAD fähig ist, zu reaggregieren, bzw. inaktiv zu werden. Wenn NAD anwesend ist, wird die durch ATP aktivierte NAD(P)(H)-GAPDH innerhalb von Minuten inaktiv, bzw. aggregiert. Die durch 1,3bisPGA dissoziierte

Form der NAD(P)(H)-GAPDH bleibt bei Zugabe von NAD jedoch aktiv. Diese Versuche wurden mit proteolysierter NAD(P)(H)-GAPDH wiederholt, um festzustellen, ob das Enzym durch Zugabe von NAD reaggregieren kann.

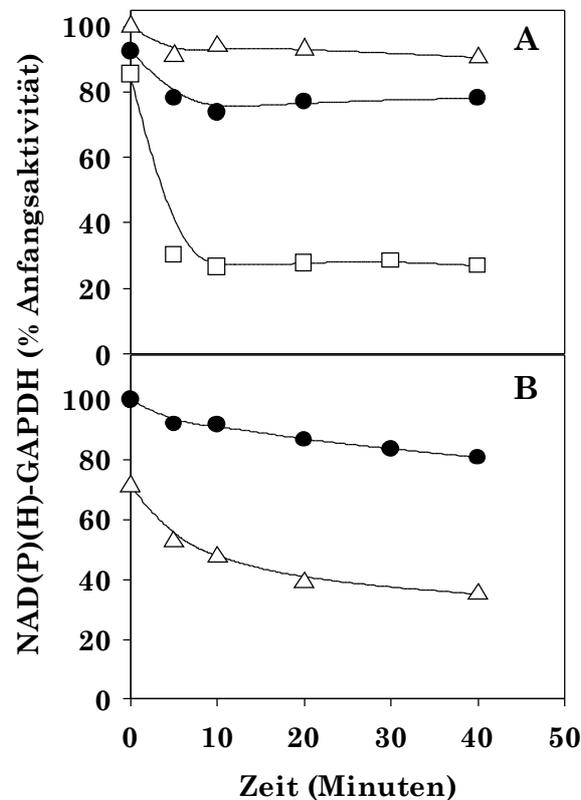


Abbildung 24: Effekt von NAD auf die Aktivität der intakten und der proteolysierten NAD(P)(H)-GAPDH. (A) NAD(P)(H)-GAPDH wurde (●) durch Proteolyse, (Δ) durch 1,3bisPGA, oder (□) durch Zugabe von 2 mM ATP aktiviert. Nach einer Stunde wurden die Proben auf 6 µg Protein/ml eingestellt und zum Zeitpunkt Null 0,14 mM NAD zugegeben, ohne dass die Proben zuvor entsalzt wurden. Die Aktivitäten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Zugabe von NAD gemessen. (B) Nach Aktivierung (●) durch Proteolyse während 60 Minuten oder (Δ) mit 1,3bisPGA wurden die Proben auf 12 µg Protein/ml eingestellt, entsalzt und in 50 mM Tris-HCl (pH 8,0) überführt. Anschließend wurde zum Zeitpunkt Null 0,14 mM NAD zugegeben und zu verschiedenen Zeitpunkten die Aktivitäten gemessen. In (A) und (B) wurden die Anfangsaktivitäten der Kontrollen, die mit 10 mM DTT_{red} und 21 µM 1,3bisPGA erhalten wurden, gleich 100% gesetzt. Die Anfangsaktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH in den Proben wurden im Standard-Enzymtest zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen.

Aus Abbildung 24A ist ersichtlich, dass die proteolysierte NAD(P)(H)-GAPDH und die durch 1,3bisPGA aktivierte NAD(P)(H)-GAPDH bei Zugabe von NAD aktiv bleiben, bzw. nicht aggregieren, während das durch ATP-aktivierte Enzym inaktiviert wird. In einem weiteren Versuch wurden die proteolysierte NAD(P)(H)-GAPDH und die durch 1,3bisPGA aktivierte NAD(P)(H)-GAPDH entsalzt und NAD zugegeben. In Abbildung 24B ist dargestellt, dass die proteolysierte NAD(P)(H)-GAPDH relativ konstant aktiv bleibt, während die aktivierte NAD(P)(H)-GAPDH inaktiv wird, bzw. aggregiert.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die proteolysierte NAD(P)(H)-GAPDH sich somit wie das reduzierte aktivierte tetramere Enzym verhält, außer dass es ein geringeres Molekulargewicht von 110 kDa besitzt, und die Fähigkeit verloren hat, zu reaggregieren. Weiterhin liegt ein erster Hinweis vor, dass die CTE die Aggregation vermittelt.

Die in Kapitel 3.11. aufgeführten Ergebnisse sind in SCHEIBE et al. (1996) publiziert.

3.12. Die Rolle der CTE von GapB bei der Aktivierung und Aggregation der NAD(P)(H)-GAPDH: Versuche mit rekombinant hergestellter NAD(P)(H)-GAPDH

Aus den Versuchen mit proteolysierter NAD(P)(H)-GAPDH, deren C-terminalen Enden der Untereinheit A und Untereinheit B spezifisch durch die *Staphylococcus aureus* V8-Endoproteinasen entfernt wurden, geht hervor, dass die CTE der Untereinheit B vermutlich für die Dissoziation und Aggregation der NAD(P)(H)-GAPDH verantwortlich ist. Durch die *Staphylococcus aureus* V8-Endoproteinasen werden jedoch nicht nur die 31 Aminosäuren der CTE, sondern insgesamt 48 Aminosäuren entfernt. Weiterhin werden 20 Aminosäuren von GapA abgespalten. Es ist daher nicht auszuschließen, ob weitere Strukturen für die Dissoziation und Aggregation der NAD(P)(H)-GAPDH verantwortlich sind. Eine Möglichkeit zur Klärung der Rolle der CTE bietet die Herstellung rekombinanter NAD(P)(H)-GAPDH. In folgenden Versuchen wurden GapA, GapB und GapB ohne CTE (GapB^{ΔC}) sowie GapAB und GapAB^{ΔC} unter der Kontrolle des Bakteriophagen T7 Promotors in *E. coli* kloniert, und die Molekulargewichte sowie kinetischen Eigenschaften der rekombinanten Proteine bestimmt. Die Details zu den Klonierungen sind in Material und Methoden (vgl. Kap. 2.8.) beschrieben.

3.12.1. Expression der GapA-, GapB- und GapB^{ΔC}-Untereinheiten in *E. coli*

Die GapA-, GapB- und GapB^{ΔC}-cDNA-Sequenzen für die chloroplastidäre NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat wurden jeweils in den bakteriellen Expressionsvektor pET-3a inseriert. Die drei klonierten Proteine werden im Folgenden mit GapA^M, GapB^M und GapB^{MΔC} benannt; das 'M' steht für das während der Klonierung eingefügte Methionin am Anfang der Sequenz. Die Klonierung wurde durchgeführt, um enzymatisch aktive rekombinante Proteine herzustellen. Es sollte überprüft werden, ob die beiden Proteine GapA und GapB^{ΔC} aggregieren können, bzw. ob GapB alleine aggregieren kann. Weiterhin sollten die rekombinant hergestellten Proteine kinetisch untersucht werden und mit den kinetischen Daten der isolierten NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat verglichen werden. Darüber hinaus erlaubt die

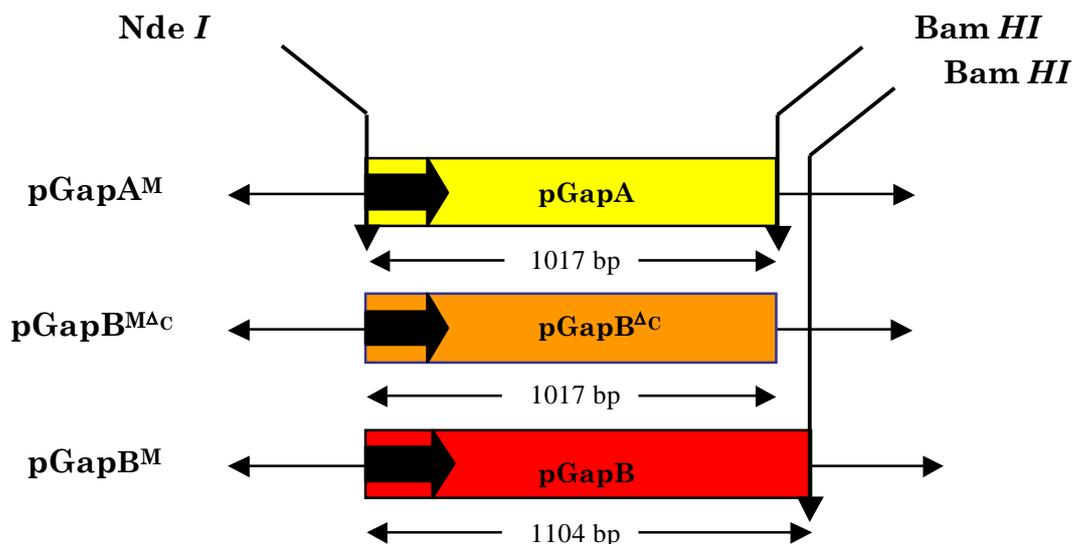


Abbildung 25: Klonierungsschema zur Konstruktion von pGapA^M, pGapB^M und pGapB^{MΔC} zur Überexpression der 'reifen' chloroplastidären GapA^M, GapB^M und GapB^{MΔC}. Die drei Plasmide wurden mit *Nde* I/ *Bam* HI geschnitten und in den ebenfalls mit *Nde* I/ *Bam* HI geschnittenen pET-3a-Vektor ligiert.

Herstellung der rekombinanten Proteine, die Nucleotidspezifität von GapA und GapB separat zu untersuchen. In den Abbildungen 26A und 26B sind die Sequenzen der pGapA- und pGapB-Konstrukte und die Proteine, die in *E. coli* exprimiert wurden, aufgeführt. Die abgeleiteten Aminosäuresequenzen von exprimierter GapA^M und GapB^M sind identisch mit den direkt bestimmten Sequenzen der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat (FERRI et al. 1990), außer dass das N-terminale Lysin durch ein Methionin ausgetauscht wurde. GapB^{MAC} exprimiert ein Derivat von GapB^M, welches die C-terminale Sequenzerweiterung fehlt.

A

GapA

tcaagactcaagactcaagactcaagactcaagagcATGGCTTCCAACATGCTCTCTATC	60
M A S N M L S I	
GCTAACC CGTCTCTCCGGGTTTACAACAAGGGATTTTCTGAATTTTCTGGTCTACACACC	120
A N P S L R V Y N K G F S E F S G L H T	
TCTTCCCTTCCCTTTGGTCGCAAGGGCTCTGATGACTTGATGGCTTTTGTGTCTTCCAA	180
S S L P F G R K G S D D L M A F V S F Q	
ACTAATGCTGTTGAAGGGAAGAGAAGTAGCCAGAATGGAGTAGTTGAGGCAAAAATTGAAG	240
T N A V G G K R S S Q N G V V E A K L K	
GTAGCAATCAATGGATTTCGGAAGAATTGGAAGGAATTTCTAAGGTGTTGGCATGGTAGG	300
V A I N G F G R I G R N F L R C W H G R	
AAGGACTCTCCCCTTGATGTTGTGGTGATCAACGACACTGGAGGTGTGAAACAAGCTTCC	360
K D S P L D V V V I N D T G G V K Q A S	
CACCTTCTAAAGTACGACTCCATCCTCGGAACATTTGATGCTGATGTTAAGACTGCTGGG	420
H L L K Y D S I L G T F D A D V K T A G	
GATAGTGCAATCTCTGTTGATGGCAAAGTCATCAAAGTTGTTTCTGACAGAAACCCTGTC	480
D S A I S V D G K V I K V V S D R N P V	
AACCTTCCTTGGGGGGACATGGGCATAGACTTGGTTATTGAAGGAACAGGTGTGTTTCGTA	540
N L P W G D M G I D L V I E G T G V F V	
GACAGAGATGGTGCAGGTAAGCACTTACAAGCAGGGGCTAAGAAAGTGTGATCACTGCC	600
D R D G A G K H L Q A G A K K V L I T A	
CCAGGAAAGGGTGACATACCAACCTATGTCGTTGGTGTCAACGAGGAAGTTACACCCAT	660
P G K G D I P T Y V V G V N E E G Y T H	
GCTGACACCATCATCAGTAACGCTTCTCTGACCCTAACTGCTTGGCTCCCTTTGTTAAG	720
A D T I I S N A S C T T N C L A P F V K	
GTTCTTGACCAGAAAATTTGGCATCATCAAGGGAACCATGACTACAACCCACTCCTACAGG	780
V I D Q K F G I T K G T M T T T H S Y T	
GGAGACCAAGACTCTTGGATGCAAGCCACAGGGATCTTAGACGTGCAAGAGCAGCATGT	840
G D Q R L L D A S H R D L R R A R A A C	
TTGAACATTGTCCTAACATCAACAGGTGCAGCTAAGGCTGTTGCATTAGTCCTTCTAAC	900
L N I V P T S T G A A K A V A L V L P N	
CTAAAGGGAAGCTTAACGGAATTGCTCTTCGTGTTCCAACACCAAATGTATCTGTGGTA	960
L K G K L N G I A L R V P T P N V S V V	
GACCTTGTGTCACAAGTCAGCAAGAAAACCTTCGCTGAAGAAGTTAATGCTGCCTTCAGA	1020
D L V V Q V S K K T F A E E V N A A F R	
GAGTCTGCAGACAATGAACTCAAAGGCATTCTCTCAGTCTGTGATGAGCCTCTTGTGTCC	1080
E S A D N E L K G I L S V C D E P L V S	
ATTGACTTCAGATGCACTGATGTTTCTCAACTATTGATTCTTCATTGACCATGGTTATG	1140
I D F R C T D V S S T I D S S L T M V M	
GGAGATGATATGGTCAAAGTTATTGCATGGTATGATAATGAGTGGGGTTACTCTCAAAGA	1200
G D D M V K V I A W Y D N E W G Y S Q R	
GTTGTTGATCTTGTGACATTGTTGCTAAACAAATGGCAGTAAattcatctatcatggttaa	1260
V V D L A D I V A N K W Q *	
tcaaaaccaaactcaactcttttcctcattcatcatacttagtagctacaattatcacca	1320
attttccatggtgctactacttaattgttttcatctttttgttaataagagataactttc	1380
caaatttgatagagca	1397

B

GapB

taaaagaaccaacaATGGCTTCTCATGCAGCTCTAGCTCCTTCTAGAATCCCTGCAAGTA	60
M A S H A A L A P S R I P A S T	
CAAGGCTCGCGTCTAAGGCCTCTCAGCAGTACTCTTTTCTTACTCAATGCTCCTTTAAGA	120
R L A S K A S Q Q Y S F L T Q C S F K R	
GACTCGACGTAGCTGACTTTTCTGGATTACGATCCAGCAACAGCGTGACATTCACAAGGG	180
L D V A D F S G L R S S N S V T F T R E	
AGGCTTCATTTTCATGATGTCATAGCTGCACAGCTAACCACCAAGCCTACAGGAGCAGCAC	240
A S F H D V I A A Q L T T K P T G A A P	
CTGTTAGGGGTGAAACAGTGGCCAACTTAAAGGTGGCAATCAATGGATTGGACGCATTG	300
V R G E T V A K L K V A I N G F G R I G	
GTAGGAATTTCCCTTAGATGCTGGCACGGCCGCAAAGACTCACCCCTTGATGTTGTTGTTG	360
R N F L R C W H G R K D S P L D V V V V	
TCAACGACAGTGGAGGTGTCAAGAGTGC AACACACTTGCTCAAGTATGACTCCATACTAG	420
N D S G G V K S A T H L L K Y D S I L G	
GAACCTTCAAAGCCGATGTGAAAATTATTGACAACGAGACCTTTTCCATCGATGGCAAGC	480
T F K A D V K I I D N E T F S I D G K P	
CTATCAAAGTTGTCTCTAACAGGGACCCCTCTTAAACTTCCTTGGGCTGAACTAGGCATTG	540
I K V V S N R D P L K L P W A E L G I D	
ATATTGTTATTGAGGGAACAGGAGTCTTTGTTGATGGCCCTGGAGCTGGAAAACACATTC	600
I V I E G T G V F V D G P G A G R H I Q	
AAGCTGGTGCCAAGAAAGTAATCATCACTGCTCCGGCAAAGGGTTCTGATATCCCGACCT	660
A G A K K V I I T A P A K G S D I P T Y	
ATGTTGTTGGGGTAAACGAGAAA GACTATGGTCACGATGTTGCAAACATCATAAGCAATG	720
V V G V N E K D Y G H D V A N I I S N A	
CTTCTTGCAACCACCAACTGTCTGGCTCCATTTGTGAAGGTCTTGGATGAAGAATTAGGAA	780
S C T T N C L A P F V K V L D E E L G I	
TTGTGAAGGGGACAATGACCACC ACTCACTCCTACACTGGTGACCAGAGGCTGTTGGATG	840
V K G T M T T T H S Y T G D Q R L L D A	
CTTCTCACAGGGACTTGAGAAGAGCCAGGGCTGCGGCATTGAACATAGTCCCAACCAGTA	900
S H R D L R R A R A A A L N I V P T S T	
CTGGTGCAGCCAAGGCTGTATCTCTAGTCTTACCCCAACTTAAAGGAAAGCTCAATGGAA	960
G A A K A V S L V L P Q L K G K L N G I	
TTGCCCTTCGTGTCCCAACACCTAACGTGTCTGTTGTTGATCTTGTGTTGTTGTTGTTGAGA	1020
A L R V P T P N V S V V D L V V N I E K	
AGGTAGGTGTACAGCTGAGGACGTAACAATGCCTTCAGGAAAGCAGCAGCAGGTCCAT	1080
V G V T A E D V N N A F R K A A A G P L	
TGAAGGGTGTGTTGGATGTGTGC GACATCCCCCTCGTGTCAAGTTGATTTTCAAGGTGTTCTG	1140
K G V L D V C D I P L V S V D F R C S D	
ATTTCTCATCTACAATCGATTCACTCACTATGGTAATGGGTGGTGATATGGTTAAGG	1200
F S S T I D S S L T M V M G G D M V K V	
TCGTTGCTTGGTACGACAATGAGTGGGGTTACAGCCAACGGGTGGTGGACTTGGCAGACT	1260
V A W Y D N E W G Y S Q R V V D L A D L	
TGGTAGCAAACAAGTGGCCGGGATTGGAGGGATCAGTTGCAAGCGGAGATCCATTGGAAG	1320
V A N K W P G L E G S V A S G D P L E D	
ATTTCTGCAAGGACAACCCTGCTGATGAGGAGTGCAAACTTTACGAGTAAaaaaagatgt	1380
F C K D N P A D E E C K L Y E *	
gatcaactttacacttctttttggttattctgtatttggcctattacaaggctgtacatt	1440
tgattttatagc atcagc ttctc atttta	1669

Abbildung 26: Sequenz der (A) GapA und (B) GapB-Untereinheiten aus Spinat und die in *E. coli* exprimierte Proteine. Die Bindestellen der Primer sind unterstrichen. Unterschiedliche Aminosäuren zu *in vivo* reifen Untereinheiten sind fett markiert. Nichtcodierende Regionen sind in Kleinbuchstaben angegeben. Transit-Peptid-Regionen sind kursiv und die *Precursor processing*-Stellen, wie sie vom isolierten Protein bekannt sind (FERRI et al. 1990), sind mit '<II>' gekennzeichnet. Stop Codone sind mit einem Stern und positiv und negativ geladene Aminosäuren in der CTE von GapB sind mit '+' und '-' versehen.

3.12.2. Reinigung von GapA^M, GapB^M und GapB^{MΔC} aus *E. coli*.

Die Reinigung der drei rekombinant hergestellten Formen der NAD(P)(H)-GAPDH erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben (vgl. Kap. 2.8.1.). Typischerweise wurden in den Reinigungen jeweils ca. 0,4-1 mg Protein erhalten. Im Vergleich zur isolierten NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat, die mehrere Wochen bei -20°C in Glycerin keine Aktivitätsverluste zeigte, waren die rekombinant hergestellten Proteine weniger stabil. Bereits ein bis zwei Wochen nach der Reinigung wurden abnehmende Aktivitäten beobachtet. Jedoch konnten während der Reinigung und im Zeitraum, in denen die Versuche durchgeführt wurden, keine Anzeichen von Proteolyse oder einem Verlust der Aktivitäten festgestellt werden.

3.12.3. Molekulargewichtsbestimmung der rekombinanten Homotetramere mittels SDS-PAGE

Die gereinigten Untereinheiten GapA^M, GapB^M und GapB^{MΔC} wurden im Vergleich mit intakter NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat auf ein SDS-Gel aufgetragen (s. Abb. 27).

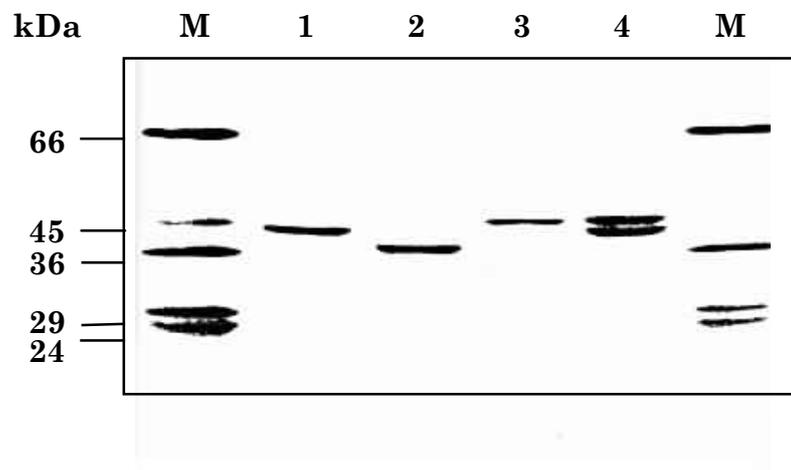


Abbildung 27: SDS-Gel der in *E. coli* exprimierten NAD(P)H-abhängigen Untereinheiten der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinatchloroplasten im Vergleich zum isolierten *in vivo*-Enzym. M, Molekulargewichtsstandard. Spuren 1) GapA^M, 2) GapB^{MΔC} und 3) GapB^M enthalten je 1 µg der gereinigten NAD(P)(H)-GAPDH aus den entsprechenden *E. coli*-Stämmen. In der Spur 4) wurden 2 µg der isolierten NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat zum Vergleich aufgetragen. Die Größen der Molekulargewichtsstandards (kDa) sind angegeben.

Aus Abbildung 27 ist zu ersehen, dass die Untereinheiten von GapA^M und GapB^M relative Molekulargewichte von 39 kDa bzw. 43 kDa besitzen, die mit denen der intakten NAD(P)(H)-GAPDH-Untereinheiten identisch sind. Im Vergleich dazu zeigt die GapB^{MΔC}-Untereinheit ein geringeres Molekulargewicht von ca. 36 kDa.

3.12.4. Molekulargewichtsbestimmung der rekombinanten Proteine mittels Gelfiltration an der Superdex-200

Um zu überprüfen, welche Molekulargewichte die nativen rekombinanten NAD(P)(H)-GAPDH-Formen besitzen, wurden Gelfiltrationen mit der Superdex-200 durchgeführt. In den einzelnen Fraktionen wurden die NADPH-abhängigen GAPDH-Aktivitäten und die Proteingehalte bestimmt.

In der Kontrolle (*E. coli*-BL21 ohne entsprechende Expressionsplasmide) konnte keine NADPH-abhängige GAPDH-Aktivität festgestellt werden. Die spezifische Aktivität von GapB^M mit 20-40 U/mg Protein ist vergleichbar hoch mit der spezifischen Aktivität der intakten oxidiert vorliegenden 600 kDa-NAD(P)(H)-GAPDH. GapA^M zeigte eine spezifische

Aktivität von 50-60 U/mg Protein, und die höchste spezifische Aktivität mit 110-120 U/mg Protein für GapB^{M^ΔC} ist mit der intakten aktiven 150 kDa-Form der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat vergleichbar (s. Tab. 10).

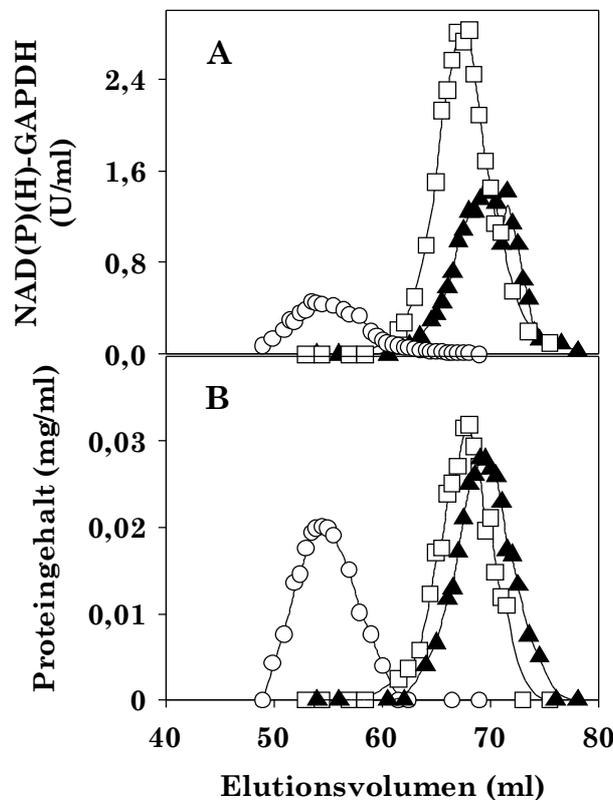


Abbildung 28: Aggregationszustände der drei isolierten in *E. coli* exprimierten chloroplastidären NAD(P)(H)-GAPDH-Isoenzyme. (A) Die Anfangsaktivität der drei rekombinanten NAD(P)(H)-GAPDH-Formen im Standard-Aktivitätstest mit NADPH als Coenzym und (B) der Protein-Gehalt wurde in den Fraktionen bestimmt. Die Fraktionen von (▲) GapA^M, (□) GapB^{M^ΔC} und (○) GapB^M wurden ohne Vorinkubation und ohne Zusätze im Puffer gemessen. Es wurden jeweils 200 µg Protein aufgetragen. Das Elutionsvolumen von 51,5 ml entspricht dem Molekulargewicht von 600 kDa; von 54,5 ml dem von 470 kDa; von 69 ml dem von 150 kDa.

Mit den drei rekombinanten Formen wurden jeweils Gelfiltrationen durchgeführt. In den einzelnen Fraktionen wurden die Aktivitäten ohne vorherige Vorinkubation gemessen (s. Abb. 28A). GapA^M, GapB^{M^ΔC} und GapB^M eluieren mit unterschiedlichen Molekulargewichten. Im Vergleich zur intakten isolierten 150 kDa-Form der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat (s. Abb. 19, 20, Elutionsvolumen: 69 ml) eluieren GapA^M und GapB^{M^ΔC} ebenfalls in der tetrameren Form. GapB^{M^ΔC} ist jedoch geringfügig größer, GapA^M geringfügig kleiner als die intakte tetramere NAD(P)(H)-GAPDH. Mit dem Elutionsvolumen von 54,5 ml erscheint GapB^M dagegen mit einem höheren Molekulargewicht von 470 kDa. Dieses Molekulargewicht ist bei der intakten NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat als Intermediat während der Proteolyse bekannt (SCHEIBE et al. 1996). Möglicherweise ist GapB^M nicht in der Lage, in die 600 kDa-Form zu aggregieren, weil sich die CTE's bei der Hexadecamer-Bildung gegenseitig sterisch hindern. So kann es sich bei der 470 kDa-Form um eine (GapB₄)₄-Form handeln, die ein 'ungewöhnliches Laufverhalten' zeigt oder ebenfalls um eine (GapB₄)₃-Form. Die 470 kDa-Form von GapB liefert jedoch einen weiteren Hinweis, dass eine Aggregation möglich ist, wenn die CTE anwesend ist. Die maximalen Aktivitäten der drei rekombinanten Formen variieren deutlich. In Abbildung 28B sind die entsprechenden Proteingehalte in den Fraktionen aufgeführt. Eine Verrechnung der in Abbildung 28A aufgeführten NADPH-ab

hängigen GAPDH-Aktivitäten mit den in Abbildung 28B aufgeführten Proteingehalten in den einzelnen Fraktionen ergibt, dass die rekombinanten Formen unterschiedliche spezifische Aktivitäten aufweisen (s. Tab. 10). Die spezifischen Aktivitäten entsprechen den Aktivitätsbestimmungen der isolierten rekombinanten Formen.

In einem weiteren Versuch sollte geklärt werden, ob GapB^M ebenfalls, wie die intakte 600 kDa-NAD(P)(H)-GAPDH, in die 150 kDa-Form dissoziieren kann.

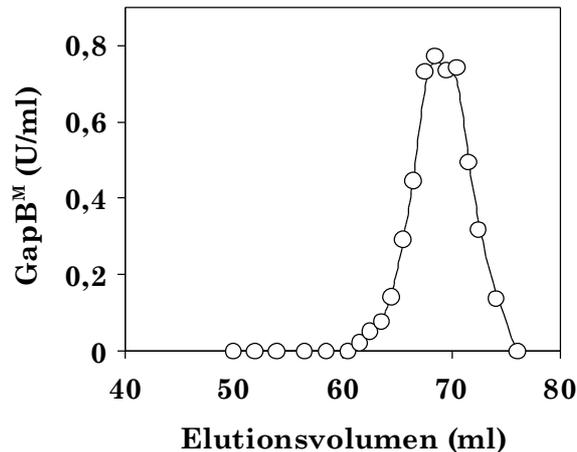


Abbildung 29: Aggregationszustand der isolierten in *E. coli* exprimierten chloroplastidären GapB^M. Die Anfangsaktivität der rekombinanten GapB^M im Standard-Aktivitätstest mit NADPH als Coenzym wurde in den Fraktionen bestimmt. GapB^M (470 kDa) wurde vor Beginn des Säulenlaufs durch Entsalzung von Puffer G in Puffer G ohne 2-Mercaptoethanol und NAD überführt. Die Fraktionen wurden ohne Vorinkubation und ohne Zusätze im Puffer gemessen. Es wurden ca. 60 µg Protein aufgetragen. Das Elutionsvolumen von 69 ml entspricht dem Molekulargewicht von 150 kDa.

In Abbildung 29 ist dargestellt, dass GapB^M ein Molekulargewicht von 150 kDa besitzt. Die Dissoziation von der 470 kDa- in die 150 kDa-Form wurde lediglich durch Entfernen von NAD und 2-Mercaptoethanol erreicht (vgl. Kap. 2.11.). Die Aggregation des GapB^M-Proteins ist somit reversibel. Der Versuch wurde nur ein mal durchgeführt und aufgrund des geringen Proteingehaltes von 60 µg bei Auftrag des Proteins konnte ausschließlich in der Spitzenfraktion der Proteingehalt bestimmt werden. Die daraus resultierende spezifische Aktivität von ca. 100 U/mg Protein entspricht den spezifischen Aktivitäten der intakten 150 kDa-NAD(P)(H)-GAPDH und von GapB^M^{Ac}.

GapB^M ist, was die Aktivierung und gleichzeitige Dissoziation in die 150 kDa-Form betrifft, ein Problemfall: Einerseits geht aus Abbildung 29 hervor, dass GapB^M relativ einfach durch Verdünnen in die 150 kDa-Form überführt werden kann. Andererseits zeigen durchgeführte V_{max} - und K_m -Wert-Bestimmungen für die Substrate und Coenzyme (s. Tab. 10, 11, 12, 13), dass die Inkubation von GapB^M mit 21 µM 1,3bisPGA, bzw. 21 µM 1,3bisPGA und 20 mM DTT_{red} nicht ausreicht, um das Enzym zu aktivieren. Möglicherweise werden zur Aktivierung der GapB^M höhere Konzentrationen des Effektors 1,3bisPGA benötigt. Es wurden K_a -Wert-Bestimmungen durchgeführt, die jedoch fehl schlugen. In nicht gezeigten Versuchen konnte nachgewiesen werden, dass zur Aktivierung von GapB^M höhere Konzentrationen des Effektors 1,3bisPGA benötigt werden, um GapB^M zu aktivieren. Die 'verklumpte – starre' Struktur von GapB^M wird erst durch Inkubation mit 55-105 µM 1,3bisPGA aufgehoben. Bei diesem K_a -Wert dissoziiert GapB^M in die 150 kDa-Form. Der K_a -Wert der hexadecameren NAD(P)(H)-GAPDH für 1,3bisPGA beträgt im Vergleich ca. 20 µM (s. Tab. 8).

Das auftretende Molekulargewicht von 470 kDa (s. Abb. 28), von 150 kDa (s. Abb. 29) und durchgeführte V_{max} - und K_m -Wert-Bestimmungen, geben jedoch einen Hinweis darauf, dass

die zusätzliche CTE von GapB das Aktivierungsverhalten massiv beeinflusst. Weiterhin wird die These, dass die CTE's eine korrekte Bildung der 600 kDa-Form durch sterische Hinderung unterbindet, unterstützt. Nach Ansicht der Autorin fehlen zur korrekten 600 kDa-Formierung die GapA-Untereinheiten, an denen die CTE's bei der Bildung der Hexadecamer-Form binden können. Daher erscheint GapB^M nicht als B₄-, sondern als B₃-Form.

3.12.5. Kinetische Eigenschaften der rekombinanten Formen

Im Vergleich mit der intakten NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat wurde mit den rekombinanten Proteinen GapA^M, GapB^{M^{AC}} und GapB^M eine biochemische Charakterisierung durchgeführt. Die K_m - und V_{max} -Bestimmungen der rekombinanten Proteine ermöglicht es, festzustellen, ob sich einerseits die beiden tetrameren Formen GapA^M und GapB^{M^{AC}}, andererseits die 470 kDa-Form der GapB^M, hinsichtlich ihrer Affinitäten für die Substrate und Coenzyme von der intakten 150 kDa-, bzw. der 600 kDa-NAD(P)(H)-GAPDH unterscheiden. Weiterhin kann unter den gewählten Bedingungen der Vorinkubation festgestellt werden, ob die tetrameren rekombinanten Formen durch DTT_{red} aktiviert werden können, bzw. ob sich intramolekular eine Disulfidbrücke bildet.

3.12.5.1. V_{max} - und K_m -Wert-Bestimmungen für das Substrat 1,3bisPGA und die Coenzyme NADPH und NADH

Zunächst wurden die V_{max} -Werte (s. Tab. 10) und die K_m -Werte der drei rekombinanten Proteine für das Substrat 1,3bisPGA (s. Tab. 11) und die Coenzyme NADPH und NADH (s. Tab. 12) bestimmt. Im Vergleich sind die V_{max} - und K_m -Werte der intakten 600 kDa-NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat aufgeführt (s. Tab. 6, 7).

Es wurden GapA^M, GapB^{M^{AC}} und GapB^M verwendet, die folgendermaßen behandelt worden waren.

- ohne Vorinkubation
- mit 20 mM DTT_{red} inkubierte NAD(P)(H)-GAPDH
- mit 21 µM 1,3bisPGA inkubierte NAD(P)(H)-GAPDH
- mit 20 mM DTT_{red} und 21 µM 1,3bisPGA inkubierte NAD(P)(H)-GAPDH

Aus Tabelle 10 geht hervor, dass alle drei rekombinanten Proteine nucleotidbispezifisch sind. Unter den gewählten Bedingungen bleiben die NADPH-abhängigen Maximalaktivitäten der drei rekombinanten Formen der GAPDH konstant. GapA^M besitzt eine spezifische Aktivität von ca. 50-60 U/mg Protein, GapB^{M^{AC}} von ca. 100-120 U/mg Protein und GapB^M von ca. 20-40 U/mg Protein. Ausschließlich GapB^{M^{AC}} erreicht mit über 100 U/mg Protein vergleichbare Aktivitäten wie die aktive 150 kDa-NADPH-GAPDH (s. Text zu Tab. 6). Die V_{max} -Werte der rekombinanten GAPDH-Formen entsprechen den im Standard-Aktivitätstest ermittelten spezifischen Aktivitäten und den unter 3.12.4. beschriebenen errechneten Werten der durchgeführten Gelfiltrationen (s. Abb. 28).

Bei den rekombinanten Enzymen ändern sich die NADH-abhängigen Aktivitäten unter den verschiedenen Bedingungen nicht (vgl. NAD(P)(H)-GAPDH, Tab. 6, 10). Jedoch sind die spezifischen Aktivitäten von GapA^M und GapB^{M^{AC}} etwa um die Hälfte geringer als die NADH-abhängigen Aktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH. GapB^M bildet mit den niedrigsten NADH-abhängigen Aktivitäten von ca. 10 U/mg Protein die Ausnahme.

GapB^M kann wie die 600 kDa-Form der NAD(P)(H)-GAPDH in eine hochmolekulare Form aggregieren. Daher wurde davon ausgegangen, dass sie durch Inkubation mit 1,3bisPGA alleine oder in Kombination mit DTT_{red} dissoziiert und ebenfalls wie die 600 Da-Form der NAD(P)(H)-GAPDH mit NADPH als Coenzym maximale Aktivitäten von >100 U/mg zeigt (s. Text zu Tab. 6). Dies ist unter den in Tabelle 10 gezeigten Bedingungen jedoch nicht der

Fall. Eine Erklärung bietet der hohe gemessene K_m -Wert von GapB^M mit 55-105 μM für 1,3bisPGA (s. Text zu Abb. 30).

Tabelle 10: V_{max} -Werte der isolierten NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat, GapA^M, GapB^{MΔC} und GapB^M für das Substrat 1,3bisPGA mit NADPH und NADH als Coenzym.

Vorinkubation	Coenzym	V_{max} -Werte der Enzymformen ^{a,b} (U/mg Protein)			
		A ₂ B ₂ NAD(P)(H)- GAPDH	GapA ^M	GapB ^{MΔC}	GapB ^M
Ohne	NADPH	n.b.	55 ± 5	105 ± 11	20 ± 3
	NADH	42 ± 4	23 ± 5	25 ± 2	7 ± 0,7
21 μM 1,3bisPGA	NADPH	n.b.	52 ± 9	97 ± 12	37 ± 11
	NADH	44 ± 3	24 ± 3	34 ± 3	7 ± 0,4
20 mM DTT _{red}	NADPH	>110	57 ± 4	101 ± 5	33 ± 3
	NADH	57 ± 10	22 ± 2	26 ± 2	10 ± 0,7
21 μM 1,3bisPGA + 20 mM DTT _{red}	NADPH	>100	49 ± 8	115 ± 11	30 ± 3
	NADH	52 ± 4	28 ± 8	29 ± 3	15 ± 2

a: mit 55 μM 1,3bisPGA

b: mit 320 μM NADPH, bzw. NADH

n.b.: nicht bestimmt

In Tabelle 11 sind unter den schon in Tabelle 10 gewählten Bedingungen der Vorinkubationen die K_m -Werte der drei rekombinant hergestellten NAD(P)(H)-GAPDH-Formen für 1,3bisPGA im Vergleich zu der intakten NAD(P)(H)-GAPDH aufgeführt.

Tabelle 11: K_m -Werte der isolierten NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat, GapA^M, GapB^M und GapB^M für das Substrat 1,3bisPGA mit NADPH und NADH als Coenzym.

Vorinkubation	Coenzym	K_m -Werte der Enzymformen ^a (μM)			
		A ₂ B ₂ NAD(P)(H)- GAPDH	GapA ^M	GapB ^{MΔC}	GapB ^M
Ohne	NADPH	>100	18 ± 9	32 ± 10	85 ± 26
	NADH	35 ± 8	11 ± 4	14 ± 2	26 ± 14
21 μM 1,3bisPGA	NADPH	20 ± 10	23 ± 5	29 ± 9	121 ± 90
	NADH	24 ± 5	12 ± 5	22 ± 5	22 ± 4
20 mM DTT _{red}	NADPH	90 ± 10	20 ± 4	24 ± 2	101 ± 45
	NADH	27 ± 13	18 ± 6	12 ± 2	19 ± 4
21 μM 1,3bisPGA + 20 mM DTT _{red}	NADPH	20 ± 8	19 ± 6	33 ± 7	98 ± 10
	NADH	16 ± 10	15 ± 4	15 ± 3	12 ± 4

a: mit 320 μM NADPH, bzw. NADH

Die K_m -Werte für 1,3bisPGA mit NADPH gemessen, sind für GapA^M und GapB^{MAC} unter allen Bedingungen (18-33 μ M) nahezu gleich. Auffällig ist, dass sie in der gleichen Größenordnung liegen, wie die der dissoziiert vorliegenden NAD(P)(H)-GAPDH (Inkubation mit 21 μ M 1,3bisPGA, bzw. 21 μ M 1,3bisPGA plus 20 mM DTT_{red}; vgl. NAD(P)(H)-GAPDH, Tab. 6). Im Gegensatz dazu sind die K_m -Werte von GapB^M für 1,3bisPGA mit NADPH gemessen unter allen Bedingungen signifikant erhöht. Sie entsprechen nicht wie die der beiden anderen rekombinanten Enzymen den K_m -Werten der dissoziiert vorliegenden NAD(P)(H)-GAPDH, sondern mit 85-121 μ M den K_m -Werten der unbehandelten, bzw. reduzierten NAD(P)(H)-GAPDH (s. Tab. 6).

Erwartet wurde, dass die K_m -Werte von GapB für 1,3bisPGA mit NADPH gemessen, unter den Vorbedingungen der Dissoziation (Inkubation mit 21 μ M 1,3bisPGA, bzw. 21 μ M 1,3bisPGA plus 20 mM DTT_{red}) ebenfalls wie die der beiden anderen rekombinanten NAD(P)(H)-GAPDH-Formen im Größenbereich von 18-33 μ M liegen. Die K_m -Werte der GapB^M für 1,3bisPGA sind jedoch konstant hoch, weil GapB^M unter den vorliegenden Bedingungen der Effektor-Konzentrationen (21 μ M 1,3bisPGA bzw. 21 μ M 1,3bisPGA plus 20 mM DTT_{red}) nicht dissoziiert. Erst durch erhöhte Effektor-Konzentrationen im Bereich des K_a -Wertes von 55-105 μ M 1,3bisPGA erfolgt eine Dissoziation, die zur Absenkung der K_m -Werte führen würde (s. Beschreibung der Tab. 10, Text zu Abb. 29).

Die Affinitäten der drei rekombinanten Formen der NAD(P)(H)-GAPDH für 1,3bisPGA zeigen, wenn als Coenzym NADH verwendet wurde, unter allen Vorbedingungen und untereinander nur minimale Unterschiede von 11-26 μ M. Diese K_m -Werte sind im Vergleich zur intakten 600 kDa-NAD(P)(H)-GAPDH (s. Tab. 6), deren K_m -Werte unter allen Vorbedingungen ebenfalls kaum Unterschiede zeigen (16-35 μ M), nur minimal geringer.

Im Wesentlichen geht aus Tabelle 11 hervor, dass abgesehen von GapB (keine Dissoziation), die Affinität für 1,3bisPGA steigt, wenn das Coenzym NADPH verwendet wurde, und die Enzyme sich im dissoziierten Zustand befinden (150 kDa).

Tabelle 12: K_m -Werte der isolierten NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat, GapA^M, GapB^{MAC} und GapB^M für die Coenzyme NADPH und NADH.

Vorinkubation	Coenzym	K_m -Werte der Enzymformen ^a (μ M)			
		A ₂ B ₂ NAD(P)(H)- GAPDH	GapA ^M	GapB ^{MAC}	GapB ^M
Ohne	NADPH	30 ± 10	60 ± 8	35 ± 10	130 ± 29
	NADH	120 ± 10	400 ± 93	320 ± 87	252 ± 31
21 μ M 1,3bisPGA	NADPH	50 ± 8	52 ± 2,0	25 ± 11	80 ± 23
	NADH	106 ± 29	450 ± 94	470 ± 70	310 ± 44
20 mM DTT _{red}	NADPH	40 ± 10	57 ± 18	50 ± 11	210 ± 38
	NADH	210 ± 20	430 ± 55	520 ± 34	287 ± 41
21 μ M 1,3bisPGA + 20 mM DTT _{red}	NADPH	60 ± 9	52 ± 2	38 ± 8	67 ± 17
	NADH	290 ± 20	455 ± 99	660 ± 130	534 ± 153

a: mit 55 μ M 1,3bisPGA

In Tabelle 12 sind unter den schon in Tabelle 10 und 11 gewählten Bedingungen der Vorinkubationen die K_m -Werte der drei rekombinant hergestellten NAD(P)(H)-GAPDH-Formen für die Coenzyme NADPH und NADH im Vergleich zu der intakten NAD(P)(H)-GAPDH (s. Tab. 6) aufgeführt.

Aus Tabelle 12 geht hervor, dass die K_m -Werte von GapA^M und GapB^M^{AC} für NADPH sich unter den gewählten Bedingungen kaum ändern. Sie liegen mit ca. 38-60 μM im gleichen Konzentrationsbereich wie die der intakten NAD(P)(H)-GAPDH unter allen vier Bedingungen (s. Tab. 7). Für GapB^M gestaltete sich die K_m -Wert-Bestimmung für das Coenzym NADPH als schwierig. In mehr als drei Meßserien wurden sehr unterschiedliche K_m -Werte für jeweils alle vier Bedingungen erzielt. Bei der Auswertung sind die ähnlichsten K_m -Werte zu Grunde gelegt worden, jedoch ist Vorsicht angeboten, diese als realistisch anzusehen. Hervorzuheben ist, dass die K_m -Werte für NADPH mit 80 und 67 μM für die dissoziierten GapB^M-Formen niedriger liegen als die der assoziierten GapB^M-Formen mit 130 und 210 μM . Sie entsprechen den gemessenen K_m -Werten der dissoziierten NAD(P)(H)-GAPDH (s. Tab. 7). Dies widerspricht den V_{max} -Bestimmungen (s. Tab. 10) und den K_m -Wert-Bestimmungen (s. Tab. 11), in denen GapB^M durch Inkubation mit 21 μM 1,3bisPGA, bzw. 21 μM 1,3bisPGA und 20 mM DTT_{red} nicht aktiviert wurde. Ein Grund dafür kann sein, dass nicht mit letzter Sicherheit ausgeschlossen werden kann, dass die verringerte Stabilität der rekombinanten Enzympräparationen zu abweichenden Ergebnissen führt.

Die Affinitäten der isolierten NAD(P)(H)-GAPDH für NADH liegen zwischen 110 und 310 μM . Dabei kann festgestellt werden, dass der K_m -Wert für NADH in jedem Fall höher liegt als der für NADPH, aber die Affinität für NADH nicht eindeutig höher für z.B die 600 kDa-Form ist, als für die 150 kDa-Form. Die K_m -Werte von 220-790 μM für NADH liegen für GapA^M, GapB^M^{AC} und GapB^M eindeutig höher als die der intakten NAD(P)(H)-GAPDH, wobei sie sich untereinander und unter den gewählten Bedingungen kaum unterscheiden. GapA^M und GapB^M^{AC} besitzen eindeutig höhere Präferenzen für das Coenzym NADPH gegenüber NADH. Hier liegen die K_m -Werte für NADH um ein vielfaches höher als für NADPH.

Im Wesentlichen ist in Tabelle 12 dargestellt, dass alle vier Enzymformen höhere K_m -Werte für NADH gegenüber dem Coenzym NADPH aufweisen.

3.12.5.2. V_{max} - und K_m -Wert-Bestimmungen für das Substrat GAP

Im vorigen Kapitel (3.11.5.1.) wurde eine biochemische Charakterisierung mit den rekombinanten Enzymen GapA^M, GapB^M^{AC} und GapB^M durchgeführt. Es wurden die V_{max} - und K_m -Werte für das Substrat 1,3bisPGA und die Coenzyme NADPH und NADH ermittelt, und diese mit den V_{max} - und K_m -Werten der isolierten intakten NAD(P)(H)-GAPDH verglichen (s. Tab. 10, 11, 12). Während der Belichtung nutzt die NAD(P)(H)-GAPDH das Substrat 1,3bisPGA, das Coenzym NADPH und, bislang ungeklärt, möglicherweise ebenfalls NADH. Diese Reaktionen finden im Calvin-Cyclus statt.

Im Weiteren wird eine biochemische Charakterisierung der drei rekombinanten Enzyme durchgeführt, wobei die V_{max} -Werte (s. Tab. 13) und die K_m -Werte (s. Tab. 14) für das Substrat GAP ermittelt werden. Es gibt Hinweise, dass die NAD(P)(H)-GAPDH im Dunkeln das Substrat GAP und das Coenzym NAD, bzw., ebenfalls ungeklärt, NADP nutzt, wobei es sich um einen Teilschritt der glykolytischen Reaktion handelt. K_m -Werte für die Coenzyme NAD und NADP wurden in dieser Arbeit nicht bestimmt. Es sind jedoch Werte aus der Literatur verfügbar. Die ermittelten Werte werden wiederum mit denen der intakten NAD(P)(H)-GAPDH verglichen (s. Tab. 6).

In Tabelle 13 sind unter den schon in den Tabellen 10 bis 12 gewählten Bedingungen der Vorinkubationen die V_{max} -Werte der drei rekombinant hergestellten NAD(P)(H)-GAPDH-Formen für das Substrat GAP aufgeführt. Im Vergleich sind die V_{max} -Werte der intakten 600 kDa-NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat aufgeführt (s. Tab. 6).

Tabelle 13: V_{max} -Werte der isolierten NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat, GapA^M, GapB^{MAC} und GapB^M für das Substrat GAP mit NADP und NAD als Coenzym.

Vorinkubation	Coenzym	V_{max} -Werte der Enzymformen ^{a,b} (U/mg Protein)			
		A ₂ B ₂ NAD(P)(H)- GAPDH	GapA ^M	GapB ^{MAC}	GapB ^M
Ohne	NADP	5 ± 0,7	20 ± 1,6	30 ± 1,7	1,59 ± 0,1
	NAD	12 ± 0,9	24 ± 0,9	25 ± 1,1	1,90 ± 0,1
21 µM 1,3bisPGA	NADP	15 ± 0,5	17 ± 0,6	24 ± 1,1	4,86 ± 0,3
	NAD	12 ± 0,6	24 ± 1,2	28 ± 1,2	2,36 ± 0,1
20 mM DTT _{red}	NADP	15 ± 0,9	16 ± 0,9	30 ± 1,2	5,45 ± 0,2
	NAD	12 ± 0,3	27 ± 0,5	28 ± 1,2	4,11 ± 0,3
21 µM 1,3bisPGA + 20 mM DTT _{red}	NADP	14 ± 1,4	18 ± 2,6	28 ± 0,8	10,02 ± 0,3
	NAD	14 ± 0,6	23 ± 0,4	31 ± 0,9	5,93 ± 0,3

a: mit 400 µM NADP, bzw. NAD als Coenzyme

b: mit 1 mM FbP

Aus Tabelle 13 geht hervor, dass sich die maximalen Aktivitäten mit 12-14 U/mg Protein der NAD(P)(H)-GAPDH für das Substrat GAP unter den vier verschiedenen Bedingungen und im Vergleich zwischen den Messungen mit NAD und NADP kaum ändern. Eine Ausnahme bildet die nicht vorinkubierte (A₂B₂)₄-NAD(P)(H)-GAPDH mit 5 U/mg Protein mit NADP als Coenzym. Generell liegen die spezifischen Aktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH damit sehr viel geringer als die des Enzyms, wenn es als Substrat 1,3bisPGA nutzt (s. Tab. 6). Mit 16-27 U/mg Protein liegen die V_{max} -Werte von GapA^M in der gleichen Größenordnung, allerdings sind sie mit NAD als Coenzym geringfügig höher. Demgegenüber zeigen die maximalen Aktivitäten von GapB^{MAC} für NAD und NADP keinerlei Unterschiede. Jedoch lässt sich erkennen, dass wie schon in der reduzierenden Richtung GapB^{MAC} eine höhere Maximalaktivität von 24-31 U/mg Protein aufweist. Die maximalen Aktivitäten von GapB^M sind mit 1-10 U/mg Protein am niedrigsten und zeigen unter den gewählten Bedingungen mit NADP und NAD gemessen, keine deutlichen Unterschiede.

In Tabelle 14 sind unter den schon in den Tabellen 10 bis 13 gewählten Bedingungen der Vorinkubationen die K_m -Werte der drei rekombinant hergestellten NAD(P)(H)-GAPDH-Formen für das Substrat GAP aufgeführt. Im Vergleich sind die K_m -Werte der intakten 600 kDa-NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat aufgeführt (s. Tab. 6).

Die NAD(P)(H)-GAPDH zeigt in allen Fällen der vier Inkubationen eine leichte Präferenz für das Coenzym NAD (s. Tab. 14). Am deutlichsten ist dies bei der oxidierten 600 kDa-Form mit 12 µM (NAD) gegenüber 30 µM (NADP) gezeigt. Aber es sind keine so deutlichen Unter-

Tabelle 14: K_m -Werte der isolierten NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat, GapA^M, GapB^{MAC} und GapB^M für das Substrat GAP.

Vorinkubation	Coenzym	K_m -Werte der Enzymformen ^a (μM)			
		A ₂ B ₂ NAD(P)(H)- GAPDH	GapA ^M	GapB ^{MAC}	GapB ^M
Ohne	NADP	30,2 ± 10	30 ± 6	23 ± 4	8 ± 2
	NAD	12,6 ± 1	20 ± 3	18 ± 2	12 ± 2
21 μM 1,3bisPGA	NADP	27 ± 2	17 ± 2	13 ± 2	29 ± 6
	NAD	19 ± 3	28 ± 4	18 ± 2	25 ± 4
20 mM DTT _{red}	NADP	23 ± 4	12 ± 2	19 ± 2	25 ± 4
	NAD	18 ± 1	33 ± 1	17 ± 2	17 ± 8
21 μM 1,3bisPGA + 20 mM DTT _{red}	NADP	22 ± 6	30 ± 12	18 ± 1	26 ± 3
	NAD	20 ± 3	25 ± 1	21 ± 1	27 ± 4

a: mit 400 μM NADP, bzw. NAD als Coenzyme

schiede wie für das Substrat 1,3bisPGA vorhanden (s. Tab. 6). Die K_m -Werte der drei rekombinanten Enzyme liegen sämtlich im gleichen Konzentrationsbereich wie bei der NAD(P)(H)-GAPDH. Sie unterscheiden sich weiterhin unter den verschiedenen Vorinkubationen und mit den Coenzymen NAD und NADP gemessen, nicht voneinander.

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass sich in der oxidierenden Richtung keine vergleichbar signifikanten Unterschiede zwischen den vier Enzymen für alle vier Vorinkubationen für V_{max} und K_m für das Substrat GAP feststellen lassen, wie dies in der reduzierenden Richtung maßgeblich der Fall ist.

Die in den Kapiteln 3.11.1. bis 3.11.5. aufgeführten Ergebnisse sind teilweise in BAALMANN et al. (1996) publiziert.

3.12.6. Expression von GapA^{MBM}- und GapA^{MBMAC}-Formen in *E. coli*

Die in den Kapiteln 3.11.1. bis 3.11.4. aufgeführten Ergebnisse unterstützen die Hypothese, dass die CTE der B-Untereinheit der NAD(P)(H)-GAPDH für die Aggregation des Enzyms in die 600 kDa-Form verantwortlich ist, denn GapB^M kann in *E. coli* spontan in eine höhere Molekulargewichtsform von 470 kDa aggregieren. Hingegen verbleibt GapB^{MAC} in der 150 kDa-Form. Eine weitere Möglichkeit, die Rolle der CTE bei der Aggregation aufzuklären, ist die Herstellung der rekombinanten GapA^{MBM}- und GapA^{MBMAC}-Formen. Das GapA^{MBM}-Konstrukt, welches mit dem reinen Enzym aus Spinat identisch sein sollte (mit Ausnahme des Methionins), sollte vollständig in die 600 kDa-Form aggregieren können, das GapA^{MBMAC}-Protein hingegen nicht.

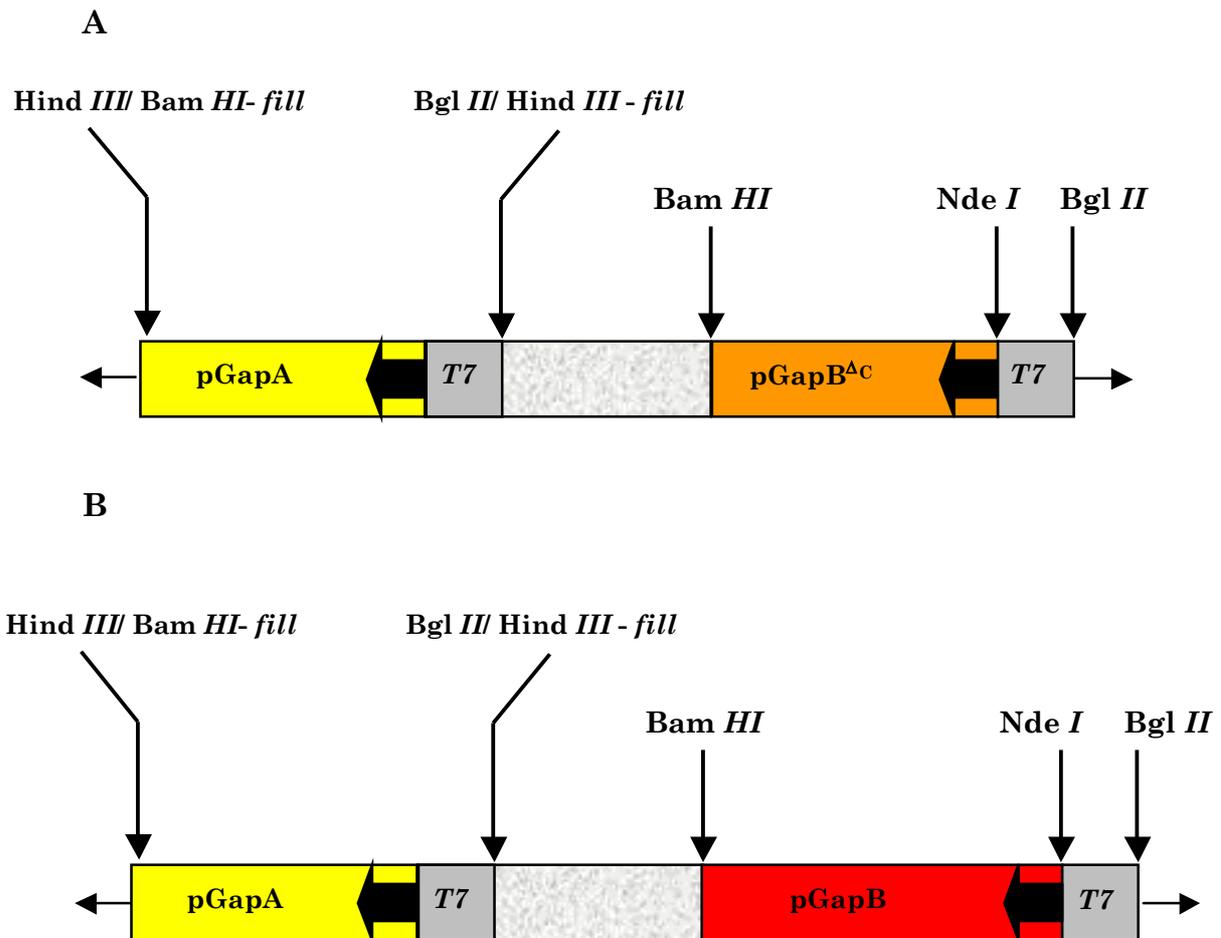


Abbildung 30: Klonierungsschema zur Konstruktion der rekombinanten (A) $p\text{GapA}^{\text{M}}\text{B}^{\text{M}}\text{A}^{\text{C}}$ und (B) $p\text{GapA}^{\text{M}}\text{B}^{\text{M}}$ zur Überexpression der 'reifen' chloroplastidären $\text{GapA}^{\text{M}}\text{B}^{\text{M}}\text{A}^{\text{C}}$ und $\text{GapA}^{\text{M}}\text{B}^{\text{M}}$. Das die cDNA-Sequenz für $p\text{GapA}^{\text{M}}$ enthaltene Plasmid (s. Abb. 25) wurde mit *Bgl* II und *Bam* HI geschnitten und zu *blunt ends* aufgefüllt. Die beiden pET-Vektoren, die die Konstrukte $p\text{GapB}^{\text{M}}$ und $p\text{GapB}^{\text{M}}\text{A}^{\text{C}}$ enthalten, wurden jeweils mit *Hind* III linearisiert und die Enden ebenfalls zu *blunt ends* aufgefüllt. Die cDNA-Sequenz der $p\text{GapA}^{\text{M}}$ wurde jeweils in die linearisierten Vektoren mit $p\text{GapB}^{\text{M}}$ und (A) $p\text{GapB}^{\text{M}}\text{A}^{\text{C}}$ und (B) $p\text{GapB}^{\text{M}}$ inseriert.

3.12.7. Molekulargewichtsbestimmung der in *E. coli* coexprimierten im Rohextrakt vorliegenden $\text{GapA}^{\text{M}}\text{B}^{\text{M}}$ - und $\text{GapA}^{\text{M}}\text{B}^{\text{M}}\text{A}^{\text{C}}$ -Proteine

Die durchgeführten Gelfiltrationen mit den drei rekombinant hergestellten Proteinen GapA^{M} , $\text{GapB}^{\text{M}}\text{A}^{\text{C}}$ und GapB^{M} zeigen, dass GapA^{M} und $\text{GapB}^{\text{M}}\text{A}^{\text{C}}$ tetramere Proteine sind, während GapB^{M} in ein höheres Molekulargewicht von ca. 470 kDa aggregiert (s. Abb. 28). Um zu überprüfen, welches Molekulargewicht die beiden $\text{GapA}^{\text{M}}\text{B}^{\text{M}}$ - und $\text{GapA}^{\text{M}}\text{B}^{\text{M}}\text{A}^{\text{C}}$ -Konstrukte besitzen, wurden weitere Gelfiltrationen durchgeführt. Die Klonierungen und Expressionen der beiden rekombinanten Formen erfolgte wie in Material und Methoden beschrieben (vgl. Kap. 2.8.).

Für die Gelfiltrationen wurden die beiden in *E. coli*-Rohextrakt vorliegenden $\text{GapA}^{\text{M}}\text{B}^{\text{M}}$ - und $\text{GapA}^{\text{M}}\text{B}^{\text{M}}\text{A}^{\text{C}}$ -Konstrukte verwendet. Da *E. coli* keine NADPH-abhängigen Aktivitäten mit GAPDH zeigt, konnten für die Gelfiltrationen die entsprechenden Rohextrakte eingesetzt werden. Die beiden erhaltenen Konstrukte im Rohextrakt von *E. coli* waren nur kurze Zeit stabil, d.h. nach ein bis zwei Wochen traten Aktivitätsverluste auf.

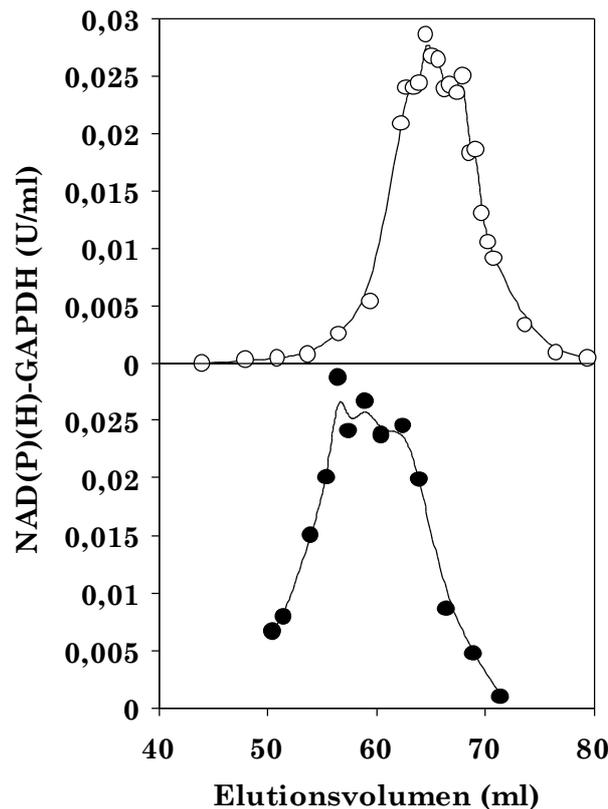


Abbildung 31: Aggregationszustände der beiden in *E. coli*-Rohextrakten coexprimierten chloroplastidären rekombinanten Formen. Die Anfangsaktivität von (○) GapA^{MBM}^{AC} und (●) GapA^{MBM} im Standard-Aktivitätstest mit NADPH als Coenzym wurden in den Fraktionen bestimmt. Die Fraktionen wurden ohne Vorinkubation und ohne Zusätze im Puffer gemessen. Es wurden jeweils 800 µg Protein (*E. coli*-Rohextrakt) aufgetragen. Das Elutionsvolumen von 54,5 ml entspricht dem Molekulargewicht von 470 kDa und von 69 ml dem von 150 kDa.

GapA^{MBM}^{AC} eluiert in der tetrameren Form (s. Abb. 31A). GapA^{MBM} eluiert im Gegensatz dazu in einer höheren Molekulargewichtsform, jedoch nicht wie erwartet als Hexadecamer, sondern lediglich in einer Mischung aus ca. 300-470 kDa (s. Abb. 31B).

In der Arbeitsgruppe Pflanzenphysiologie (Osnabrück) wurden von C. Sanders weitere GapA^{MBM}-rekombinante NAD(P)(H)-GAPDH-Formen kloniert. Die Klonierungen erfolgten in gleicher Weise wie in dieser Arbeit beschrieben. Jedoch wurden die im CTE befindlichen Cysteine 355 und 364 durch Serine ersetzt. Auf diese Weise wurden die drei Mutanten GapA^{MBM}-C355S, GapA^{MBM}-C364S und GapA^{MBM}-C355S/C364S erzeugt (SANDERS 1997). Auch diese Klonierungen wurden durchgeführt, um die Rolle der CTE bei der Aggregation zu spezifizieren. Bislang wurde theoretisch angenommen, dass die CTE die Aggregation in die 600 kDa-Form vermittelt, indem sie durch elektrostatische Wechselwirkungen mit einem negativ geladenen Bereich an einen positiv geladenen Bereich an einer A-Untereinheit eines weiteren Tetramers bindet. Unklar war, ob die CTE in dieser Funktion oxidiert vorliegen muß (sich also innerhalb der CTE eine Disulfidbrücke zwischen Cys 355 und Cys 364 befindet), oder ob die Disulfidbrücke für die Bindung keine Rolle spielt. Durch die Herstellung der drei rekombinanten Formen wird die reduzierte Form simuliert. Weiterhin wurde angenommen, dass die CTE auch in der reduzierten Form bindet, denn Versuche mit isolierter NAD(P)(H)-GAPDH (s. Abb. 18B) und NAD(P)(H)-GAPDH in isolierten intakten Spinat-Plastiden (s. Abb. 10B) ergab, dass Zugabe von Reduktionsmitteln nicht zu einer Dissoziation in die 150 kDa-Form führte. Unter diesem Aspekt wurde mit der GapA^{MBM}-C355-

Mutante eine Gelfiltration an der Superdex-200 durchgeführt. Die Mutante wurde freundlicherweise von C. Sanders zur Verfügung gestellt.

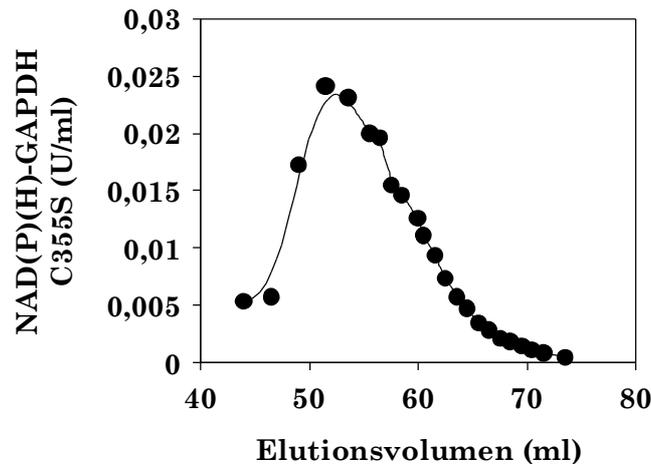


Abbildung 32: Aggregationszustand der in *E. coli*-Rohextrakt coexprimierten chloroplastidären GapA^{MBM}-C355S-Mutante. Die Anfangsaktivität der rekombinanten GapA^{MBM}-C355S-Mutante im Standard-Aktivitätstest mit NADPH als Coenzym wurde in den Fraktionen bestimmt. Die Fraktionen wurden ohne Vorinkubation und ohne Zusätze im Puffer gemessen. Es wurden ca. 800 µg Protein aufgetragen. Der *E. coli*-Rohextrakt mit der GapA^{MBM}-C355S-Mutante wurde freundlicherweise von C. Sanders zur Verfügung gestellt. Die Klonierung ist in SANDERS (1997) beschrieben. Das Elutionsvolumen von 51,5 ml entspricht dem Molekulargewicht von 600 kDa und von 54,5 ml dem von 470 kDa.

In Abbildung 32 ist dargestellt, dass die rekombinante GapA^{MBM}-C355S-Mutante, die in *E. coli* exprimiert wurde, in die 600 kDa-Form aggregiert. Darüber hinaus zeigt auch sie wie GapA^{MBM} (s. Abb. 31B) ein Molekulargewicht von ca. 470 kDa. Die teilweise Aggregation in die 600 kDa-Form zeigt einerseits, dass für die Aggregation die CTE notwendig ist, andererseits, dass für eine Aggregation in eine höhermolekulare Form keine Disulfidbrücke innerhalb der CTE vorliegen muß.

3.13. Inaktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH und der rekombinanten Formen der NAD(P)(H)-GAPDH durch H₂O₂

Zur weiteren funktionellen Charakterisierung der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat wurde untersucht, welchen Einfluß Wasserstoffperoxid auf die NAD(P)(H)-abhängigen Aktivitäten der GAPDH aus Spinat besitzt. In einigen Publikationen wurde H₂O₂ unter dem Aspekt einer möglichen oxidativen Schädigung der NAD(P)(H)-GAPDH, die zur Inaktivierung führt, untersucht, wobei die Autoren zu widersprüchlichen Ergebnissen kommen. Der Einfluß von H₂O₂ wurde mit NAD(P)(H)-GAPDH aus verschiedenen Organismen getestet. Zugabe von H₂O₂ zu Plastiden von *Anacystis nidulans* (heute: *Synechocystis PCC 6803*), in denen die GAPDH in einem Komplex von 440 kDa vorliegt, führte zu einer vollständigen Inaktivierung der NADPH-abhängigen Aktivitäten, welche durch Zugabe von GSH wieder revertiert werden konnte (UDVARDY et al. 1982). Im Gegensatz dazu wurde NAD(P)(H)-GAPDH, ebenfalls in *Synechocystis PCC 6803* getestet, durch Zugabe von H₂O₂ zu 40% inaktiviert. Die Plastiden, in denen die NAD(P)(H)-GAPDH im Komplex von 440 kDa vorlagen, wurden vor der Zugabe von H₂O₂ mit DTT_{red} inkubiert und anschließend entsalzt. (TAKEDA et al. 1995). NAD(P)(H)-GAPDH (160 kDa), isoliert aus *Synechococcus PCC 7942* wurde durch Zugabe von H₂O₂ nicht inaktiviert (TAMOI et al. 1996). Jedoch wurde GAPDH in Plastiden von ebenfalls *Synechococcus PCC 7942*, die mit DTT_{red} inkubiert und anschließend entsalzt wurden, durch Zugabe von H₂O₂ zu 40% inaktiviert (TAKEDA et al. 1995). In mit DTT_{red} inkubierten und anschließend entsalzten Plastiden von *Euglena gracilis* und

Chlamydomonas reinhardtii wurde die NAD(P)(H)-GAPDH ebenfalls zu 40-50% inaktiviert (TAKEDA et al. 1995). Unter gleichen Bedingungen wurde die NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat vollkommen inaktiviert (TAKEDA et al. 1995). In den aufgeführten Publikationen wurden die NADH-abhängigen Aktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH nicht getestet, und in den Arbeiten von TAKEDA et al. (1995) und TAMOI et al. (1996) wurde nicht überprüft, ob die Inaktivierung reversibel ist.

Aus den Ergebnissen ergibt sich der Hinweis, dass eine Inaktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH abhängig davon ist, ob das Enzym isoliert, oder ob es in Dunkel-adaptierten Chloroplasten in einem Komplex, bzw. als eigenständiges Enzym in der 600 kDa-Form vorliegt. Weiterhin besteht ein Unterschied darin, ob es sich um Plastiden höherer Pflanzen oder um Plastiden aus genannten Algen handelt.

In dieser Arbeit stehen sowohl Aggregate der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat, die 600 kDa-Form und die 470 kDa-GapB^M, als auch die Tetramere GapA^M und GapB^{MAC} zur Verfügung, um die Wirkung von H₂O₂ zu testen. In folgenden Versuchen wird überprüft, ob die Zugabe von H₂O₂ zu den vier GAPDH-Isoenzymen zu einer Inaktivierung oder einer Schädigung führt, bzw. ob kein Effekt eintritt.

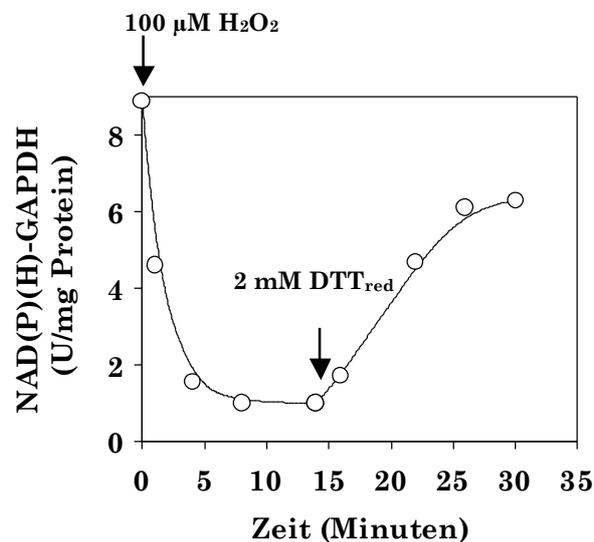


Abbildung 33: Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat durch 100 µM H₂O₂ und Reaktivierung des Enzyms durch Zugabe von 2 mM DTT_{red} nach 14 Minuten. Die Anfangsaktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH in den Proben wurden im Standard-Enzymtest zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Der Aktivitätstest wurde mit NADPH als Coenzym durchgeführt.

Aus Abbildung 33 ist ersichtlich, dass H₂O₂ die NADPH-abhängige Aktivität der 600 kDa-Form von GAPDH innerhalb von fünf Minuten inhibiert. Die Zugabe von 2 mM DTT_{red} führt zu einer reversiblen Aktivitätssteigerung. NAD(P)(H)-GAPDH wird nicht irreversibel geschädigt. In Abbildung 33 ist ferner aufgeführt, dass die Grundaktivität des Enzyms (hier 10 U/mg Protein) gesenkt wird. Durch Zugabe von DTT_{red} wird diese Grundaktivität wieder erreicht.

Die Wirkung von H₂O₂ auf die NADPH-abhängigen Aktivitäten des GAPDH-Hexadecamers, sowie GapB^M und die beiden Homotetramere GapA^M und GapB^{MAC} ist in Abbildung 34 dargestellt.

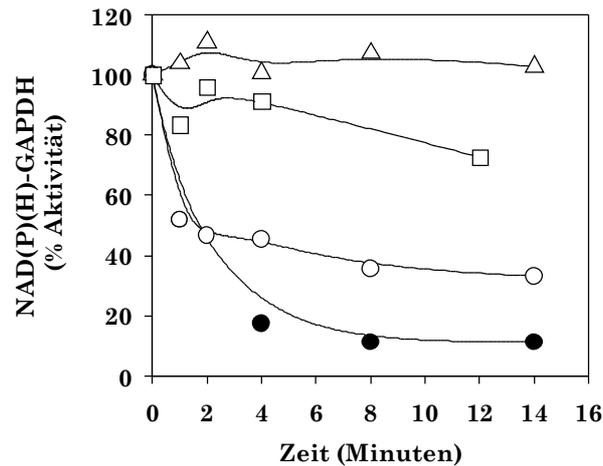


Abbildung 34: Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat und der drei rekombinanten NAD(P)(H)-GAPDH-Formen durch 100 µM H₂O₂ innerhalb von 14 Minuten. Die Anfangsaktivitäten von (●) NAD(P)(H)-GAPDH, von (□) GapA^M, von (○) GapB^M und von (△) GapB^{MAC} in den Proben wurden im Standard-Enzymtest zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Der Aktivitätstest wurde mit NADPH als Coenzym durchgeführt.

In Abbildung 34 ist dargestellt, dass die NADPH-abhängige Aktivität der beiden aggregierten GAPDH-Formen (600 kDa-GAPDH, 470 kDa-GapB^M) durch Zugabe von H₂O₂ innerhalb von vier bis acht Minuten um 60-80% abnimmt. Die Tetramere GapA^M und GapB^{MAC}, die die CTE nicht besitzen, werden nicht oder kaum inaktiviert.

Im folgenden Versuch wird untersucht, welche Wirkung H₂O₂ auf die NADH-abhängigen Aktivitäten der beiden aggregierten GAPDH-Formen (600 kDa-GAPDH, 470 kDa-GapB^M) und der beiden Tetramere GapA^M und GapB^{MAC} hat.

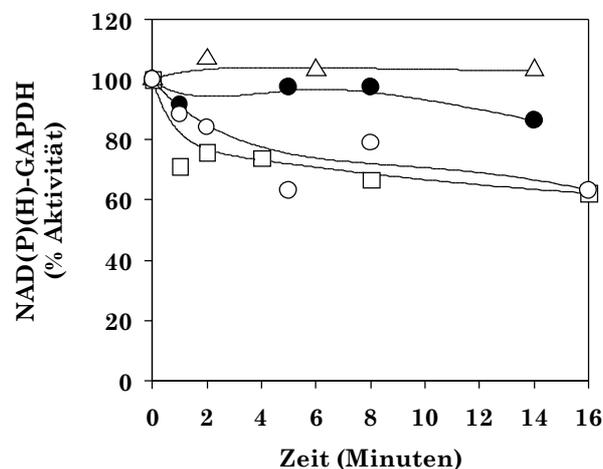


Abbildung 35: Zeitlicher Verlauf der Inaktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat und der drei rekombinanten NAD(P)(H)-GAPDH-Formen durch 100 µM H₂O₂ innerhalb von 16 Minuten. Die Anfangsaktivitäten von (●) NAD(P)(H)-GAPDH, von (□) GapA^M, von (○) GapB^M und von (△) GapB^{MAC} in den Proben wurden im Standard-Enzymtest zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen. Der Aktivitätstest wurde mit NADH als Coenzym durchgeführt.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit NADPH als Coenzym (s. Abb. 34), wird die Aktivität aller vier Enzymformen mit NADH nicht oder kaum verringert (s. Abb. 35).

Zusammenfassend können folgende Aussagen getroffen werden: Die Inaktivierung der 600 kDa-Form der GAPDH aus Spinat durch H₂O₂ ist reversibel (s. Abb. 33). Werden die

GAPDH-Isoenzym-Aktivitäten mit NADPH als Coenzym gemessen, so werden die beiden CTE-tragenden Enzyme GAPDH und GapB^M inaktiviert, während GapA^M und GapB^{M^{Ac}} gleichermaßen aktiv bleiben (s. Abb. 34). Die Behandlung mit H₂O₂ führt in keinem der Versuche, in denen NADH als Coenzym verwendet wurde, zu einer Inaktivierung (s. Abb. 35).

3.14. Plastidäre NAD(H)-spezifische GAPDH: Handelt es sich um GapCp?

Die bislang untersuchte NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat-Chloroplasten, sowie die chloroplastidären rekombinanten Proteine GapA^M, GapB^{M^{Ac}} und GapB^M zeigen sowohl mit NADP(H), als auch mit NAD(H) signifikante Aktivitäten, sie sind Coenzym-bispezifisch.

NEUHAUS et al. zeigten 1993, dass in etiolierten Gerstenblättern, Blumenkohlfrucht-Influreszenzen und in heterotrophen Chromoplasten von Erbsen-Früchten und Maiskörnern nur geringfügige NADPH-abhängige GAPDH-Aktivitäten auftraten, während die NADH-abhängigen Aktivitäten wesentlich höher lagen. Darüberhinaus wurde in *Pinus sylvestris* in Chloroplasten ein Isoenzym nachgewiesen, das strikt NAD(H)-abhängige Aktivitäten zeigte. Es wurde als GapCp (p – plastidär) bezeichnet (MEYER-GAUEN et al. 1994). Eine strikt NAD(H)-spezifische Isoform der GAPDH war bislang unbekannt. Daher stellten sich die Fragen, ob es sich bei *Pinus sylvestris* um einen anderen chloroplastidären Typus handelt, als es z.B. bei Spinat der Fall ist; bzw. ob es sich in etiolierten bzw. heterotrophen Plastiden um eine modifizierte A₂B₂-GAPDH, oder um ein unbekanntes Isoenzym handelt. In heterotrophen Plastiden fehlen Photosysteme, Thylakoide und Chlorophyll. In diesem Plastidentyp ist daher eine Lichtaktivierung, die ausschließlich die NADPH-abhängigen Aktivitäten der GAPDH betrifft, ausgeschlossen. Unter diesem Gesichtspunkt ist es interessant, zu überprüfen, welche Charakteristiken die GAPDH in heterotrophen Plastiden aufweist.

3.14.1. NAD(H)- und NADP(H)-spezifische GAPDH-Aktivitäten in Dunkel-adaptierten intakten Spinat- und isolierten roten Paprikafruchtplastiden

Um zu untersuchen, welches Molekulargewicht und welche Coenzym-spezifität die GAPDH in heterotrophen Plastiden (rote Paprikafruchtplastiden) besitzt, wurden Gelfiltrationen mit aufgebrochenen roten Paprikafruchtplastiden und im Vergleich mit Dunkel-adaptierten isolierten Spinat-Chloroplasten durchgeführt. Es wurden jeweils die NADPH- und NADH-abhängigen GAPDH-Aktivitäten gemessen.

Die NAD(P)(H)-abhängigen Aktivitäten der GAPDH in im Dunkeln inkubierten Spinat-Chloroplasten eluierten in einem einzigen Peak in der 600 kDa-Form, wobei die Aktivität mit NADH gegenüber NADPH leicht erhöht ist (s. Abb. 36A). Es handelt sich um die (A₂B₂)₄-Form der NAD(P)(H)-GAPDH. In roten Paprikafruchtplastiden eluiert GAPDH ebenfalls in der 600 kDa-Form, wobei das Verhältnis NADH/NADPH-Aktivität im Vergleich zu den Spinatplastiden gleich bleibt (s. Abb. 36B). Zusätzlich treten bei dem Molekulargewicht von 150 kDa strikt NADH-abhängige Aktivitäten auf (s. Abb. 36B). Augenscheinlich existiert in roten Paprikafruchtplastiden ein weiteres strikt NAD(H)-abhängiges Isoenzym. Möglicherweise handelt es sich bei dem Isoenzym um die von MEYER-GAUEN et al. (1994) nachgewiesene strikt NAD(H)-abhängige GapCp. Weitere Gelfiltrationen mit grünen Paprikafruchtplastiden sind in BACKHAUSEN et al. (1998) publiziert.

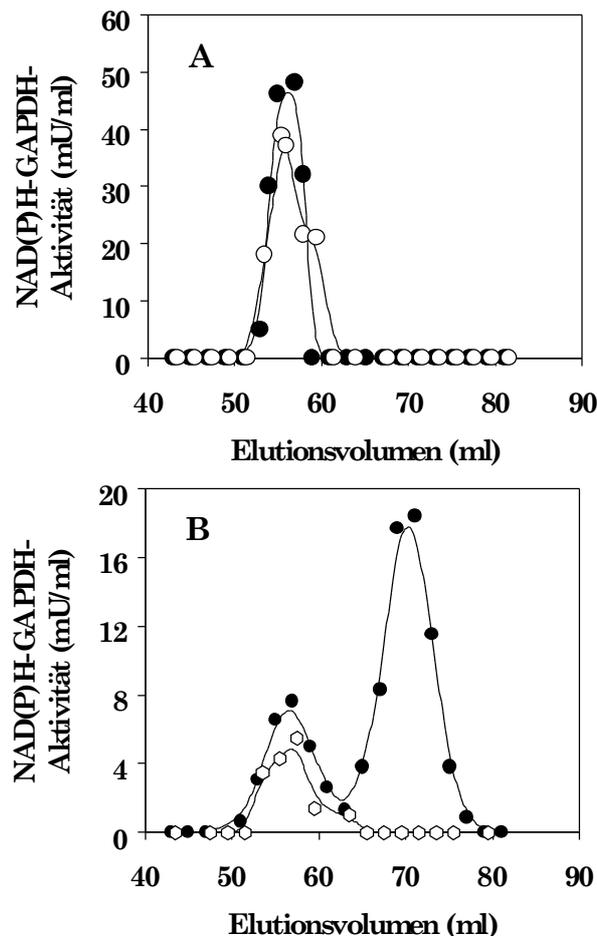


Abbildung 36: Aggregationszustände der plastidären NAD(P)(H)-GAPDH in intakten Spinat-Chloroplasten im Dunkeln und intakten roten Paprikafruchtplastiden. Die Plastiden wurden aus (A) Spinatblättern und (B) roten Paprikafrüchten isoliert. Die Anfangsaktivitäten der NADPH-GAPDH mit NADPH als Coenzym und die Aktivitäten der NADH-GAPDH mit NADH als Coenzym wurden im Standard-Aktivitätstest in den Fraktionen bestimmt. Die Fraktionen der (○) NADPH-GAPDH und (●) NADH-GAPDH wurden ohne Vorinkubation und ohne Zusätze im Puffer gemessen. Das Elutionsvolumen von 54 ml entspricht dem Molekulargewicht von 600 kDa und von 70 ml dem von 150 kDa.

3.14.2. Trennung der NAD(H)-spezifischen und der NAD(P)(H)-abhängigen Aktivitäten der GAPDH aus rotem Paprikafruchtstroma

Im Stroma roter Paprikafruchtplastiden konnte eine NAD(H)-spezifische Isoform der GAPDH mittels Gelfiltration an der Superdex-200 nachgewiesen werden. Bei diesem Isoenzym handelt es sich eventuell um GapCp, welches ein relativ junges Isoenzym innerhalb der GAPDH-Familie darstellt. Bislang wurde es ausschließlich aus *Pinus sylvestris* isoliert und charakterisiert. Außerdem wurde in roten Paprikafruchtplastiden die bislang aus Spinat bekannte bispezifische $(A_2B_2)_4$ -GAPDH nachgewiesen (s. Abb. 36B). Um eine biochemische Charakterisierung mit der NAD(H)-spezifischen GAPDH aus roten Paprikafruchtplastiden durchführen zu können, ist es notwendig, beide Isoenzyme voneinander zu trennen. Es stellte sich die Frage, ob sich die NAD(P)(H)-abhängigen Aktivitäten der bispezifischen GAPDH von den NAD(H)-abhängigen Aktivitäten der mutmaßlichen GapCp trennen lassen. Um beide Isoenzyme zu separieren, wurde zunächst eine Ionenaustauschchromatographie an der DEAE-Cellulose durchgeführt (vgl. Kap. 2.8.).

Aus der Abbildung 37 geht hervor, dass sich die beiden Isoenzyme auf der DEAE-Cellulose trennen lassen. Im ersten Peak handelt es sich um die NAD(H)-spezifische GAPDH, im

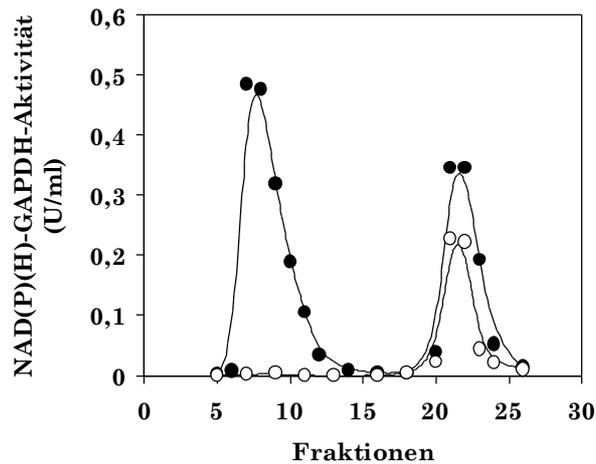


Abbildung 37: Ionenaustauschchromatographie mittels DEAE-Cellulose zur Trennung der bispezifischen NAD(P)(H)-GAPDH und der NAD(H)-spezifischen GAPDH aus rotem Paprikafruchtstroma. Die (○) NADPH-abhängigen Anfangs- und die (●) NADH-abhängigen Aktivitäten wurden im Standard-Aktivitätstest in den Fraktionen bestimmt. Die Fraktionen wurden ohne Vorinkubation und ohne Zusätze im Puffer gemessen. Im Bereich der Fraktionen fünf bis 14 handelt es sich um die NAD(H)-spezifische GAPDH, da keine NADPH-abhängigen Aktivitäten vorhanden sind. Bei den Fraktionen 19 bis 26 handelt es sich um die bispezifische NAD(P)(H)-GAPDH, da sowohl NADH, als auch NADPH umgesetzt werden. Die NAD(H)-spezifische GAPDH eluierte nach Zugabe von 100 mM KCl, die NAD(P)(H)-GAPDH nach Zugabe von 500 mM KCl.

zweiten Peak um die bispezifische NAD(P)(H)-GAPDH. Es kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der NAD(P)(H)-GAPDH im zweiten Peak um die 600 kDa-Form und nicht um die 150 kDa-Form handelt, da die Aktivitäten mit NADH höher liegen als mit NADPH (s. Abb. 36A).

Im weiteren Verlauf wurden die beiden Isoenzyme zur Größenbestimmung separat auf eine Superdex-200 aufgetragen (s. Abb. 38).

Abbildung 38 bestätigt, dass in roten Paprikafruchtplastiden zwei Isoenzyme vorkommen (s. Abb. 36, 37), denn aus Abbildung 38A ist zu ersehen, dass in den Fraktionen mit der NAD(H)-spezifischen GAPDH durchgeführten Gelfiltration keine NADPH-abhängigen Aktivitäten auftreten. Somit konnte die NAD(H)-spezifische GAPDH erfolgreich von der NAD(P)(H)-GAPDH getrennt werden. Beide Isoenzyme eluieren, wie in den Abbildungen 38A und 38B dargestellt, in der tetrameren 150 kDa-Form. Hier zeigt die tetramere Form der NAD(P)(H)-GAPDH im Vergleich zum DEAE-Cellulose Säulenlauf (s. Abb. 37) höhere Aktivitäten mit NADPH, wie es für die aktivierte chloroplastidäre Form typisch ist. Das Verhältnis NADPH/NADH-Aktivitäten beträgt in der 600 kDa-Form (s. Abb. 36, 37) 1,25 bzw. 1,66. In der 150 kDa-Form kehrt sich das Verhältnis NADPH/NADH-Aktivitäten um den Wert 'drei' um (s. Abb. 38).

Mit der NAD(H)-spezifischen GAPDH aus roter Paprikafrucht und der bispezifischen NAD(P)(H)-GAPDH aus roten Paprikafruchtplastiden wurde eine biochemische Charakterisierung durchgeführt. Die erhaltenen K_m -Werte werden mit den K_m -Wert-Bestimmungen der aus Spinat-Plastiden isolierten NAD(P)(H)-GAPDH und den rekombinanten Enzymen GapA^M, GapB^{M^AC} und GapB^M verglichen.

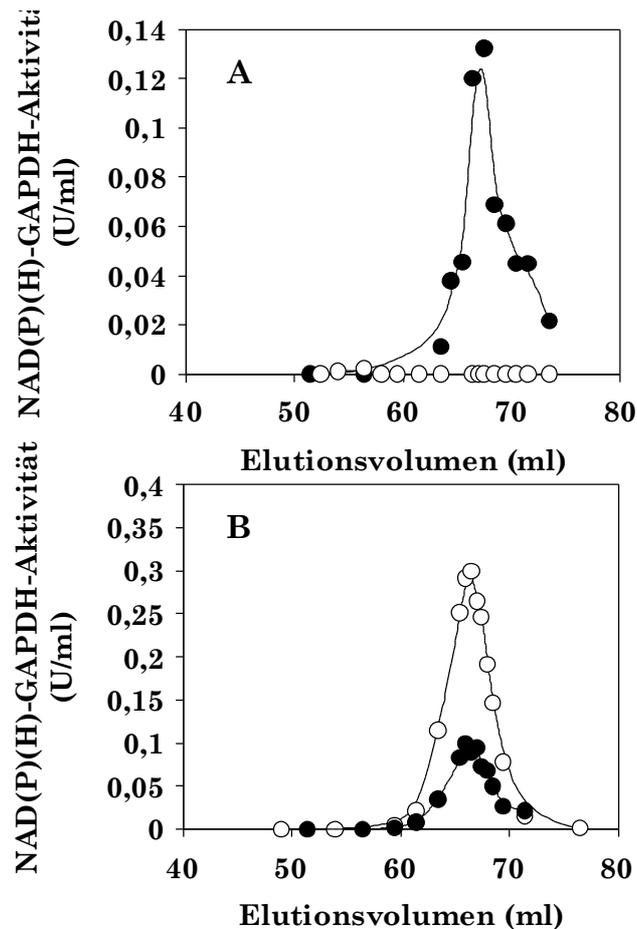


Abbildung 38: Aggregationszustände der bispezifischen NAD(P)(H)-GAPDH und der NAD(H)-spezifischen GAPDH aus rotem Paprikafruchtstroma. Die Aktivitäten der (A) NAD(H)-spezifischen GAPDH (Fraktionen fünf bis 14 aus Abb. 35) und die Anfangsaktivitäten der (B) NAD(P)(H)-GAPDH (Fraktionen 19 bis 26 aus Abb. 35) wurden jeweils mit NADH (●) und NADPH (○) als Coenzym in den Fraktionen bestimmt. Die Fraktionen wurden ohne Vorinkubation und ohne Zusatz im Puffer gemessen. Das Elutionsvolumen von 68 ml entspricht dem Molekulargewicht von 150 kDa.

In Tabelle 15 sind unter den schon in den Tabellen 10 bis 14 gewählten Bedingungen der Vorinkubationen die K_m -Werte der NAD(H)-spezifischen GAPDH für die Substrate GAP und 1,3bisPGA, sowie für das Coenzym NADH aufgeführt.

In Tabelle 15 ist dargestellt, dass die K_m -Werte der NAD(H)-spezifischen GAPDH für das Substrat GAP ohne Vorinkubation und nach Aktivierung mit 1,3bisPGA und DTT_{red} gleich bleiben ($1\text{--}3\ \mu\text{M}$). Verglichen mit den K_m -Werten der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat (s. Tab. 6) und den rekombinanten Enzymen GapA^M, GapB^{M^{AC}} und GapB^M (s. Tab. 14) liegen sie im gleichen Konzentrationsbereich. Auch die K_m -Werte für das Substrat 1,3bisPGA unterscheiden sich unter den verschiedenen Vorbedingungen der Inkubationen nicht voneinander. Darüber hinaus liegen sie in der gleichen Größenordnung wie die der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat (s. Tab. 6) und den rekombinanten Formen (s. Tab. 11). Bei der K_m -Wert-Bestimmung für NADH sind unter den verschiedenen Vorinkubationen, wie schon bei der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat (s. Tab. 7) und den drei rekombinanten Enzymen (s. Tab. 12) Streuungen zu erkennen, dennoch sind auch sie denen der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat ($120\text{--}290\ \mu\text{M}$) vergleichbar.

Tabelle 15: K_m -Werte der NAD(H)-spezifischen GAPDH aus roten Paprikafruchtplattiden für die Substrate GAP und 1,3bisPGA, sowie für das Coenzym NADH.

	K_m -Werte der Enzymformen (μM)		
	GAP ^a	1,3bisPGA ^b	NADH ^c
Ohne	2,9 ± 0,6	29,26 ± 9,3	204 ± 27
21 μM 1,3bisPGA	n.b.	28,58 ± 7,4	135 ± 32
20 mM DTT_{red}	n.b.	23,23 ± 4,9	135 ± 32
21 μM 1,3bisPGA + 20 mM DTT_{red}	1,6 ± 0,3	22,89 ± 2,4	204 ± 40

n.b.: nicht bestimmt

a: mit 400 μM NAD

b: mit 320 μM NADH

c: mit 55 μM 1,3bisPGA

Möglicherweise handelt es sich bei der in dieser Arbeit angereicherten NAD(H)-spezifischen GAPDH um GapCp. Für GapCp sind bislang nur die von MEYER-GAUEN et al. (1998) publizierten K_m -Werte für GAP (344 μM), NAD (62 μM), und die spezifische Aktivität (89 U/mg Protein) bekannt. Zwischen dem K_m -Wert der NAD(H)-spezifischen GAPDH für GAP von 1-3 μM (s. Tab. 15) und dem von MEYER-GAUEN et al. (1998) bestimmten Wert von 344 μM herrscht eine erhebliche Diskrepanz.

In Tabelle 16 sind unter den schon in den Tabellen 10 bis 15 gewählten Bedingungen der Vorinkubationen die K_m -Werte der bispezifischen NAD(P)(H)-GAPDH aus roter Paprikafrucht für die Substrate GAP und 1,3bisPGA aufgeführt.

Aus Tabelle 16 geht hervor, dass die K_m -Werte der bispezifischen NAD(P)(H)-GAPDH für das Substrat GAP (mit dem Coenzym NAD gemessen) unter den verschiedenen Vorinkubationen konstant zwischen 9-28 μM liegen. Die K_m -Werte für GAP mit NADP gemessen, liegen mit 18-23 μM im gleichen Konzentrationsbereich. Verglichen mit den K_m -Werten der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat (s. Tab. 6), den rekombinanten Enzymen GapA^M, GapB^{M^{Ac}} und GapB^M (s. Tab. 14) und dem K_m -Wert für GAP der NAD(H)-spezifischen GAPDH (s. Tab. 15) liegen beide K_m -Werte in der gleichen Größenordnung.

Die K_m -Werte der NAD(P)(H)-GAPDH aus roter Paprikafrucht zeigen unter den vier verschiedenen Vorinkubationsbedingungen verglichen mit dem Isoenzym aus Spinat (s. Tab. 6) ähnliche Affinitäten für das Substrat 1,3bisPGA. Sie wurden aufgrund der geringen zur Verfügung stehenden Proteinmenge ausschließlich mit NADPH gemessen. Hervorzuheben ist, dass die oxidierte und reduzierte 600 kDa-Form (69-86 μM) weitaus höhere K_m -Werte für 1,3bisPGA zeigen, als die oxidierte und die reduzierte 150 kDa-Form (ca. 27 μM). Der K_m -Wert der oxidierten 600 kDa-Form mit 69 μM (s. Tab. 16) ist zwar kleiner als der entsprechende K_m -Wert von >100 μM (s. Tab. 6) der Spinat-GAPDH, kann jedoch als ähnlich eingestuft werden. Darüberhinaus ist der K_m -Wert der reduzierten 600 kDa-Form der NAD(P)(H)-GAPDH aus roter Paprikafrucht (86 μM , s. Tab. 16) identisch mit dem K_m -Wert des Isoenzym aus Spinat (90 μM , s. Tab. 6). Weiterhin ist in Tabelle 16 dargestellt, dass die K_m -Werte der oxidierten und reduzierten tetrameren Form sich nicht unterscheiden (27 bzw.

26 μM). Vergleichbare Affinitäten zeigen die entsprechenden Enzymformen aus Spinat (20 μM , s. Tab. 6).

Tabelle 16: K_m -Werte der bispezifischen NAD(P)(H)-GAPDH aus roten Paprikafruchtplastiden für die Substrate GAP und 1,3bisPGA.

Vorinkubation	Coenzym	K_m -Werte der Enzymformen (μM)	
		GAP ^a	1,3bisPGA ^b
Ohne	NADP(H)	18,4 \pm 3,2	69,02 \pm 18,0
	NAD	9,6 \pm 3,0	n.b.
21 μM 1,3bisPGA	NADP(H)	n.b.	27,99 \pm 7,2
	NAD	28,0 \pm 7,0	n.b.
20 mM DTT _{red}	NADP(H)	n.b.	86,58 \pm 13
	NAD	24,1 \pm 6,4	n.b.
21 μM 1,3bisPGA + 20 mM DTT _{red}	NADP(H)	23,1 \pm 2	26,79 \pm 3,4
	NAD	22,9 \pm 2	n.b.

n.b.: nicht bestimmt

a: mit 400 μM NAD, bzw. NADP als Coenzyme

b: mit 320 μM NADPH

3.14.3. Reinigung rekombinant hergestellter GapCp (Rote Paprikafrucht) aus *E. coli*

In Kapitel 3.12.2. wurde beschrieben, dass in roten Paprikafruchtplastiden zwei Isoenzyme vorkommen. Es handelt sich um die NAD(H)-spezifische GAPDH, bei der es sich möglicherweise um GapCp handelt, und um die bispezifische NAD(P)(H)-GAPDH. Die beiden Isoenzyme konnten erfolgreich voneinander getrennt werden. Weiterhin wurden die K_m -Werte für die Substrate 1,3bisPGA und GAP, sowie für das Coenzym NADH bestimmt.

Die Herstellung roter Paprikafruchtplastiden ist sehr aufwendig und erfordert hohe Mengen von roten Paprikafrüchten. Trotz Bereitstellung großer Mengen der Paprikafruchtplastiden waren diese nicht ausreichend, die NAD(H)-spezifische GAPDH und die bispezifische NAD(P)(H)-GAPDH bis zur Homogenität zu reinigen. Eine vollständige biochemische Charakterisierung (V_{max} -Wert-Bestimmung, bzw. K_m -Wert-Bestimmung für das Coenzym NAD) konnte daher aus Mangel an Material nicht durchgeführt werden. Um zu verifizieren, dass es sich bei der NAD(H)-spezifischen GAPDH in roter Paprikafrucht um GapCp handelt, ist eine Reinigung für eine Ansequenzierung nötig. Aus diesem Grund wurde eine andere Methode gewählt, um die NAD(H)-spezifische GAPDH, bzw. GapCp, in gereinigter Form zu erhalten. GapCp wurde in *E. coli* kloniert, anschließend exprimiert und gereinigt. Die rekombinant hergestellte GapCp wurde biochemisch charakterisiert und ansequenziert.

Die Klonierung der rekombinanten GapCp in *E. coli* wurde von J. Petersen (TU Braunschweig) durchgeführt und ist in PETERSEN (1999) nachzuschlagen. Die Reinigung der GapCp aus *E. coli* erfolgte, wie in Material und Methoden beschrieben, in Zusammenarbeit mit J. Petersen (vgl. Kap. 2.6.). Eine Schwierigkeit während der Reinigung bestand darin, dass *E. coli* außer der in ihr exprimierten GapCp eine eigene GapC besitzt. Es handelt sich

um Gap1. Beide Isoenzyme sind aufgrund der strikt NAD(H)-abhängigen Aktivitäten biochemisch kaum voneinander unterscheidbar. Erstes Ziel der Reinigung war es, die rekombinant hergestellte GapCp von der *E. coli*-eigenen Gap1 zu trennen. Auf die Verwendung einer *E. coli*-GapC-Mutante wurde verzichtet, weil diese als sehr instabil diskutiert wurde (pers. Mitteilung, J. Petersen, TU Braunschweig). Es wurden Kontrollexperimente durchgeführt, um festzustellen, welchen prozentualen Anteil der NADH-abhängigen Aktivitäten die *E. coli*-eigene Gap1 in *E. coli* besitzt, die mit GapCp transformiert wurde. Dafür wurden der *E. coli*-Wildtyp und die transformierte *E. coli*-GapCp mit IPTG induziert und nach 3,5 Stunden die NADH-abhängigen Aktivitäten gemessen. Berechnungen ergaben, dass die GAPDH im *E. coli*-Wildtyp ca. 5-6% der NADH-abhängigen Aktivitäten besitzen, die in der *E. coli*-GapCp-Transformanten gemessen wurden. Es konnte daher davon ausgegangen werden, dass sich nach Induktion der *E. coli*-GapCp Transformanten ca. 5-6% *E. coli*-eigene Gap1 befand. Um die *E. coli*-eigene Gap1 von der transformierten GapCp in dem *E. coli*-GapCp-Transformanten zu trennen, wurde eine Affinitätschromatographie mittels roter Sepharose, eine Anionenaustauschchromatographie mittels Source-15Q und eine Gelfiltration an der Superdex-200 durchgeführt. Auf der roten Sepharose konnten beide Isoenzyme nicht voneinander unterschieden werden, aber sie wurden von Fremdprotein getrennt. Mittels Source-15Q wurden aufgrund der prozentualen Verteilung der Gap1- und GapCp-abhängigen NADH-Aktivitäten, beide Isoenzyme voneinander getrennt. Auf der anschließenden Gelfiltration an der Superdex-200 eluierte die transformierte GapCp in der 150 kDa-Form. Das Elutionsprofil entsprach exakt dem Elutionsprofil, welches die NAD(H)-spezifische GAPDH aus roter Paprikafrucht auf der Superdex-200 zeigte (s. Abb. 38A). Diese Übereinstimmung gibt einen klaren Hinweis darauf, dass es sich bei der untersuchten NAD(H)-spezifischen GAPDH aus roter Paprikafrucht um GapCp handelt. Die rekombinant hergestellte GapCp war nach der Superdex-200 bis zur Homogenität gereinigt, die spezifische Aktivität betrug 50-90 U/mg Protein.

Mit der gereinigten rekombinant hergestellten GapCp aus roter Paprikafrucht wurde eine biochemische Charakterisierung durchgeführt. Die erhaltenen K_m -Werte werden mit den K_m -Wert-Bestimmungen der NAD(H)-spezifischen GAPDH (GapCp) aus roter Paprikafrucht (s. Tab. 15) verglichen.

In Tabelle 17 sind die K_m - und V_{max} -Werte der gereinigten rekombinant hergestellten GapCp aus roter Paprikafrucht aufgeführt.

Tabelle 17: K_m - und V_{max} -Werte der rekombinant hergestellten GapCp aus roten Paprikafruchtplastiden für die Substrate GAP und 1,3bisPGA, sowie für die Coenzyme NAD und NADH.

ohne Vorinkubation	GAP	1,3bisPGA	NAD	NADH
K_m (μM)	$6,13 \pm 0,6^a$	$27,64 \pm 3,8^b$	$56,78 \pm 11,9^c$	$102,7 \pm 7,12^d$
V_{max} (U/mg Protein)	$53,75 \pm 0^{a,c}$	$91,25 \pm 0^{b,d}$	$56,25 \pm 0^{a,c}$	$75,00 \pm 0^{b,d}$

- a: mit 400 μM NAD
 b: mit 320 μM NADH
 c: mit 1 mM FbP
 d: mit 55 μM 1,3bisPGA

Für die Substrate GAP und 1,3bisPGA, sowie für die Coenzyme NAD und NADH sind die jeweiligen K_m - und V_{max} -Werte für die gereinigte rekombinant hergestellte GapCp in der Tabelle 17 zusammengefaßt. Die K_m -Werte für GAP, 1,3bisPGA und NADH sind analog zu den K_m -Werten der NAD(H)-spezifischen GAPDH (GapCp) anzusehen (s. Tab. 15). Der K_m -Wert für NAD beträgt 56 μM und ist dem von MEYER-GAUEN et al. (1998) publizierten Wert von 62 μM identisch. V_{max} wiederum ist in der oxidierenden gemessenen Richtung mit ca. 55 U/mg Protein niedriger als in der reduzierenden gemessenen Richtung mit 75-91 U/mg Protein. Letzterer Wert liegt damit in der gleichen Größenordnung wie der von MEYER-GAUEN et al. (1998) publizierte Wert von 89 U/mg Protein.

3.14.4. Ansequenzierung der rekombinanten GapCp (Rote Paprikafrucht) aus *E. coli*

Zur Verifizierung, dass es sich bei der gereinigten rekombinanten GapCp, die in *E. coli* exprimiert wurde, nicht um die *E. coli*-eigene Gap1 handelt, wurde das Enzym ansequenziert. Die Ansequenzierung wurde freundlicherweise von R. Schmid (Universität Osnabrück) durchgeführt. Die abgeleitete GapCp-Sequenz des cDNA Klons wurde von J. Petersen (TU Braunschweig) zur Verfügung gestellt. Im Vergleich ist die Sequenz der Gap1 aus *E. coli* aufgeführt.

... PIRATATELPPTVPKSQ= <u>TG</u> C KTRVINGFGRI ...	GapCp (abgeleitete Sequenz des cDNA-Klons aus roter Paprikafrucht)
..... M KTRVINGFG.....	GapCp (ansequenziert)
..... M TIKVGINGFG.....	Gap1 (<i>E. coli</i>)

Abbildung 39: Teilsequenzen der rekombinant hergestellten GapCp aus rotem Paprikafruchtstroma (cDNA Klon), der in dieser Arbeit isolierten rekombinanten GapCp aus rotem Paprikafruchtstroma aus *E. coli*, und der Gap1 aus *E. coli*.

Die Sequenz der cDNA von GapCp aus roter Paprikafrucht wurde beidsträngig sequenziert, und die potentielle Schnittstelle (=) der GapCp aus roter Paprikafrucht ist zu der aus *Pinus sylvestris* homolog (pers. Mitteilung, J. Petersen, TU Braunschweig). Aus dem Sequenzvergleich der abgeleiteten Sequenz der GapCp des cDNA Klons und der in dieser Arbeit gereinigten rekombinanten GapCp (rote Paprikafrucht) aus *E. coli* geht hervor, dass die reife Untereinheit der ansequenzierten GapCp statt der drei Aminosäuren **TGG** mit einem Methionin (**M**) beginnt. Jedoch stimmen in beiden Sequenzen die Aminosäuren **KTR** überein. Im Gegensatz dazu befinden sich in dieser Position in *E. coli*-Gap1 die Aminosäuren **TIK**. Die anschließenden Aminosäuren stimmen in allen drei Sequenzen überein (s. Abb. 39).

Aufgrund des in Abbildung 39 gezeigten Sequenzvergleiches wird in dieser Arbeit davon ausgegangen, dass es sich bei der NAD(H)-spezifischen GAPDH und der gereinigten rekombinant hergestellten NAD(H)-abhängigen GAPDH um GapCp handelt.

3.14.5. SDS-Gel zur Größenbestimmung der rekombinanten GapCp (Rote Paprikafrucht) aus *E. coli*

Die gereinigte rekombinant hergestellte GapCp aus roter Paprikafrucht wurde im Vergleich mit angereicherter *E. coli*-Gap1 auf ein SDS-Gel aufgetragen.

Aus Abbildung 40 ist ersichtlich, dass die gereinigte rekombinant hergestellte GapCp aus roter Paprikafrucht auf dem SDS-Gel ein Molekulargewicht von 36 kDa aufweist. Das Molekulargewicht entspricht einer 36 kDa-Bande der angereicherten *E. coli*-Gap1. Weiterhin

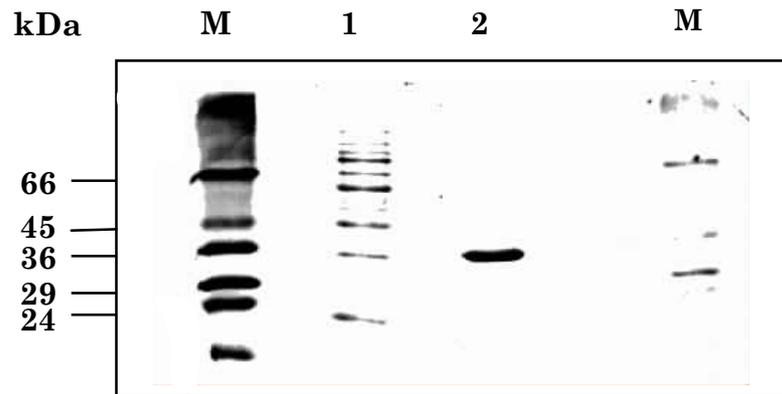
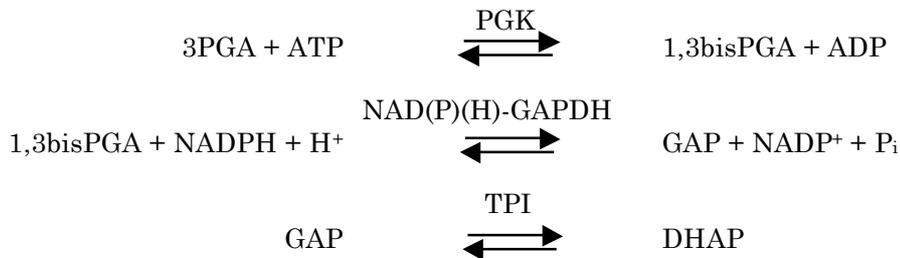


Abbildung 40: Größenbestimmung der *in E. coli* exprimierten GapCp aus roter Paprikafrucht im Vergleich zur angereicherten *E. coli*-Gap1. M) Molekulargewichtsstandard. Spuren 1) Angereicherte *E. coli*-Gap1 (nach roter Sepharose), 2) gereinigte rekombinant hergestellte GapCp in *E. coli* aus roter Paprikafrucht. In der Spur 1) wurden 10 µg, in der Spur 2) 16 µg Protein aufgetragen. Die Größen der Molekulargewichtsstandards (kDa) sind angegeben.

stimmt das Molekulargewicht mit dem von GapCp aus *Pinus sylvestris* publizierten Wert von 37 kDa überein (MEYER-GAUEN et al. 1998).

4. Diskussion

Orte der Photosynthese sind die Chloroplasten. Energiequelle ist das Licht, Elektronen werden als NADPH angeliefert und von der NAD(P)(H)-GAPDH zur Synthese von Triosephosphaten aus 1,3bisPGA genutzt. Die Reduktion von 3PGA zu Triosephosphaten ist eine Schlüsselreaktion des Calvin-Cyclus und verbraucht den größten Teil der durch das Licht in Form von ATP und NADPH bereitgestellten Energie, wobei ADP, NADP und P_i regeneriert werden. Hierbei laufen drei Reaktionen ab:



Für die durch die PGK und TPI katalysierten Reaktionen sind keine Einschränkungen durch eine Regulation der Enzymaktivitäten oder durch limitierende Kapazitäten bekannt. Aber die Aktivität der NAD(P)(H)-GAPDH könnte einen potentiellen limitierenden Schritt in der Photosynthese darstellen. Dies geht einerseits aus Versuchen mit transgenen Tabakpflanzen (*antisense* GapA) hervor, in denen schon kleinste Einschränkungen der NAD(P)(H)-GAPDH-Aktivitäten zu einer Störung der RuBP-Regeneration führten (PRICE et al. 1995), während andererseits Einschränkungen der Aktivitäten der RubisCO, FBPase oder PRK in anderen transgenen Pflanzen zu keinen Limitierungen führten. Weiterhin konnte an isolierten Chloroplasten gezeigt werden, dass ein hoher Anteil von 3PGA (1/3 des gesamten fixierten Kohlenstoffs) aus dem Stroma exportiert werden, auch wenn keine CO_2 -Limitierungen vorlagen (HOLTGREFE et al. 1997). Diese Beobachtung kann mathematisch dadurch erklärt werden, dass man annimmt, dass an dieser Stelle des Calvin-Cyclus kein thermodynamisches Gleichgewicht herrscht (FRIDLAND et al. 1997).

Die durch die NAD(P)(H)-GAPDH-Reaktion entstehenden Triosephosphate werden entweder ins Cytosol exportiert oder werden während der Lichtperiode in Form von transitorischer Stärke im Chloroplasten gespeichert. In der Dunkelphase wird die transitorische Stärke dann wiederum in freie Hexosen oder Triosephosphate metabolisiert. Somit laufen im Chloroplasten im Licht und im Dunkel zwei gegenläufige Stoffwechselwege ab. Damit es nicht zu einem *futile cycle* kommt, müssen die sogenannten 'Lichtenzyme' im Dunkel inaktiviert werden, oder es werden zwei Enzyme benötigt, die eine Reaktion gegenläufig katalysieren, wobei auch unterschiedliche Coenzyme nötig sind. Ein Beispiel dafür sind FBPase und PFK (HOLTGREFE et al. 1997).

Eine Ausnahme sind die drei Enzyme TPI, NAD(P)(H)-GAPDH und PGK, die die zur Metabolisierung von Triosephosphaten benötigten Reaktionen im Dunkel katalysieren. Hier handelt es sich um die selben Enzyme, die im Lichtstoffwechsel aktiv sind. Um diesen unterschiedlichen Anforderungen im Licht und im Dunkel gerecht zu werden, muß NAD(P)(H)-GAPDH ihre Eigenschaften vollkommen ändern, denn im Licht muß sie 1,3bisPGA mit NADPH reduzieren, im Dunkel dagegen GAP mit NAD oxidieren. Bislang gibt es keine Hinweise, dass ein anderes Isoenzym als die $(\text{A}_2\text{B}_2)_4$ -Form der NAD(P)(H)-GAPDH in Chloroplasten die gegenläufige Funktion im Dunkeln übernimmt.

4.1. Reduktive und metabolische Aktivatoren der NAD(P)(H)-GAPDH

Die Aktivierung eines Enzyms durch Belichtung wurde erstmals von ZIEGLER & ZIEGLER (1965) an chloroplastidärer NAD(P)(H)-abhängiger GAPDH nachgewiesen. Sie vermuteten anfangs, dass die NAD(P)(H)-GAPDH *de-novo* synthetisiert wird. Zwei Jahre später wurde von den selben Autoren eine lichtinduzierte posttranslationale Modifikation vorgeschlagen (ZIEGLER & ZIEGLER 1967a). MÜLLER et al. (1969) erreichten durch Zugabe von DTT_{red} zum Chloroplastenhomogenisat nur eine geringfügige Aktivitätssteigerung. Mit NADPH und gleichzeitiger Inkubation mit DTT_{red} erzielten sie ähnlich hohe Aktivitäten wie durch Belichtung allein. Sie vermuteten daher, dass durch Reduktion während der Versuchsdurchführung aufgetretene Schädigungen der SH-Gruppen repariert wurden.

Aktivitätssteigerungen konnten ebenfalls durch 4-8 mM ATP, 3 mM NADP und 3 mM NADPH erzielt werden. Versuche zur Aktivierung mit 3PGA, ADP und GAP verliefen negativ. PUPILLO & GIULIANI PICCARI (1975) und WOLOSUIK & BUCHANAN (1976) bestätigten die Aktivierungen durch die Metabolite ATP und NADPH. Als weitere positive Effektoren wurden Cholat (SCHWARZ 1974), XTP, ITP und GTP (PUPILLO & GIULIANI PICCARI 1975) nachgewiesen. Eine Aktivierung konnte außerdem durch chaotrope Anionen (WOLOSUIK & STEIN 1990) und durch hohen hydrostatischen Druck (PRAT-GAY et al. 1991) erreicht werden. Mittels Gelfiltration konnte an gereinigter, mit 0,03 mM NADP inkubierter NAD(P)(H)-GAPDH erstmals von PUPILLO & GIULIANI PICCARI (1973) eine Dissoziation der 600 kDa-Form in die 150 kDa-Form gezeigt werden. Die Aktivität der tetrameren Form stieg und der K_m -Wert für NADP sank von 1-3 mM auf 0,01 mM (PUPILLO & GIULIANI PICCARI 1975). Eine Aktivierung mit einhergehender Dissoziation wurde ebenfalls durch 1,5 mM NADPH und 10 mM ATP erzielt, während zu 20 mM DTT_{red} NADP zugegeben werden mußte, um diesen Effekt zu erzielen. Eine Reassoziations zum Hexadecamer wurde durch Zugabe von NAD, NADH und GAP erreicht (PUPILLO & GIULIANI PICCARI 1975). Diese Dissoziationen und Reassoziations wurden mittels Saccharosedichtegradienten-Zentrifugation nachgewiesen. WOLOSUIK & BUCHANAN (1976) und FERRI et al. (1978) zeigten ebenfalls für das Spinat-Enzym die gleichzeitige Dissoziation während der Aktivierung. PAWLIZKI & LATZKO (1974) nahmen nach durchgeführten Versuchen, in denen sie jedoch andere Molekulargewichte (240 kDa und 79 kDa) für das Spinat-Enzym erhielten, an, dass der Aktivierungsmechanismus eine Dissoziation infolge der Lichtaktivierung sei.

Dissoziation und erhöhte Präferenz gegenüber NADP zeigten MCGOWAN & GIBBS (1974) für Erbsen-NAD(P)(H)-GAPDH. Auch eine Reassoziations durch GAP und NAD konnte von SCHWARZ et al. (1976) für die NAD(P)(H)-GAPDH aus Erbse nachgewiesen werden. CERFF (1978a/b) zeigte in ähnlichen Studien an Senf, Spinat, Erbse und Gerste (CERFF 1979) das Dissoziieren der NAD(P)(H)-GAPDH während der Aktivierung. PUPILLO & FAGGIANI (1979) konnten die hochmolekulare Form (800 kDa) der NAD(P)(H)-GAPDH aus *Beta vulgaris*, *Pisum sativum*, *Ranunculus ficaria*, *Arum italicum* und *Zea mays* durch NADP in eine 160 kDa-Form überführen.

Auch für das Substrat 1,3bisPGA ist die Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH beschrieben. NAD(P)(H)-GAPDH aus der Alge *Scenedesmus obliquus* dissoziierte durch Inkubation mit einem 1,3bisPGA-generating-system, und die Aktivität stieg (O'BRIEN & POWLS 1976, O'BRIEN et al. 1977). Sie verwendeten 41 µM 1,3bisPGA, jedoch nur in Kombination mit Cystein oder NADPH, NADP oder ATP. Die NADPH-abhängige Aktivität stieg, während die NADH-abhängige Aktivität sich kaum änderte. Die Dissoziationskonstante, die für den 1,3bisPGA-Komplex bestimmt wurde, war mit dem K_m -Wert für 1,3bisPGA identisch. Daraus wurde gefolgert, dass die Bindung von 1,3bisPGA im aktiven Zentrum für die Veränderung der Spezifität der Nucleotide verantwortlich ist. Die Dissoziation der NAD(P)(H)-GAPDH, hervorgerufen durch 1,3bisPGA, konnte durch Inkubation bei

Raumtemperatur für zwölf Stunden rückgängig gemacht werden, was bei der Dissoziation durch DTT_{red} oder NADPH nicht möglich war.

Das 1,3bisPGA-*generating-system* wurde auch von WOLOSUIK et al. (1986) verwendet, und die Aktivierung und Dissoziation durch Einsatz von gereinigtem 1,3bisPGA konnte von TROST et al. (1993) bestätigt werden. Sie ermittelten einen K_G -Wert von 12 μ M 1,3bisPGA für die Aktivierung der Spinat-NAD(P)(H)-GAPDH. Maximale Aktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH wurden von WOODROW et al. (1979) nur erzielt, wenn mit DTT_{red} in Kombination mit 1,3bisPGA oder NADPH inkubiert wurde.

Eine reduktive Aktivierung wurde in ersten Versuchen von MÜLLER et al. (1969), jedoch mit NADPH, welches durch die photosynthetischen Lichtreaktionen gebildet wird, in Betracht gezogen. Eine Redoxmodulation für die NAD(P)(H)-GAPDH konnte nach Aufklärung der Reduktion von Disulfidbrücken von BUCHANAN et al. (1978) bestätigt werden. Die Reduktion des gereinigten Enzyms mittels DTT_{red} allein führte in einigen Fällen auch zur Dissoziation. Allerdings traten nach mehrstündiger Inkubation mit DTT_{red} starke Aktivitätsverluste auf (O'BRIEN et al. 1977). PUPILLO & GIULIANI PICCARI (1975) hingegen beschrieben, dass DTT_{red} ein Dissoziieren der NAD(P)(H)-GAPDH durch Metabolite fördert. Hinweise für die Beteiligung von Cystein-Resten an der Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH wurden von ZAPPONI et al. (1983) und FERRI et al. (1987) erhalten. Unklar bleibt, ob das Cystein im aktiven Zentrum oder andere Cysteine reduziert werden, und ob die Reduktion mit den anderen genannten Effektoren zusammenspielt.

Chloroplastidäre NAD(P)(H)-GAPDH unterscheidet sich in einigen Merkmalen von anderen Enzymen des Calvin-Cyclus. Es kommt in zwei unterschiedlichen Molekulargewichtsformen vor, kann reduziert oder oxidiert vorliegen, und es weist eine heteromere Struktur auf, die sich wiederum von den Isoenzymen der NAD(P)(H)-GAPDH unterscheidet. Eine Besonderheit ist vor allem die CTE, die in den cytosolischen NAD(H)-GAPDH-Isoenzymen und in Blau-, Rot- und Grünalgen nicht vorkommt.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Versuche wurden durchgeführt, um die Regulation der NAD(P)(H)-GAPDH in Spinat in physiologischer und struktureller Hinsicht aufzuklären. Es wurden folgende Ansätze gewählt.

- Isolierte intakte Spinat-Chloroplasten
- Isolierte NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat
- Limitierte Proteolyse isolierter NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat
- Herstellung rekombinanter NAD(P)(H)-GAPDH-Formen: GapA^M, GapB^M, GapB^MΔC, GapA^MB^M, GapA^MB^MΔC
- GapCp roter Paprikafruchtplastiden

Zur Regulation der chloroplastidären NAD(P)(H)-GAPDH in höheren Pflanzen und in Blau-, Rot- und Grünalgen wurden von den in Kapitel 4.1. genannten Autoren intensive Studien durchgeführt: Übereinstimmend wurde diskutiert, dass die Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH durch Reduktion des isolierten Enzyms, durch Belichtung des intakten Chloroplasten und durch metabolische Effektoren wie NADPH, NADP, ATP und 1,3bisPGA initiiert wird. Die Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH beinhaltet *in vivo* und *in vitro* die gleichzeitige Dissoziation des Enzyms in eine nieder-molekulare Form.

4.1.1. Reduktive und metabolische Aktivatoren der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat *in vivo*

Um die Aktivierungseffekte durch Reduktion und durch Metabolite voneinander zu trennen, wurden in dieser Arbeit Versuche mit dem System 'isolierte Chloroplasten' und dem System 'isoliertes Enzym' durchgeführt. Das System 'isolierte Chloroplasten' bietet den Vorteil, das Aktivierungsverhalten der NAD(P)(H) *in vivo* zu untersuchen. Durch Belichtung und/oder Zugabe verschiedener Effektoren von außen zu intakten Chloroplasten kann die metabolische und die Redox-Situation innerhalb des Plastiden manipuliert und die Auswirkungen auf die Regulation der NAD(P)(H)-GAPDH gemessen werden.

Zunächst wurden Versuche mit belichteten Chloroplasten durchgeführt. Nach Einschalten des Lichts erfolgt in Chloroplasten innerhalb von wenigen Sekunden eine Reduktion der Elektronenakzeptoren im Stroma (FOYER et al. 1992, TAKAHAMA et al. 1981). Die NAD(P)(H)-GAPDH-Aktivitäten steigen innerhalb von 30 Sekunden auf ca. 60%. Die Maximalaktivität von ca. $600 \mu\text{mol (mg Chl)}^{-1} \text{h}^{-1}$ wird aber erst nach fünf Minuten erreicht (s. Abb. 7). Diese zeitverzögerte Aktivierung deutet darauf hin, dass die Aktivierung nicht allein durch Reduktion, sondern ebenfalls durch sich in diesem Zeitraum bildende Metabolite erreicht wird. Tatsächlich wird bei Belichtung nicht nur der Elektronendruck geändert; nach zwei bis drei Minuten steigen die stromalen Effektor-Konzentrationen von ATP und 3PGA, wodurch höhere Konzentrationen des Substrats und gleichzeitigen Effektors 1,3bisPGA eingestellt werden (s. Abb. 8). Ein weiterer Hinweis, dass die NADPH-GAPDH-Aktivierung durch ein Zusammenspiel von Reduktion und Metaboliteneffekt eingestellt wird, zeigt die Zugabe von ATP zu belichteten Plastiden. Als Folge wird die Aktivität der NAD(P)(H)-GAPDH von $600 \mu\text{mol (mg Chl)}^{-1} \text{h}^{-1}$ auf maximale Aktivitäten von ca. $1000\text{--}1200 \mu\text{mol (mg Chl)}^{-1} \text{h}^{-1}$ erhöht (s. Abb. 7). Die Aufnahme von ATP in den belichteten Chloroplasten erfolgt sehr wahrscheinlich über einen Adeninnucleotid-Translokator (HELDT 1969), dessen Kapazität *in vivo* nicht bekannt ist. Jedoch resultiert die Zugabe von ATP zu intakten Chloroplasten in steigenden NADPH-abhängigen Aktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH (s. Abb. 7).

Aus den Versuchen mit belichteten Chloroplasten geht nicht hervor, ob ATP oder 1,3bisPGA als Effektor fungieren. Ein Hinweis, dass es sich bei dem Effektor um 1,3bisPGA handelt, ergibt sich jedoch aus der Berechnung der 1,3bisPGA-Konzentrationen in belichteten Chloroplasten. Sie wurden aus endogenen ATP-, ADP- und 3PGA-Konzentrationen im belichteten Chloroplasten mittels der Gleichgewichtskonstanten der PGK ermittelt (s. Abb. 8). Die Reaktion der PGK liegt nahe am thermodynamischen Gleichgewicht und setzt jeweils äquivalente Mengen an PGA und ATP um, d.h. dass die Rate der 1,3bisPGA-Produktion dem Verhältnis $[\text{ATP}] \times [\text{3PGA}]/[\text{ADP}]$ proportional ist (ROBINSON & WALKER 1979). Die in den ersten ca. drei Minuten geringen 3PGA-Konzentrationen werden durch die anfänglich steigenden ATP-Konzentrationen kompensiert, so dass für einen kontinuierlich steigenden Pool an 1,3bisPGA gesorgt ist. Ein Vergleich des Anstiegs der NAD(P)(H)-GAPDH-Aktivität während der Belichtung (s. Abb. 7) zeigt, dass sie mit dem Anstieg der errechneten 1,3bisPGA-Konzentration (s. Abb. 8) und nicht mit den gemessenen ATP-Konzentrationen korreliert. Ein weiterer Versuch unterstützt die Auffassung, dass ATP als Effektor der NAD(P)(H)-GAPDH *in vivo* ausscheidet. Zugabe limitierender bzw. hoher Phosphatkonzentrationen zu belichteten Chloroplasten führt zu veränderten 3PGA- und ATP-Konzentrationen im Plastiden, wodurch wiederum unterschiedliche 1,3bisPGA-Konzentrationen eingestellt wurden (s. Tab. 5). Anorganisches Phosphat wird im Gegentausch mit Triosephosphaten und 3PGA über den Phosphat-Translokator in den Chloroplasten importiert. Durch eine suboptimale P_i -Konzentration von $0,02 \text{ mM}$ stellt sich

ein geringes ATP/ADP-Verhältnis im Chloroplasten ein, während die 3PGA-Konzentration erhöht wird (2,7 mM). Eine optimale P_i -Konzentration von 0,2 mM bewirkt dagegen, dass der ATP-Gehalt erhöht wird, während der 3PGA-Gehalt sinkt. Hohe P_i -Konzentrationen von 2 mM resultieren in sehr geringen 3PGA-Gehalten aber steigenden ATP/ADP-Verhältnissen. Durch diese Manipulationen der ATP-, ADP- und 3PGA-Konzentrationen im belichteten Chloroplasten verändert sich die errechnete 1,3bisPGA-Konzentration jedoch kaum. Die jeweiligen Aktivierungszustände der NAD(P)(H)-GAPDH verbleiben als Konsequenz ebenfalls ähnlich. Aus den Versuchen ergibt sich ein weiterer Hinweis, dass ATP kein Effektor der NAD(P)(H)-GAPDH in intakten Chloroplasten ist. Im Gegensatz zu ATP ist die auftretende NAD(P)(H)-GAPDH-Aktivität an die jeweilige 1,3bisPGA-Konzentration gekoppelt (s. Tab. 5).

Das System 'isolierte Chloroplasten' bietet weiterhin die Möglichkeit, den Aggregationszustand der NAD(P)(H)-GAPDH zu untersuchen. Dazu wurden Experimente mit der Gelfiltrationssäule Superdex-200 durchgeführt. Der Hersteller garantiert eine Auflösung der Molekulargewichtsbereiche zwischen 10 und 600 kDa (PHARMACIA 1998). Ein für Spinat-Chloroplasten charakteristisches Protein-Elutionsprofil zeigt die Abbildung 9. Im Ausschlußvolumen bei 45 ml eluierten das gesamte Chlorophyll und Tritonvesikel. Die NAD(P)(H)-GAPDH in der 600 kDa-Form eluierte bei 53 ml (s. Abb. 11), und die RubisCO mit 550 kDa, welche den Hauptproteingehalt im Chloroplasten ausmacht, bei 57 ml (s. Abb. 9).

Bei Belichtung korreliert die Aktivitätssteigerung der NAD(P)(H)-GAPDH ($600 \mu\text{mol (mg Chl)}^{-1} \text{h}^{-1}$, s. Abb. 7) mit einer 50%igen Dissoziation des Enzyms von der 600 kDa-Form in die 150 kDa-Form (s. Abb. 11A). Durch Zugabe von DTT_{red} im Standard-Enzymtest fand in der 600 kDa-Form der GAPDH eine weitere Aktivitätssteigerung von ca. $300 \mu\text{mol (mg Chl)}^{-1} \text{h}^{-1}$ auf ca. $600 \mu\text{mol (mg Chl)}^{-1} \text{h}^{-1}$ statt, während die 150 kDa-Form nicht weiterhin aktiviert werden konnte (s. Abb. 11A). Welche Rolle ATP bei der Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH spielt, geht deutlich aus Abbildung 11B hervor. Durch Zugabe von ATP zu belichteten Chloroplasten wird die 600 kDa-Form der NAD(P)(H)-GAPDH vollständig in die 150 kDa-Form überführt. Dies resultiert, wie schon oben beschrieben, sehr wahrscheinlich aus den angestiegenen 1,3bisPGA-Konzentrationen im Stroma.

Zur Untersuchung der Regulation der NAD(P)(H)-GAPDH *in vivo* wurden weiterhin Dunkel-adaptierte Spinatchloroplasten verwendet. Ein Schwerpunkt dieser Arbeit ist, zu untersuchen, welche Rolle 1,3bisPGA bei der Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH *in vivo* spielt und ob ein Zusammenspiel zwischen Reduktion und Metaboliteffekt besteht. Dunkel-adaptierte Chloroplasten sind unter diesem Gesichtspunkt relativ gut geeignet, um zwischen Reduktion und Metaboliteffekt zu unterscheiden, denn anders als bei belichteten Chloroplasten kann die Reduktion der NAD(P)(H)-GAPDH gezielt durch Zugabe von DTT_{red} zu isolierten Chloroplasten erreicht werden, ohne dass sich die Konzentrationen der Effektoren ATP, NADPH, NADP und 1,3bisPGA im Stroma verändern. Darüberhinaus können durch Zugabe von ATP und 3PGA zum Dunkel-adaptierten Chloroplasten endogen verschiedene 1,3bisPGA-Konzentrationen eingestellt werden. Die Aktivität der PGK reicht auch in Chloroplasten im Dunkeln aus, um das Verhältnis ATP/ADP und 3PGA zu 1,3bisPGA einzustellen (EDWARDS & WALKER 1983). TROST et al. (1993) verwendeten gereinigte 1,3bisPGA bei Versuchen mit isolierter NAD(P)(H)-GAPDH, jedoch ist die Zugabe von 1,3bisPGA in dieser Form zu Chloroplasten nicht möglich, da es wahrscheinlich nicht durch die Envelope-Membran transportiert wird. Für den Import von 3PGA wurde ein Phosphat-Translokator beschrieben (HELDT & RAPLEY 1970).

In Dunkel-gehaltenen Chloroplasten besitzt die NAD(P)(H)-GAPDH eine Grundaktivität von ca. $200 \mu\text{mol (mg Chl)}^{-1} \text{h}^{-1}$ (s. Abb. 6, 7). Durch Reduktion, d.h. Zugabe von DTT_{red} , steigt die

Aktivität auf ca. $600 \mu\text{mol (mg Chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (s. Abb. 6) an. Die Grundaktivität der NAD(P)(H)-GAPDH wird jedoch nur durch unphysiologisch hohe Konzentration von 1,3bisPGA im Standard-Enzymtest erreicht. Eine Aktivität der 600 kDa-Form der NAD(P)(H)-GAPDH im oxidierten und reduzierten Zustand wird daher nur vorgetäuscht (vgl. Text zu Tab. 20). Zugabe von 5 mM 3PGA und 2 mM ATP resultiert im Stroma dunkler Chloroplasten in einer 1,3bisPGA-Konzentration von $55,6 \mu\text{M}$. Die NADPH-GAPDH zeigt unter diesen Bedingungen eine Aktivitätssteigerung auf ca. $800 \mu\text{mol (mg Chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, s. Abb. 6). Maximale Aktivitäten werden jedoch nur erreicht, wenn das Enzym gleichzeitig reduziert wurde und im Plastiden eine 1,3bisPGA-Konzentration von $55,6 \mu\text{M}$ vorlag (ca. $1000 \mu\text{mol (mg Chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, s. Abb. 6). Diese mit Dunkel-adaptierten Spinat-Chloroplasten durchgeführten Versuche zeigen, dass bei der Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH ein Zusammenspiel zwischen Reduktion und sehr wahrscheinlich 1,3bisPGA stattfindet. Jedoch erfolgt eine Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH in Dunkel-gehaltenen Chloroplasten ebenfalls durch alleinige Zugabe von ATP (ca. $400 \mu\text{mol (mg Chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$, s. Abb. 7). Um den Effekt von Reduktion und Effektoren weiterhin zu untersuchen, wurden die Aggregationszustände der NAD(P)(H)-GAPDH in Chloroplasten im Dunkeln bestimmt.

In Dunkel-adaptierten Chloroplasten ist NAD(P)(H)-GAPDH 600 kDa groß. Je nach Präparation, bei deren Versuchsbedingungen nicht völlig auszuschließen war, dass die Chloroplasten kurzzeitig schwach belichtet wurden, erscheint ein kleiner zusätzlicher Peak in der 300 kDa- (s. Abb. 10A) oder in der 150 kDa-Form (s. Tab. 5). Die Zugabe von 10 mM DTT_{red} gibt ein vergleichbares Bild. Eine Dissoziation findet nicht statt, wie sie im Gegensatz von O'BRIEN et al. (1977) beschrieben wurde (s. Abb. 10B). Bei moderaten Konzentrationen von $11 \mu\text{M}$ 1,3bisPGA dissoziiert die NAD(P)(H)-GAPDH zu ca. 50% in die 150 kDa-Form (s. Abb. 10C). Durch Zugabe von sehr hohen 1,3bisPGA-Konzentrationen ($55,6 \mu\text{M}$) wird die NAD(P)(H)-GAPDH vollständig in die 150 kDa-Form überführt (s. Abb. 10D). Das Auftreten von ausschließlich 150 kDa-GAPDH ist jedoch als artifiziell anzusehen und kommt *in vivo* nicht vor. Der Grund liegt darin, dass bei Belichtung die NAD(P)(H)-GAPDH nie vollständig dissoziiert, sondern lediglich zu ca. 50% (s. Abb. 11A). Durch Zugabe optimaler Konzentrationen von P_i (0,2 mM) zu belichteten isolierten Chloroplasten bleiben 68% in der 600 kDa-Form (s. Tab. 5). Es ist aber nicht auszuschließen, dass die Rate der Dissoziation in Blättern anders ist.

4.1.2. Reduktive und metabolische Aktivatoren der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat *in vitro*

In Kapitel 4.1.1. wurde im System 'isolierte Chloroplasten' untersucht, wie das Prinzip der Regulation der NAD(P)(H)-GAPDH *in vivo* funktioniert. Es ergaben sich wertvolle Hinweise über Aktivitätssteigerungen, die möglicherweise durch ein Zusammenspiel von Reduktion und 1,3bisPGA stattfinden und über die jeweiligen Aggregationszustände. Jedoch gibt es in diesem System deutliche Limitierungen, was die Analyse bestimmter Effektoren angeht. So ändert sich bei Belichtung nicht nur der Redoxstatus im Chloroplasten, gleichzeitig werden die Konzentrationen verschiedener Effektoren der NAD(P)(H)-GAPDH (ATP, 1,3bisPGA, NADPH) erhöht. Weiterhin kann in belichteten und Dunkel-adaptierten Chloroplasten nicht gezielt zwischen den Effekten von ATP und 1,3bisPGA unterschieden werden. Darüberhinaus kann eine Analyse des Effektes von NADPH und NADP nicht untersucht werden, da NADPH und NADP nicht durch die Envelope-Membran von Chloroplasten transportiert werden. Aus diesem Grunde wurden weitere Untersuchungen mit isolierter NAD(P)(H)-GAPDH durchgeführt, da dieses System, was die Analyse einzelner Effektoren angeht, dem System 'isolierte Chloroplasten' in dieser Hinsicht überlegen ist. Es kann gezielt zwischen Reduktion und Metaboliteneffekten von ATP, 1,3bisPGA, NADP und NADPH unterschieden werden.

Um Fehler bei der Bestimmung der NAD(P)(H)-GAPDH-Aktivitäten in isolierten Chloroplasten und als isoliertes Enzym auszuschließen, ist es zunächst wichtig, wie der Standard-Enzymtest angewandt wird (s. Abb. 12). Denn die beiden metabolischen Effektoren 1,3bisPGA und NADPH sind als Substrate Bestandteil des Enzymtests und können während des Testverlaufs die NAD(P)(H)-GAPDH aktivieren. Außerdem wurde der Standard-Enzymtest (CERFF 1982) verändert, indem auf die Zugabe von DTT_{red} verzichtet wurde. Durch Reduktion der NAD(P)(H)-GAPDH wird ebenfalls eine erhöhte Aktivität vorgetäuscht, da reduzierte NAD(P)(H)-GAPDH nur geringe Konzentrationen 1,3bisPGA benötigt, um aktiviert zu werden. Zur Vermeidung von Meßartefakten wurde 1,3bisPGA in der Küvette vorsynthetisiert und der Enzym-Test mit den entsprechenden Isoenzymen der NAD(P)(H)-GAPDH gestartet. In Messungen mit NADH als Coenzym ist ein Meßfehler ausgeschlossen, da NADH die NAD(P)(H)-GAPDH nicht aktiviert. Durch NADH reaggregiert die NAD(P)(H)-GAPDH. Im Enzymtest findet eine Aggregation allerdings mit großer Wahrscheinlichkeit nicht statt, weil er hohe Konzentrationen von 1,3bisPGA und niedrige Enzymkonzentrationen enthält.

Ein weiterer Fehler der Bestimmung der Enzymaktivitäten kann durch die Verwendung zu geringer oder zu hoher Proteinkonzentrationen auftreten. Daher wurde in Vorinkubationsansätzen darauf geachtet, dass NAD(P)(H)-GAPDH in einer Konzentration von 60 µg/ml vorlag. Eine geringere Proteinkonzentration, also eine Verdünnung, führt vielfach zu unkontrollierten Dissoziationen der NAD(P)(H)-GAPDH, was durch Anwesenheit eines Reduktanden noch erleichtert wird, während eine zu hohe Proteinkonzentration dazu führt, dass die NAD(P)(H)-GAPDH selbst durch hohe Effektorkonzentrationen nicht mehr oder nur mäßig aktiviert werden kann (RAK 1996, REICHERT et al. 2000). In von RAK (1996) und REICHERT et al. (2000) durchgeführten Experimenten wurden vier verschiedene NAD(P)(H)-GAPDH-Konzentrationen (0,8; 8; 80 und 800 µg/ml) gewählt, da beschrieben wurde, dass die Protein-Konzentrationen im Chloroplastenstroma extrem hoch sind (300-400 mg/ml Protein) (WALKER et al. 1986). Unter der Annahme, dass die Grundaktivität der NAD(P)(H)-GAPDH mit NADPH als Coenzym 10-20 U/mg Protein und 200 µmol (mg Chl)⁻¹ h⁻¹ beträgt, muß die NAD(P)(H)-GAPDH-Konzentration im Stroma *in vivo* ungefähr 1-3 mg/ml betragen. Das sind ca. 1% des Chloroplastenproteingehalts. Es zeigte sich, dass mit steigender Proteinkonzentration eine Aktivierung des Enzyms durch DTT_{red} und 1,3bisPGA erschwert ist. Die in dieser Arbeit verwendete NAD(P)(H)-GAPDH-Konzentration von 60 µg/ml reicht für eine Aktivierung durch die beiden Effektoren aus. Bei einer Proteinkonzentration von 800 µg/ml konnte die Vollaktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH nicht erreicht werden. Die Zugabe von KCl führte zu einer erleichterten Aktivierung, wobei darauf hingewiesen werden muß, dass erst die weitere Zugabe von Thioredoxin_f und Fremdprotein in hohen Mengen (z.B. BSA und Katalase) zu einer erhöhten Rate der NADPH-GAPDH-Aktivität führten (RAK 1996, REICHERT et al. 2000).

Ergebnisse in Publikationen anderer Autoren, die Versuche mit NAD(P)(H)-GAPDH durchführten, sind daher auch unter dem Aspekt der gewählten Versuchsbedingungen und Proteinkonzentrationen zu bewerten.

Die isolierte NAD(P)(H)-GAPDH wurde separat mit verschiedenen Metaboliten und Reduktanden oder in Kombination miteinander inkubiert, um zwischen dem Effekt der Reduktion und dem Metaboliteneffekt, insbesondere ATP und 1,3bisPGA, unterscheiden zu können. Durch Reduktion mit DTT_{red}, Thioredoxin_f oder GSH fanden nur geringe Aktivitätssteigerungen statt; die Grundaktivität von ca. 10 U/mg Protein wurde etwa verdoppelt (s. Abb. 13, 14). Im Vergleich dazu führte die Belichtung des isolierten Chloroplasten zu einer dreifachen Aktivitätssteigerung der NAD(P)(H)-GAPDH von ca. 200 µmol (mg Chl)⁻¹ h⁻¹ auf ca. 600 µmol (mg Chl)⁻¹ h⁻¹ (s. Abb. 7), wobei aber in isolierten

Chloroplasten bei Belichtung außer der Reduktion des Enzyms ebenfalls der ATP- und 3PGA-Gehalt steigt. Das Molekulargewicht der intakten isolierten NAD(P)(H)-GAPDH von 600 kDa bleibt durch Reduktion mit 20 mM DTT_{red} unverändert (s. Abb. 17B). Dies steht in Kontrast zu Ergebnissen von TROST et al. (1993), die durch DTT_{red} eine Zerlegung der 600 kDa-Form in die Monomere mit 9% der Ausgangsaktivität gefunden haben. Das Ergebnis steht jedoch im Einklang mit Versuchen an isolierten intakten Chloroplasten. Die hexadecamere oxidierte Form der NAD(P)(H)-GAPDH wird im Chloroplasten durch Zugabe von 10 mM DTT_{red} nicht dissoziiert (s. Abb. 10).

Wenn statt Reduktionsmittel steigende Konzentrationen von 1,3bisPGA (10 und 50 µM) verwendet wurden, wurden die Aktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH fortlaufend gesteigert (40 und 80 U/mg Protein) (s. Abb. 13, 14). Auch TROST et al. (1993) konnten durch Inkubation mit gereinigter 1,3bisPGA oder einem 1,3bisPGA-generating system (O'BRIEN & POWLS 1976, O'BRIEN et al. 1977, WOLOSUK et al. 1986) eine Aktivitätssteigerung der NAD(P)(H)-GAPDH feststellen. Der Effekt der Steigerung der Aktivitäten durch 1,3bisPGA konnte auch im isolierten Plastiden beobachtet werden. Zugabe steigender Konzentrationen von ATP und 3PGA zu Dunkel-adaptierten Chloroplasten, die in steigenden endogenen 1,3bisPGA-Konzentrationen resultierten, führten ebenfalls zu einer Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH (s. Abb. 7).

Um zu untersuchen, ob ein Zusammenspiel zwischen Reduktion und Metaboliteneffekt stattfindet, wurde isolierte NAD(P)(H)-GAPDH gleichzeitig mit verschiedenen Reduktionsmitteln (DTT_{red}, Thioredoxin_f, GSH) und 1,3bisPGA inkubiert. Unter diesen Bedingungen wurden maximale Aktivitäten von 80-100 U/mg Protein erzielt (s. Abb. 13, 14). Der Versuch zeigt, dass Reduktion und Inkubation mit 1,3bisPGA additiv auf die Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH wirken. Dieser Befund zeigt sich auch in einem Versuch mit belichteten Chloroplasten. Durch Zugabe von ATP werden maximale Aktivitäten von ca. 1000 µmol (mg Chl)⁻¹ h⁻¹ erzielt (s. Abb. 7). Außerdem wird die Aktivität der NAD(P)(H)-GAPDH in mit ATP inkubierten, Dunkel-adaptierten Chloroplasten durch Belichtung auf maximale Aktivitäten von 1200 µmol (mg Chl)⁻¹ h⁻¹ gesteigert (s. Abb. 7).

Infolge der kombinierten Inkubation des isolierten Enzyms mit 10 mM DTT_{red} und 2 µM 1,3bisPGA dissoziierte die NAD(P)(H)-GAPDH zu ca. 50% in die 150 kDa-Form (s. Abb. 18). Steigende Konzentrationen von 20 mM DTT_{red} und 50 µM 1,3bisPGA resultierten in der vollkommen dissoziierten tetrameren Form (s. Abb. 19). Die Kombination von 10 mM DTT_{red} und 2 µM 1,3bisPGA wurde gewählt, um die Situation bei Belichtung in isolierten Chloroplasten zu simulieren, denn außer, dass NAD(P)(H)-GAPDH im belichteten Chloroplasten reduziert wird, steigt die 1,3bisPGA-Konzentration auf ca. 2 µM an (s. Abb. 8). Die 50%ige Dissoziation der isolierten NAD(P)(H)-GAPDH stimmt sehr gut mit der 50%igen Dissoziation der NAD(P)(H)-GAPDH in belichteten Chloroplasten überein (s. Abb. 11).

Außer 1,3bisPGA werden auch ATP, NADPH und NADP als metabolische Effektoren der NAD(P)(H)-GAPDH beschrieben, die alleine oder in Kombination mit DTT_{red} zu signifikanten Aktivitätssteigerungen der NAD(P)(H)-GAPDH führten.

1,3bisPGA und ATP (s. Abb. 13, 16), sowie NADP und NADPH (PUPILLO & GIULIANI PICCARI (1975) aktivieren die isolierte NAD(P)(H)-GAPDH gleichermaßen. Um zu überprüfen, welche der Metaboliten *in vivo* als Effektor fungieren, wurden Versuche mit NAD durchgeführt. NAD wird als Metabolit angegeben, welches die Dissoziation der NAD(P)(H)-GAPDH revertiert (PUPILLO & GIULIANI PICCARI 1975). Im Stroma isolierter Chloroplasten liegen im Dunkeln wie im Licht mit 0,10 mM signifikante Konzentrationen an NAD vor (s. Tab. 20). Versuche mit gleichzeitiger oder aufeinanderfolgender Inkubation mit 1,3bisPGA und ATP in Kombination mit NAD, sowie die Bestimmung der Aktivierungskonstanten für 1,3bisPGA, ATP, NADP und NADPH bei Anwesenheit von NAD zeigten eindeutig, dass eine Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH unter den gewählten Bedingungen durch ATP, NADP und NADPH

unterbunden wird (s. Abb. 16, Tab. 8). 1,3bisPGA ist hingegen bei Anwesenheit von NAD weiterhin in der Lage, die NAD(P)(H)-GAPDH zu aktivieren (s. Abb. 15, 16, Tab. 8). Darüberhinaus werden zur Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH Konzentrationen von ATP, NADPH und NADP benötigt, die im Chloroplastenstroma nicht vorliegen (s. Tab. 21, vgl. Kap. 4.1.). Außerdem verbleibt der absolute Pyridinnucleotid-Pool unter allen Bedingungen konstant, selbst wenn sich das Verhältnis NADPH/(NADP+NADPH) ändert (s. Tab. 21). Sie scheiden somit definitiv als mögliche Aktivatoren *in vivo* aus.

Die Bestimmung der Aktivierungskonstante für 1,3bisPGA zeigte weiterhin, dass nach Reduktion nur noch 2 μM 1,3bisPGA benötigt werden, um die NAD(P)(H)-GAPDH zu aktivieren. Im oxidierten Zustand werden dagegen ca. 20 μM 1,3bisPGA benötigt (s. Tab. 19). Dieser Wert korreliert gut mit dem *in vivo* bestimmten K_a -Wert von 11-17 μM 1,3bisPGA. Das Ergebnis zeigt wiederum deutlich, dass die Messungen im System 'isolierte Chloroplasten' und im System 'isoliertes Enzym' sich ergänzen.

Die Versuche mit isolierter NAD(P)(H)-GAPDH zeigen weitreichend übereinstimmende Ergebnisse mit Versuchen des Systems 'isolierte Chloroplasten'. Jedoch können aus den Versuchen mit isolierter NAD(P)(H)-GAPDH weitergehend definitiv die Aussagen getroffen werden, dass 1,3bisPGA einen Effektor der NAD(P)(H)-GAPDH darstellt, und dass die Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH eine Folge des Zusammenspiels von Reduktion und Metaboliteneffekt ist.

4.1.3. Die kinetischen Eigenschaften der NAD(P)(H)-GAPDH

Versuche mit dem System 'isolierte Chloroplasten' und 'isoliertes Enzym' wurden durchgeführt, um einen Einblick zu erhalten, welche Rolle die Reduktion, und welche Rolle die Metaboliten bei der Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH besitzen. Außerdem wurde der Effekt beider Aktivatoren auf das Dissoziationsverhalten untersucht.

Aus den Versuchen geht hervor, dass Reduktion und Metaboliteffekt zusammenspielen, aber es ist noch unklar, welche strukturellen Grundlagen dafür verantwortlich sind. Weiterhin ist ungeklärt, wie die NAD(P)(H)-GAPDH im Licht- und Dunkelstoffwechsel reguliert wird. Damit im Licht und im Dunkel kein *futile cycle* stattfindet, muß die NAD(P)(H)-GAPDH im Licht in der reduktiven Richtung im Calvin-Cyclus 1,3bisPGA mit NADPH, im Dunkeln dagegen in der glykolytischen Reaktion GAP mit NAD umsetzen.

Weiterhin wurde die NAD(P)(H)-GAPDH biochemisch charakterisiert. Durch die biochemische Charakterisierung wird z.B. Aufschluß darüber gegeben, dass die oxidierte 600 kDa-NADPH-GAPDH andere Affinitäten für das Substrat 1,3bisPGA als die reduzierte 150 kDa-Form besitzt. Mit Kenntnis der Affinitäten für die Substrate und Coenzyme können die erhaltenen Werte mit im isolierten Spinat-Chloroplasten endogen gemessenen Substrat- und Coenzym-Konzentrationen (s. Tab. 20) verglichen werden. Die Korrelation der Daten ermöglicht es, bei Belichtung und im Dunkeln stattfindende Reaktionen festzustellen (vgl. Kap. 4.1.4.1., Kap. 4.1.4.2.1.).

Zur besseren Übersicht sind die gemessenen K_m -Werte der NAD(P)(H) aus den Tabellen 6 und 7 in der Tabelle 18 aufgeführt.

In vitro und *in vivo* kommt die NAD(P)(H)-GAPDH in vier verschiedenen Formen mit entsprechenden Maximalaktivitäten und Aggregationszuständen vor. Die Grundaktivität der oxidierten 600 kDa-NAD(P)(H)-GAPDH beträgt (im Standard-Enzymtest mit NADPH gemessen) *in vitro* ca. 10-20 U/mg, *in vivo* ca. 200 μmol (mg Chl)⁻¹ h⁻¹. Die Affinität der oxidierten 600 kDa-Form für 1,3bis PGA ist mit > 100 μM sehr gering. Durch Reduktion der NAD(P)(H)-GAPDH *in vitro* und *in vivo* mittels DTT_{red} verdoppelt sich die Aktivität. Das

Enzym verbleibt jedoch in der 600 kDa-Form, und auch die Affinität für 1,3bisPGA verbleibt mit 90 μM relativ niedrig. Die Messung der Verdoppelung der Aktivität durch Reduktion im Standard-Enzymtest basiert auf dem Vorhandensein des im Standard-Enzymtest

Tabelle 18: K_m -Werte der isolierten NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat für die Substrate 1,3bisPGA und GAP, sowie die Coenzym NADPH und NADH (s. Tab. 6, 7).

Vorinkubation	Coenzym	K_m -Werte der Enzym-Formen (μM)			
		1,3bisPGA ^a	GAP ^b	NADPH ^c	NADH ^c
Ohne	NADP(H)	> 100	30,2 ± 10	30 ± 10	120 ± 10
	NAD(H)	35 ± 8	12,6 ± 1	-	-
21 μM 1,3bisPGA	NADP(H)	20 ± 10	27 ± 2	50 ± 8	106 ± 29
	NAD(H)	24 ± 5	19 ± 3	-	-
20 mM DTT _{red}	NADP(H)	90 ± 10	23 ± 4	40 ± 10	210 ± 20
	NAD(H)	27 ± 13	18 ± 1	-	-
21 μM 1,3bisPGA + 20 mM DTT _{red}	NADP(H)	20 ± 8	22 ± 6	60 ± 9	290 ± 20
	NAD(H)	16 ± 10	20 ± 3	-	-

a: mit 320 μM NADPH, bzw. NADH

b: mit 400 μM NADP, bzw. NAD

c: mit 55 μM 1,3bisPGA

vorhandenen Effektors 1,3bisPGA. *In vivo* und *in vitro* findet durch alleinige Reduktion keine Aktivitätssteigerung statt. Diese Diskrepanz zwischen Aktivierung, bzw. keiner Aktivierung durch Reduktion wird in Kapitel 4.1.4.1. erläutert.

Inkubation der NAD(P)(H)-GAPDH als isoliertes Enzym und in isolierten Chloroplasten mit 1,3bisPGA, bzw. gleichzeitiger Reduktion führt zu einer Aktivitätssteigerung mit einhergehender Dissoziation. Aktivierung und partielle bzw. vollständige Dissoziation sind abhängig von der 1,3bisPGA-Konzentration. In der tetrameren Form erhöht sich die Affinität der NAD(P)(H)-GAPDH für 1,3bisPGA um den Faktor fünf. Der K_m -Wert beträgt für das oxidierte und reduzierte Tetramer ca. 20 μM . Die stattfindenden Aktivierungen, die mit einer gleichzeitigen Dissoziation einhergehen, sind real. Sie sind nicht auf Meßartefakte im Standard-Enzymtest zurückzuführen.

Wesentliche Ergebnisse der biochemischen Charakterisierung sind, dass die NAD(P)(H)-GAPDH in der dissoziierten Form ihre Affinitäten für das Substrat 1,3bisPGA erhöht; sie wird dem Substrat und gleichzeitigen Effektor gegenüber sensitiver. Dies trifft jedoch nur dann zu, wenn als Coenzym NADPH und nicht NADH genutzt wurde.

Die Affinitäten für NADPH sind mit 30-60 μM gegenüber NADH mit 106-290 μM sowohl in der hexadecameren und tetrameren Form als auch im reduzierten und oxidierten Zustand deutlich erhöht. Welche Auswirkungen die gemessenen K_m -Werte auf die Regulation der NAD(P)(H)-GAPDH *in vivo* für den Licht- und Dunkelstoffwechsel haben, wird in den Kapiteln 4.1.4.1. und 4.1.4.2.1. diskutiert.

In den Tabellen 19 und 20 sind die K_m -Werte von NAD(P)(H)-GAPDH-Isoenzymen für GAP, 1,3bisPGA, NAD, NADP, NADH und NADPH aufgeführt. Sie werden mit den in dieser Arbeit bestimmten K_m -Werten verglichen.

In der Tabelle 19 sind u.a. K_m -Werte für NAD und NADP für NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat aufgelistet, die in dieser Arbeit nicht bestimmt wurden. Die K_m -Werte für GAP sowohl mit

NAD als auch mit NADP gemessen, weisen eine Streuung um den Faktor acht bis zehn auf. Bei der Bestimmung der K_m -Werte der 600 kDa-Form für NAD und NADP widersprechen sie sich zum Teil erheblich. Generell liegen sie jedoch deutlich über den in dieser Arbeit

Tabelle 19: K_m -Werte der NAD(P)(H)-abhängigen GAPDH aus höheren Pflanzen, verschiedenen Algen und Bakterien für GAP (mit NAD und NADP gemessen) und für NAD und NADP (Literaturdaten).

	GAP (μ M) mit NAD	GAP (μ M) mit NADP	NAD (μ M)	NADP (μ M)
600 kDa GAPDH				
Spinat ¹	230	940	200	41
Spinat ²	1000	200	48	380
Spinat ³	238	208	166	41
150 kDa GAPDH				
Spinat ²	500	1000	8	7
Spinat ³	277	277	178	35,7
GapCp (<i>Pisum sativum</i>) ⁴	344	n.b.	62	n.b.
(A ₄) GAPDH ⁵	n.b.	1600	n.b.	180
<i>Euglena gracilis</i> ⁶ (140 kDa)	n.b.	970	n.b.	440
<i>Euglena gracilis</i> ⁸ (tetramere Form)	120	1000	41,6	2,6
<i>Chlorella</i> ⁹	n.b.	n.b.	310	230
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> ⁷	n.b.	n.b.	200	100

n.b.: nicht bestimmt

1) FERRI et al. 1978, 2) PUPILLO & GIULIANI PICCARI 1973, 3) PAWLIZKI 1975, 4) MEYER-GAUEN et al. 1998, 5) SCAGLIARINI et al. 1998, 6) GRISSOM & KAHN 1975, 7) ZEIKUS et al. 1977, 8) VACCHI et al. 1972, 9) TOMOVA et al. 1982.

gemessenen Werten (s. Tab. 18). Ein möglicher Grund für die hohen Werte könnte sein, dass GAP, in den Meßansätzen als isoliertes Triosephosphat eingesetzt, sehr instabil ist. Aus diesem Grund wurde in eigenen Messungen FBP eingesetzt, welches durch die Aldolase im Enzymtest in GAP und DHAP umgesetzt wird. In nicht gezeigten Versuchen wurden die resultierenden GAP-Gehalte rechnerisch und enzymatisch bestimmt. Beide Bestimmungen führten zu gleichen Ergebnissen. Daher scheint der Einsatz von FBP statt GAP im Enzymtest sinnvoll.

Die in Tabelle 20 aufgeführten K_m -Werte für 1,3bisPGA weichen ebenfalls von den in dieser Arbeit gemessenen K_m -Werten ab. Es wird von PAWLIZKI (1975) und SCAGLIARINI et al. (1998) zwar bei der Bestimmung zwischen der 600 kDa- und 150 kDa-Form unterschieden, aber die Affinität für 1,3bisPGA bleibt konstant hoch (s. Tab. 18). Dagegen stimmen die K_m -Werte für NADPH und NADH mit den in dieser Arbeit ermittelten Werten größtenteils

überein. Die Affinität für NADPH ist höher als die für NADH (s. Tab. 18, CERFF 1978a, FERRI et al. 1978, MACIOSZEK & ANDERSON 1987, PAWLIZKI 1975, TROST et al. 1993).

Tabelle 20: K_m -Werte der NAD(P)(H)-abhängigen GAPDH aus höheren Pflanzen, verschiedenen Algen und Bakterien für 1,3bisPGA (mit NADH und NADPH gemessen) und für NADH und NADPH (Literaturdaten).

	1,3bisPGA (μM) mit NADH	1,3bisPGA (μM) mit NADPH	NADH (μM)	NADPH (μM)
600 kDa-GAPDH				
Spinat ¹	n.b.	n.b.	300	23
Spinat ²	n.b.	n.b.	170	39
Erbse ³	n.b.	n.b.	190	32
Spinat ⁴	14,3	12	357	41
Spinat ⁶	n.b.	1,8	115	21
150 kDa-GAPDH				
Spinat ⁵	7	4	n.b.	n.b.
Erbse ³	n.b.	n.b.	450	30
Spinat ⁴	17,8	13,7	410	42
Spinat ⁶	n.b.	2,3	160	14
(A₄) GAPDH				
Spinat ⁶	n.b.	2,0	112	10
<i>Euglena gracilis</i> ⁷ (140 kDa)	4,3	n.b.	n.b.	0,12
<i>Euglena gracilis</i> ⁹ (tetramere Form)	n.b.	n.b.	7,9	18,5
<i>Scenedesmus obliquus</i>¹⁰				
550 kDa	n.b.	25	95	25
140 kDa	n.b.	n.b.	71	34
<i>Chlorella</i> ¹¹	n.b.	n.b.	34	32
<i>Methanobacterium thermoautotrophicum</i> ⁸	n.b.	n.b.	100	10

n.b.: nicht bestimmt

1) CERFF 1978a, 2) FERRI et al. 1978, 3) MACIOSZEK & ANDERSON 1987, 4) PAWLIZKI 1975, 5) TROST et al. 1993, 6) SCAGLIARINI et al. 1998, 7) GRISSOM & KAHN 1995, 8) ZEIKUS et al. 1977, 9) VACCHI et al. 1972, 10) O'BRIEN et al. 1977, 11) TOMOVA et al. 1982.

Die Ermittlung der Aktivierungskonstanten der NAD(P)(H) gaben in erster Linie Aufschluß darüber, dass weder ATP, noch NADP oder NADPH Effektoren der NAD(P)(H)-GAPDH *in vivo* sind. Nur 1,3bisPGA ist auch bei Anwesenheit von NAD in der Lage, die NAD(P)(H)-GAPDH *in vivo* zu aktivieren.

4.1.4. Licht- und Dunkelstoffwechsel

In autotrophen Plastiden ist es notwendig, dass zwischen den beiden Stoffwechselwegen (Calvin-Cyclus und Stärkeabbau, bzw. Glykolyse) regulativ unterschieden wird, da im Licht nur die Aktivität der NAD(P)(H)-GAPDH mit NADPH und 1,3bisPGA, im Dunkeln mit NAD und GAP sinnvoll ist.

4.1.4.1. Lichtstoffwechsel

Bei Belichtung des intakten Spinat-Chloroplasten erhöht sich die Aktivität der NAD(P)(H)-GAPDH von ca. 200 $\mu\text{mol (mg Chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ auf ca. 600 $\mu\text{mol (mg Chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (s. Abb. 7) und geht mit einer 50%igen Dissoziation von der 600 kDa-Form in die 150 kDa-Form einher (s. Abb. 11). Durch Reduktion mittels DTT_{red} des Dunkel-adaptierten Chloroplasten wird die Aktivität etwa verdoppelt (s. Abb. 6), aber es findet keine Dissoziation statt (s. Abb. 10B). Dieses Phänomen lässt sich dadurch erklären, dass sich bei einsetzender Belichtung innerhalb von ca. fünf Minuten der Pool des Effektors 1,3bisPGA von 0,1 μM auf ca. 0,8 μM erhöht (s. Abb. 8). Gleichzeitig wird durch Belichtung der K_a -Wert der NAD(P)(H)-GAPDH für 1,3bisPGA von ca. 19,5 μM auf ca. 1-2 μM gesenkt (s. Tab. 8). Daraus resultiert, dass die Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH aufgrund der durch Reduktion erhöhten Sensitivität für das Substrat und gleichzeitigen Effektors 1,3bisPGA erfolgt. Das für die Katalyse notwendige Coenzym NADPH ist selbst in Dunkel-adaptierten Chloroplasten mit 92-97 μM vorhanden, bevor es mit ansteigenden 1,3bisPGA-Konzentration während der Belichtung umgesetzt wird (s. Tab. 21). Der K_m -Wert der reduzierten NAD(P)(H)-GAPDH für NADPH beträgt ca. 40 μM (s. Tab. 18). Eine Limitierung der NAD(P)(H)-GAPDH-Aktivitäten in belichteten Chloroplasten durch NADPH ist auszuschließen, da die NADPH-Konzentration in belichteten Chloroplasten ca. 130 μM beträgt (s. Tab. 21). Der Umsatz der NAD(P)(H)-GAPDH wird in erster Linie durch das Substrat und gleichzeitigen Effektor 1,3bisPGA limitiert. Dies ergibt sich aus dem K_m -Wert der reduzierten NAD(P)(H)-GAPDH für das Substrat 1,3bisPGA von ca. 90 μM (eine Konzentration, die in belichteten Chloroplasten nicht erreicht wird, s. Tab. 18); dem K_a -Wert der reduzierten tetrameren Form für 1,3bisPGA von ca. 1-2 μM (s. Tab. 8), und der ermittelten 1,3bisPGA-Konzentration in belichteten Chloroplasten von ca. 0,8 μM (s. Abb. 8). Wenn die 1,3bisPGA-Konzentration unter 0,8 μM sinkt, findet kein Umsatz statt, da nicht genügend Substrat vorhanden ist. Die NAD(P)(H)-Aktivität in belichteten Chloroplasten hängt damit von der Produktion von 1,3bisPGA ab, die proportional dem Verhältnis $[\text{ATP}] \times [\text{3PGA}]/[\text{ADP}]$ ist, wie schon von ROBINSON & WALKER (1979) beobachtet wurde.

Tabelle 21: Gehalte an Pyridinnucleotiden in isolierten intakten Spinatplastiden. Die mit ^{a)} gekennzeichneten Werte stammen umgerechnet aus BACKHAUSEN et al. (1998). Die Proben im Licht wurden nach sieben Minuten der Belichtung erhalten. Die mit ^{b)} gekennzeichneten Werte stammen umgerechnet aus KITZMANN (1996). Die Proben im Licht wurden nach fünf Minuten der Belichtung erhalten.

	NAD (μM)	NADH (μM)	NADP (μM)	NADPH (μM)
Dunkel	107 ^a	41 ^a	190 ^a	97,9 ^a
	112 ^b	n.b.	224 ^b	92 ^b
Licht	103,6 ^a	44,4 ^a	158,4 ^a	129 ^a
	68 ^b	24 ^b	164 ^b	132 ^b

n.b.: nicht bestimmt

Aus bisherigen Kenntnissen über das Aktivierungsverhalten der NAD(P)(H)-GAPDH *in vivo* und *in vitro*, den biochemischen Charakterisierungen und der Kenntnis über im Chloroplasten endogen vorhandene Konzentrationen von Substraten und Coenzymen lassen sich für die Regulation der GAPDH *in vivo* im belichteten Chloroplasten weitere Schlüsse ziehen. Durch Reduktion des isolierten Enzyms und durch Belichtung des intakten Chloroplasten verdoppelt sich die Aktivität. Aus den biochemischen Charakterisierungen geht jedoch hervor, dass die Aktivitätssteigerungen vorgetäuscht werden. Reduzierte und

auch oxidierte NADPH-GAPDH in der 600 kDa-Form sind *in situ* inaktiv. Die reduzierte Form ist inaktiv, weil der K_m -Wert für 1,3bisPGA ca. 90 μM (s. Tab. 18) und der K_a -Wert für 1,3bisPGA ca. 1-2 μM (s. Tab. 8) beträgt. Für die oxidierte Form ist der K_m -Wert für 1,3bisPGA mit >100 μM (s. Tab. 18) und der K_a -Wert für 1,3bisPGA mit 19,5 μM (s. Tab. 8) sogar noch höher. Enzymaktivitäten der oxidierten und der reduzierten NAD(P)(H)-GAPDH werden *in vitro* und *in vivo* daher nur gemessen, weil im Standard-Enzymtest unphysiologisch hohe 1,3bisPGA-Konzentrationen vorhanden sind. Unter physiologischen Bedingungen ist NAD(P)(H)-GAPDH ausschließlich in der tetrameren Form aktiv.

Aktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH in belichteten Chloroplasten mit NADH als Coenzym sind ausgeschlossen, da der K_m -Wert mit 100-300 μM (s. Tab. 18) weit über den *in vivo* gemessenen Werten von 24-40 μM (s. Tab. 21) liegt.

Die Konzentrationen von NADPH sind auch im Dunkel-adaptierten Chloroplasten mit 92-98 μM (s. Tab. 23) relativ hoch, wenn sie mit dem K_m -Wert von 30 μM für NADPH (s. Tab. 18) verglichen werden. NADPH könnte also auch im Plastiden im Dunkeln gebunden werden können, und mit NAD um die Bindestelle im aktiven Zentrum konkurrieren. Warum NADPH ausschließlich im belichteten Chloroplasten umgesetzt wird, geht aus den Messungen *in vivo* und *in vitro*, sowie den biochemischen Charakterisierungen nicht hervor. Um diese Frage zu klären, wurden die strukturellen Eigenschaften der NAD(P)(H)-GAPDH untersucht (vgl. Kap. 4.2.3.).

Die Untersuchungen der NAD(P)(H)-GAPDH im System 'isolierte Plastiden' und im System 'isoliertes Enzym', sowie die biochemischen Charakterisierungen zeigen, dass die NAD(P)(H)-GAPDH durch vielfache Faktoren, wie Reduktion, unterschiedliche Metabolitgehalte im Licht und im Dunkel, sowie unterschiedliche Affinitäten für Substrate und Coenzyme reguliert wird. Das Enzym unterliegt dabei einem reversiblen Zyklus des Dissoziierens und Aggregierens, wobei eine Interaktion zwischen reduktiver und Substrat-Aktivierung angenommen wird.

In Abbildung 41 sind schematisch die Umwandlungen der *in vivo* vorkommenden NAD(P)(H)-GAPDH-Formen dargestellt. Es sind vier Aktivierungszustände aufgeführt, die mit zwei Molekulargewichtszuständen korrelieren. Für die einzelnen Formen (je eine oxidierte und eine reduzierte Form für das Tetramer bzw. das Hexadecamer) konnten unterschiedliche spezifische Aktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH festgestellt werden. In der Abbildung wurden ausschließlich die Aktivitäten mit NADPH berücksichtigt.

Die im Dunkeln vorliegende oxidierte 600 kDa-Form der NAD(P)(H)-GAPDH wird zunächst durch Reduktion (vermutlich Thioredoxin) in die reduziert vorliegende 600 kDa-Form überführt. Während dieses Prozesses wird der K_a -Wert von 17 μM für den Effektor 1,3bisPGA auf ca. 1 μM gesenkt. Das Enzym verbleibt hierbei in der inaktiven Form. Das durch Reduktion sensibilisierte Enzym wird durch 1,3bisPGA in die aktive 150 kDa-Form überführt. Im Vergleich wird die inaktive oxidiert vorliegende 600 kDa-Form der NAD(P)(H)-GAPDH *in vitro* durch Reduktion durch DTT_{red} etwa zweifach aktiviert. Die Aktivierbarkeit durch DTT_{red} beruht jedoch auf der Verfügbarkeit des im Enzym-Test vorhandenen 1,3bisPGA (vgl. Kap. 4.1.3.). Ohne Reduktionsmittel kann die inaktive Form der NAD(P)(H)-GAPDH *in vitro* durch hohe Konzentrationen von 1,3bisPGA, ATP, NADP und NADPH in die aktive 150 kDa überführt werden. *In vivo* scheiden ATP, NADP und NADPH als Aktivatoren der NAD(P)(H)-GAPDH aus. Die NAD(P)(H)-GAPDH-Aktivitäten werden während des Übergangs von Dunkel zu Licht den gegebenen Umständen, wie z.B. Lichtstärke und Bedarf an aktiv vorliegendem Enzym angepasst. Eine vollständige Dissoziation der 600 kDa-Form in die 150 kDa-Form findet bei Belichtung nicht statt.

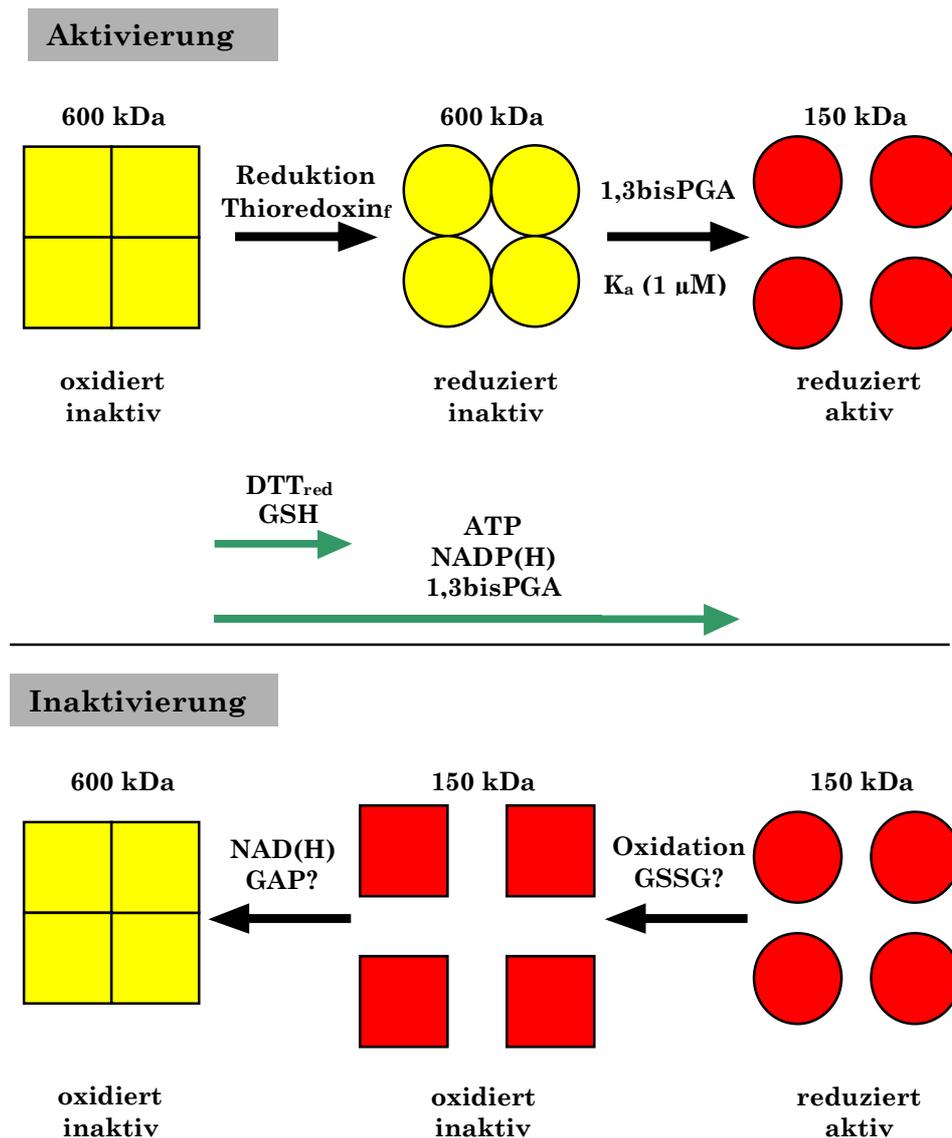


Abbildung 41: Schematische Darstellung der Aktivierung und der Inaktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH mit den *in vivo* postulierten Aktivierungs-Zuständen und deren Umwandlungen. Die gelben Quadrate symbolisieren die oxidiert vorliegende inaktive, die gelben Kreise die reduziert vorliegende inaktive Form der GAPDH. Die roten Kreise symbolisieren die reduziert vorliegende aktive Form, die roten Quadrate die oxidiert vorliegende inaktive Form der NAD(P)(H)-GAPDH. In grün dargestellt sind Abwandlungen, die *in vitro* auftreten. Jedes der Symbole repräsentiert ein Heterotetramer (A_2B_2). Schema nach BAALMANN et al. (1994, 1995) modifiziert.

Die im Licht teilweise dissoziierte reduzierte aktive 150 kDa-Form der NAD(P)(H)-GAPDH wird durch ein bislang nicht identifiziertes Thiol oxidiert und als weiterer Schritt wird NAD im aktiven Zentrum gebunden, so dass wiederum die oxidierte 600 kDa-Form der GAPDH im Dunkeln auftritt. Der Kreislauf ist geschlossen. *In vitro* führen die Oxidation und Zugabe von NAD ebenfalls zur Umwandlung in die inaktive 600 kDa-Form.

Weiterhin lassen sich aus den Messungen mit dem System 'isolierte Chloroplasten' und dem System 'isoliertes Enzym' im Vergleich mit den biochemischen Charakterisierungen signifikante Schlüsse für die Rolle der NAD(P)(H)-GAPDH im Dunkelstoffwechsel ziehen.

4.1.4.2. Dunkelstoffwechsel

Die Rolle der NAD(P)(H)-GAPDH in dunklen Plastiden war zu Beginn dieser Arbeit nicht aufgeklärt. Es wurde vermutet, dass die NAD(P)(H)-GAPDH in Dunkel-adaptierten Chloroplasten in der glycolytischen Richtung (DHAP-Verbrauch) aktiv ist, um ATP zu produzieren. Aber ein konkreter Anhaltspunkt, welche Coenzyme (NAD, NADP) beteiligt sind, bzw. welche Mechanismen greifen, um die Aktivitäten in der reduzierenden Richtung auszuschließen, war unbekannt.

Experimente mit ganzen Blättern unterstützen die Vermutung, dass die NAD(P)(H)-GAPDH *in situ* im Dunkeln mit NADPH und 1,3bisPGA gemessen, inaktiv sein muß (SIEBKE et al. 1991). Diese Inaktivität der NAD(P)(H)-GAPDH im Dunkeln erscheint auch unter dem Aspekt sinnvoll, weil im dunklen Chloroplasten während des Stärkeabbaus Trisosephosphate und nicht 3PGA exportiert werden müssen, um das Cytosol mit Kohlenhydraten und Energie zu versorgen (s. Abb. 2, 42).

Anhand von Messungen mit dem System 'isolierte Chloroplasten' und dem System 'isoliertes Enzym' im Vergleich mit biochemischen Charakterisierungen und Kenntnis über verschiedene Metabolitgehalte im isolierten Chloroplasten während der Dunkelphase, kann aus den eigenen Arbeiten gefolgert werden, dass die NAD(P)(H)-GAPDH im Dunkeln ausschließlich GAP mit NAD als Coenzym umsetzt.

Die Reaktion der NAD(P)(H)-GAPDH mit NADPH und 1,3bisPGA im Dunkeln scheidet aus (s. Text zu Tab. 21). NAD(P)(H)-GAPDH zeigt mit NADPH und 1,3bisPGA im dunklen Chloroplasten zwar eine Grundaktivität von ca. 200 $\mu\text{mol (mg Chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ (s. Abb. 6, vgl. Kap. 4.1.4.1.), doch kommt diese Aktivität nur dadurch zustande, dass während der Messung im Standard-Enzymtest das Substrat 1,3bisPGA in unphysiologisch hohen Konzentration angeboten wird (vgl. Kap. 4.1.4.1.). *In vivo* ist die 1,3bisPGA-Konzentration zu gering (s. Abb. 8) und der K_m -Wert für das oxidiert vorliegende Enzym in der 600 kDa-Form für 1,3bisPGA beträgt $>100 \mu\text{M}$ (s. Tab. 18). Auch kann die 600 kDa-Form der NAD(P)(H)-GAPDH unter *in vivo*-Bedingungen durch 1,3bisPGA nicht in die aktive 150 kDa-Form überführt werden, da die Aktivierungskonstante mit 11-17 μM zu hoch ist (vgl. Kap. 3.1.1.).

Auf Grundlage der biochemischen Charakterisierungen kann ebenfalls ausgeschlossen werden, dass ein Umsatz von NADP mit GAP stattfindet. Der K_m -Wert für NADP wurde in dieser Arbeit nicht bestimmt. Von FERRI et al. (1978) und PAWLIZKI (1975) wurde der K_m -Wert für NADP mit 41 μM , von PUPILLO & GIULIANI PICCARI (1973) mit 380 μM angegeben. Da diese Werte sehr unterschiedlich sind, können sie nicht genutzt werden, jedoch sind die ermittelten Konzentration von NADP im Dunkel-adaptierten Chloroplasten mit 190-224 μM (s. Tab. 21) kaum höher als der gemessene K_a -Wert von 185 μM (s. Tab. 19).

In dieser Arbeit wurde ebenfalls der K_m -Wert für NAD für die NAD(P)(H)-GAPDH nicht bestimmt. Im isolierten Chloroplasten ist NAD in Konzentration von ca. 0,1 mM (s. Tab. 21) vorhanden. Der von PUPILLO & GIULIANI PICCARI (1973) gemessene K_m -Wert von 48 μM (s. Tab. 19) für NAD für die NAD(P)(H)-GAPDH würde für einen Umsatz von NAD im Dunkel-adaptierten Spinat-Chloroplasten sprechen, während die von FERRI et al. (1978) mit 200 μM , von PAWLIZKI (1975) mit 166 μM und von CERFF (1978a) für Senf-Plastiden mit 300 μM zu hoch erscheinen (s. Tab. 19, vgl. Kap. 4.1.4.2.1.).

Welche strukturellen Grundlagen der NAD(P)(H)-GAPDH für den Umsatz von NAD bzw. gegen NADP verantwortlich sind, wird in Kapitel 4.2.3. diskutiert.

Zunächst wird jedoch anhand eines von BACKHAUSEN et al. (1998) entwickelten Schemas gezeigt, welche Rolle die NAD(P)(H)-GAPDH im Dunkelstoffwechsel spielt.

4.1.4.2.1. Regulation der NAD(P)(H)-abhängigen GAPDH im Dunkelstoffwechsel

Aufgrund der Entdeckung einer strikt NAD(H)-abhängigen plastidären MDH (NAD-MDH) (NAINAWATEE et al. 1974, AMINO 1992, NEUHAUS et al. 1993, BERKEMEYER et al. 1998) und einer strikt NAD(H)-abhängigen plastidären GAPDH (GapCp) (MEYER-GAUEN et al. 1994) in heterotrophen Plastiden und weiterführender Experimente zur DHAP- und OAA-abhängigen Produktion von 3PGA und Malat mit Spinat-Chloroplasten, wurde von BACKHAUSEN et al. (1998) ein Schema entwickelt. Es beinhaltet, dass in Dunkel-adaptierten Chloroplasten ausschließlich NAD(H) von NAD-MDH und NAD(P)(H)-GAPDH umgesetzt wird (s. Abb. 42). Die in Abbildung 42 dargestellten Reaktionen während des Stärkeabbaus werden durch Arbeiten von NEUHAUS & SCHULTE (1996), NEUHAUS et al. (1997) und NEUHAUS & MAAß (1996) unterstützt.

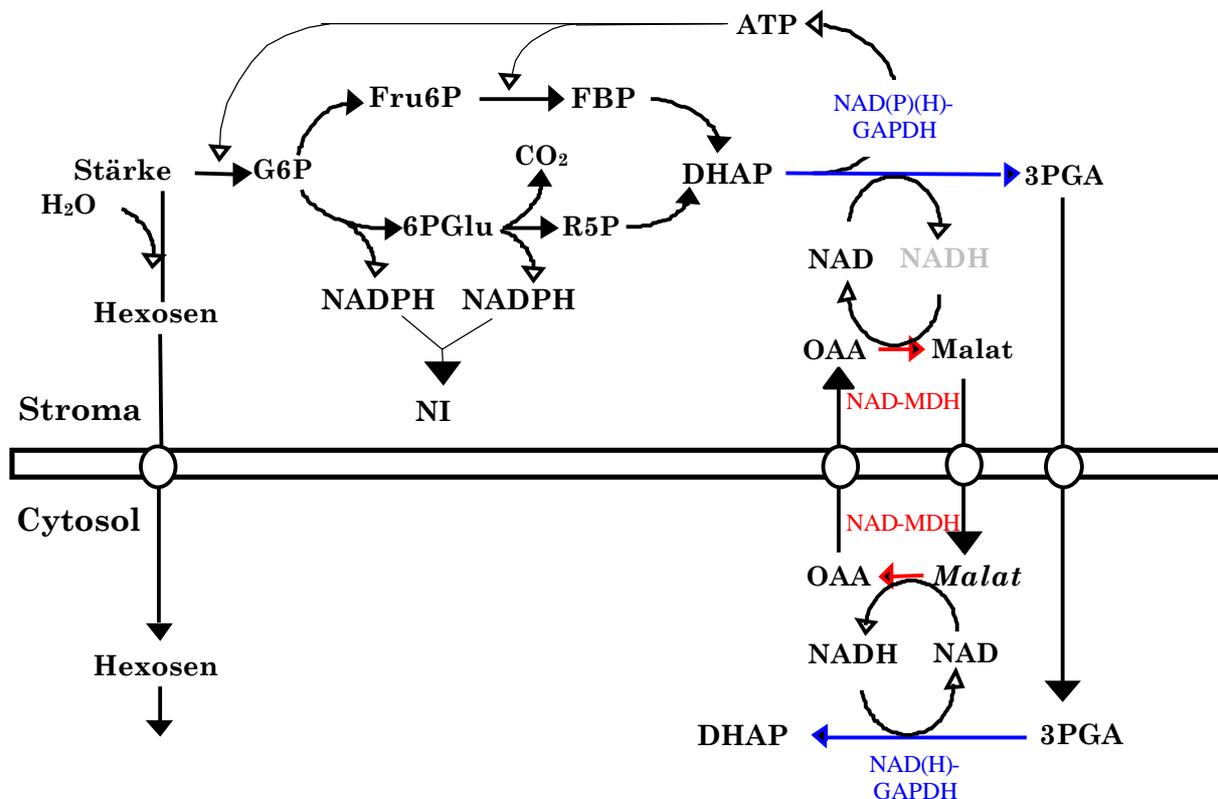


Abbildung 42: Schema: Vorgeschlagene Rollen der NAD-abhängigen MDH und GAPDH in dunklen Plastiden. Während des Stärkeabbaus wird NADPH durch den OPP (oxidativer Pentosephosphatweg) gebildet. Die NAD(P)(H)-abhängige GAPDH und die PGK oxidieren das im OPP gebildete DHAP und produzieren somit NADH und ATP in einer gekoppelten Reaktion. NADH, welches nicht durch weitere chloroplastidäre Reaktionen benötigt wird, wird von der NAD-MDH genutzt, und in Folge wird Malat aus dem Plastiden exportiert. FBP: Fructose-1,6-bisphosphat. NIR: Nitrit-Reduktase, 6PGlu: 6-Phosphogluconat, R5P: Ribulose-5-Phosphat. Schema nach BACKHAUSEN et al. (1998) modifiziert.

Es werden drei unterschiedliche Wege für den Stärkeabbau genutzt. Ein relativ hoher Anteil der Stärke wird über Hexosetransporter aus dem Plastiden ausgeschleust. Der Rest wird über Glucose-6-Phosphat (G6P) zunächst zu DHAP umgesetzt, wobei zwei NADP reduziert werden. Ein weiterer Abbauweg verläuft über Fructose-1,6-bisphosphat (FBP), das zu DHAP umgesetzt wird. Für diesen Weg wird jedoch ein ATP benötigt. ATP wird über Substratkettenphosphorylierung bei der Umsetzung von DHAP zu 3PGA gewonnen. Gleichzeitig entsteht ein NADH. Diese Reaktion ist die Rückreaktion von der im Calvin-Cyclus katalysierten Reaktion der NAD(P)(H)-GAPDH.

Ein wesentlicher Vorteil der Nutzung von NAD statt NADP liegt darin, daß ein Anstau von NAD verhindert wird, weil das entstehende NADH durch die NAD-MDH regeneriert werden kann. Eine weitere Begründung für die Annahme, dass ausschließlich NAD umgesetzt wird, besteht darin, dass das bei der Umsetzung von DHAP zu 3PGA benötigte NADP nicht ausreichend regeneriert werden könnte. NADP könnte zwar über Nitrit regeneriert werden, Voraussetzung ist jedoch, dass genügend Nitrit vorhanden ist. Käme es zu einem Engpaß, würde der Abbau der Glucose zum Erliegen kommen (s. Regulation der G6PDH (v. SCHAEWEN et al. (1995)), und der Abbau von Stärke wäre nicht mehr möglich. Die Umsetzung von DHAP zu 3PGA ist notwendig, um den Chloroplasten in Form von ATP mit Energie zu versorgen. ATP kann nicht aus dem Cytosol aufgenommen werden kann, da dies mit einem Austausch von ADP verbunden wäre. Als Folge würde sich die P_i -Konzentration im Chloroplasten verändern, die regulierend auf viele Enzyme wirkt.

Aufgrund der in Abbildung 42 postulierten Stoffwechselwege im isolierten Dunkel-adaptierten Spinat-Chloroplasten und der enzymatischen Eigenschaften der NAD(P)(H)-GAPDH ist evident, dass NAD(P)(H)-GAPDH ausschließlich NAD und nicht NADP umsetzt. In der Dunkelphase besitzt NAD(P)(H)-GAPDH ein Molekulargewicht von 600 kDa. Anhand von Versuchen mit dem System 'isolierte Chloroplasten' und dem System 'isoliertes Enzym' konnte nachgewiesen werden, dass die Aggregation unter oxidierenden Bedingungen und durch Inkubation mit NAD vermittelt wird (s. Abb. 11, 19). Die Aggregation erfolgt vermutlich ebenfalls über GAP und NADH.

Eigenschaften einer 300 kDa-Form der NAD(P)(H)-GAPDH sind bislang noch nicht geklärt. Sie erscheint in geringem Umfang während der Belichtung und verstärkt während der Reaggregation bei der oxidativen Inaktivierung (s. Abb. 11). Möglicherweise handelt es sich um ein Zwischenprodukt, welches während des Übergangs der 600 kDa- in die 150 kDa-Form, bzw. umgekehrt, auftritt. Die 300 kDa-Form könnte eine Aggregation zweier A_2B_2 -Tetramere darstellen, die während durchgeführter Experimente auftritt. Es wird angenommen, dass diese Form ebenfalls *in vivo* sehr kurzfristig auftreten kann, aber keine entscheidende Rolle für die Regulation von NAD(P)(H)-GAPDH besitzt.

Weitere Hinweise für den Umsatz von NAD im Dunkelstoffwechsel ergeben sich auch für andere Gewebe wie z.B. heterotrophe Plastiden roter Paprikafrüchte, da diese Plastiden keine NADP(H)-abhängige GAPDH und keine NADP-MDH besitzen.

4.1.4.2.2. GapCp im Stoffwechsel heterotropher Plastiden

Im Zusammenhang mit der Rolle der NAD(P)(H)-GAPDH stellt sich die Frage, ob GapCp die Rolle der NAD(P)(H)-GAPDH in heterotrophen Plastiden übernimmt. Es wurden Versuche mit GapCp aus roten Paprikafrüchten und rekombinant hergestellter GapCp aus roter Paprikafrucht durchgeführt, um zu untersuchen, ob die geforderten Eigenschaften von GapCp mit denen der 600 kDa-Form der NAD(P)(H)-GAPDH übereinstimmen, damit es die gleiche Funktion in heterotrophen Plastiden ausüben kann.

In photosynthetisch aktiven Eukaryoten kommen zwei Isoenzyme der GAPDH, die NAD(P)(H)-abhängige GAPDH im Chloroplasten, und die NAD(H)-abhängige GAPDH im Cytosol vor. Eine Ausnahme ist *Pinus sylvestris*. Denn in der Gymnosperme wurde in Chloroplasten ein neues, strikt NAD(H)-abhängiges Enzym, GapCp gefunden (MEYER-GAUEN et al. 1994, 1998). Dieses Enzym zeigt charakteristische Homologien zu GapC, nicht aber zu GapA oder GapB (s. Tab. 24). Es wurde weiterhin in dem Farn *Marsilea quadrifolia* nachgewiesen, und PETERSEN (1999) zeigte, dass alle großen Ordnungen der Landpflanzen funktionelle GapCp-Gene besitzen. Diese erstrecken sich jedoch ausschließlich auf heterotrophe Gewebe, wie z.B. Chromoplasten roter Paprikafrüchte. Untersuchungen mit

heterotrophen Chromoplasten von Blumenkohl-Infloreszenzen ergaben weiterhin, dass die NAD(H)-abhängige GAPDH-Aktivität zehn mal höher war als die NADP(H)-abhängige Aktivität, woraus geschlossen wurde, dass Blumenkohl eventuell eine bislang unbekannte plastiden-spezifische NAD(H)-GAPDH besitzt (NEUHAUS et al. 1993).

In BACKHAUSEN et al. (1998) wird diskutiert, dass GapCp beim Übergang von autotrophen Plastiden zu heterotrophen Plastiden exprimiert wird. Es wurde nachgewiesen, dass beim Übergang von der grünen zur roten Paprikafrucht zahlreiche Veränderungen im Stoffwechsel der Pflanze stattfinden. So fehlen im Chromoplasten roter Paprikafrüchte Thylakoide, RubisCO und *Light-harvesting*-Komplexe; dafür werden andere Proteine verstärkt exprimiert, z.B. Enzyme zur Synthese von Carotinoiden (NIELSEN et al. 1991). Unklar ist, ob in heterotrophen Plastiden die Expression der NAD(P)(H)-GAPDH ausgeschaltet wird. Warum im Stroma roter Paprikafrüchte außerdem NAD(P)(H)-GAPDH auftritt, ist unklar. Der Anteil der NADH-abhängigen Aktivitäten von NAD(P)(H)-GAPDH beträgt ca. 70-75% der NADH-abhängigen Aktivitäten von GapCp (s. Abb. 37, 38). Ein Grund kann sein, dass die Reifung verwendeter Paprikafrüchte nicht vollkommen abgeschlossen war.

Zur Überprüfung, ob in roter Paprikafrucht GapCp bzw. NAD(P)(H)-GAPDH vorkommt, wurden die NAD(H)- und NAD(P)H-abhängigen Aktivitäten der GAPDH in Chromoplasten roter Paprikafrüchte im Vergleich mit Chloroplasten aus Spinat gemessen. In roten Paprikafrüchten wurden zwei Isoenzyme nachgewiesen: Eine strikt NAD(H)-abhängige GAPDH in der 150 kDa-Form, und die NAD(P)(H)-abhängige GAPDH in der 600 kDa-Form. Um zu überprüfen, ob es sich bei der NAD(H)-abhängigen GAPDH um GapCp handelt, wurde das Gen *GapCp* aus roter Paprikafrucht in *E. coli* exprimiert und bis zur Homogenität gereinigt. Durch Ansequenzierung der ersten N-terminalen Aminosäuren wurde das Enzym als GapCp identifiziert.

Das von MEYER-GAUEN et al. (1998) angegebene Molekulargewicht einer Untereinheit von 37 kDa ist der in dieser Arbeit ermittelten Größe von ebenfalls 36-37 kDa äquivalent (s. Abb. 40). Die gemessene spezifische Aktivität der rekombinant hergestellten GapCp entspricht mit 75-91 U/mg Protein ebenfalls der von GapCp aus *Pinus sylvestris* mit 89 U/mg Protein (MEYER-GAUEN et al. (1998)). Außerdem ist der K_m -Wert für NAD mit 57 μM mit dem des bestimmten Wertes von MEYER-GAUEN et al. (1998) von 62 μM vergleichbar.

Jedoch besteht eine Diskrepanz bei der K_m -Wert-Bestimmung für GAP. Für die aus roter Paprikafrucht angereicherte GapCp wurde in dieser Arbeit ein K_m -Wert von ca. 3 μM (s. Abb. 15), für das gereinigte rekombinante Enzym ein K_m -Wert von ca. 6 μM (s. Abb. 17) bestimmt, während MEYER-GAUEN et al. (1998) einen K_m -Wert für GAP von 344 μM angeben. Sie liegen damit im gleichen Konzentrationsbereich wie andere Autoren mit 240 und 80 μM für Erbsen-GapC (DUGGELBY & DENNIS 1974, MCGOWAN & GIBBS 1974), 400 μM für Spinat GapC (SPERANZA & GOZZER 1978) und 300 μM für Senf NAD(P)(H)-GAPDH (CERFF 1978a). Die bestimmten Werte in den Publikationen erscheinen jedoch zu hoch (vgl. Kap. 4.1.3.), da die Konzentration von GAP im Chloroplasten etwa 8 μM beträgt (HOLTGREFE et al. 1997). Die in dieser Arbeit bestimmten K_m -Werte für GAP mit 3 μM bzw. 6 μM scheinen daher realistisch zu sein.

Ein Aspekt der Bestimmung des Molekulargewichts und der biochemischen Eigenschaften von GapCp ist, zu untersuchen, ob GapCp in heterotrophen Plastiden die entsprechende Rolle wie NAD(P)(H)-GAPDH in isolierten Chloroplasten im Dunkeln ausübt. Voraussetzung ist, dass GapCp keine Katalyse mit NADP oder NADPH durchführen kann, bzw. deren Umsatz durch strukturelle Merkmale unterbunden ist. GapCp ist strikt NAD(H)-abhängig. Daher treten bei der biochemischen Charakterisierung der GapCp keine Unterschiede in den

Affinitäten für Substrate und Coenzyme auf, wenn es durch DTT_{red} reduziert oder mit 1,3bisPGA inkubiert wurde (s. Tab. 15). Weiterhin stimmen die Affinitäten der GapCp für 1,3bisPGA und NADH sehr gut mit der oxidierten hexadecameren Form der NAD(P)(H)-GAPDH überein (s. Tab. 15, 17, 18). GapCp besitzt für GAP mit 3 μM bzw. 6 μM sogar eine höhere Affinität als die NAD(P)(H)-GAPDH mit ca. 25 μM (s. Tab. 18). Daraus folgt, dass der Umsatz von GAP durch GapCp im heterotrophen Plastiden gewährleistet ist. Geht man weiter davon aus, dass die NAD-Konzentration in heterotrophen Plastiden mit der von isolierten, Dunkel-adaptierten Spinatchloroplasten vergleichbar ist, kann aufgrund des bestimmten K_m -Wertes der GapCp für NAD von 57 μM (s. Tab. 17) ebenfalls ein Umsatz von NAD stattfinden.

GapCp erfüllt daher die Anforderungen, als Teil des Malat-Ventils im Chromoplasten roter Paprikafrucht zu operieren. Durch ihre Aktivitäten wird der Chromoplast unabhängig von der Verfügbarkeit von Reduktionsäquivalenten mit ATP versorgt (BACKHAUSEN et al. 1998). Die für das Funktionieren des Malat-Ventils notwendige NAD-MDH wurde ebenfalls in Chromoplasten roter Paprikafrüchte nachgewiesen (BACKHAUSEN et al. 1998).

Die Abbildung 42, in der schematisch der Abbau von Stärke und die Rolle der NAD(P)(H)-GAPDH, bzw. NAD-MDH bei der Umsetzung des entstehenden NADH gezeigt ist, wurde zunächst für den Dunkelstoffwechsel autotropher Plastiden konzipiert. Allerdings kann aufgrund der biochemischen Charakterisierung von GapCp davon ausgegangen werden, dass das Schema ebenfalls auf heterotrophe Plastiden angewendet werden kann. In heterotrophen Plastiden ist es nicht notwendig, ein über den Licht/Dunkel-Wechsel reguliertes Enzym zu synthetisieren, da hier unabhängig von der Belichtung der gleiche Stoffwechsel genutzt wird. Dies könnte die Ursache für den Wechsel der Isoform der NAD(P)(H)-GAPDH im Laufe der Reifung von roter Paprikafrucht sein.

4.2. Strukturelle Grundlagen der Regulation der NAD(P)(H)-GAPDH: Die Rolle der CTE

Die physiologische Funktion der NAD(P)(H)-GAPDH wurde in den Kapiteln 4.1.4.1. und 4.1.4.2.1. ausführlich beschrieben. Es bleiben jedoch Fragen offen, die die Aggregation/Dissoziation, Redoxmodulation und Coenzym-spezifität betreffen. Unklar ist, welche strukturellen Merkmale vorhanden sind, damit eine Aggregation bzw. Dissoziation stattfinden kann. Weiterhin ist unklar, welche Cysteine bei der Redoxmodulation eine Rolle spielen, und welche Strukturen vorhanden sind, damit die NAD(P)(H)-GAPDH im Licht 1,3bisPGA mit NADPH reduziert, andererseits im Dunkel GAP mit NAD oxidiert. Hinweise für die strukturelle Analyse zur Aufklärung dieser Eigenschaften ergaben sich aus dem Vergleich mit cytosolischer NAD(H)-GAPDH. Dieses Isoenzym ist nicht redoxmoduliert, kommt ausschließlich in der tetrameren Form vor und setzt ausschließlich NADH um. Darüberhinaus unterscheidet es sich strukturell hauptsächlich von der NAD(P)(H)-GAPDH dadurch, dass es keine CTE besitzt. Daher wurde für die Analyse der strukturellen Grundlagen anhand von Mutanten untersucht, welche Rolle die Untereinheitenstruktur und die CTE für die Eigenschaften der NAD(P)(H)-GAPDH besitzen.

Im Vergleich zur cytosolischen NAD(H)-GAPDH besitzt die NAD(P)(H)-GAPDH verschiedener Blau-, Rot-, und Grünalgen ähnliche Eigenschaften (Redoxmodulation, Coenzym-spezifität, Aggregationsverhalten) wie die chloroplastidäre NAD(P)(H)-GAPDH höherer Pflanzen. Zur Analyse struktureller Gemeinsamkeiten der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat wurde zunächst anhand von Aminosäuresequenzvergleichen der Verwandtschaftsgrad mit Isoenzymen der NAD(P)(H)-GAPDH bestimmt.

Aus den Tabellen 22 und 23 geht hervor, dass die B-Untereinheiten aus Spinat, Tabak, *Arabidopsis thaliana* und Erbse untereinander zu 88-94% identisch und zu 94-97% homolog sind; die GapA-Untereinheiten aus Spinat, Mais, Erbse und Tabak sind untereinander zu 88-89% identisch und zu 88-94% homolog. Ausgehend von GapB aus Spinat weisen unter Verwendung der Identitäten der Aminosäuresequenzen die NAD(P)(H)-GAPDH einen abfallenden Verwandtschaftsgrad mit der Grünalge (*Chlamydomonas reinhardtii*, 77%), den Rotalgen (*Chondrus crispus*, 70% und *Gracilaria gracilis*, 69%) und den Cyanobakterien (*Synechocystis* sp., 68% und *Anabaena variabilis*, 64%) auf.

Tabelle 22: Identitäten der Aminosäuresequenzen der Isoenzyme von NAD(P)(H)-GAPDH. Die Identitäten wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, ermittelt.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20			
1	GapB Spinat	100																						
2	GapB Tabak	92	100																					
3	GapB <i>Arabidopsis thaliana</i>	89	92	100																				
4	GapB Erbse	88	94	93	100																			
5	GapA Spinat	80	82	80	81	100																		
6	GapA Mais	79	81	79	80	88	100																	
7	GapA Erbse	78	81	78	79	90	90	100																
8	GapA Tabak	76	79	77	78	87	90	89	100															
9	GapA <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	77	80	80	78	80	78	77	76	100														
10	GapA <i>Chondrus crispus</i>	70	71	72	71	73	70	72	69	73	100													
11	GapA <i>Gracilaria gracilis</i>	69	71	71	70	73	70	72	70	72	91	100												
12	G3P2 <i>Synechocystis PCC6803</i>	68	70	68	69	72	72	73	71	70	70	70	100											
13	Gap2 <i>Anabaena variabilis</i>	64	64	64	66	66	66	67	64	66	66	66	75	100										
14	GapC <i>B. stearothermophilus</i>	59	59	60	60	58	59	57	56	56	57	56	59	60	100									
15	GapC Mais	48	47	47	48	47	46	45	44	45	45	44	45	50	52	100								
16	GapC Senf	48	48	48	48	48	48	46	46	47	46	44	47	49	51	86	100							
17	GapC <i>Arabidopsis thaliana</i>	48	47	47	48	47	46	46	44	47	46	45	47	49	51	86	95	100						
18	GapC <i>Pinus sylvestris</i>	48	48	48	48	49	48	46	46	47	46	46	48	50	52	83	86	86	100					
19	GapCp <i>Pinus sylvestris</i>	48	46	48	46	47	47	45	45	47	44	44	48	46	52	74	73	72	75	100				
20	GapCp Rote Paprikafrucht	48	49	48	50	47	46	46	45	46	47	45	47	48	53	70	70	70	71	81	100			

Der Vergleich der Identitäten und Homologien der Aminosäuresequenzen der Isoenzyme der NAD(P)(H)-GAPDH zeigt vor allem, dass die NAD(P)(H)-GAPDH enger mit den Isoenzymen aus Grün-, Rot- und Blaualgen verwandt ist, als mit cytosolischer NAD(H)-GAPDH. Dieses Phänomen schlägt sich auch in physiologischer Hinsicht nieder, denn einige in den Tabellen 22 und 23 aufgeführten Algen sind ebenfalls redoxmoduliert und werden als Bestandteil einer höhermolekularen Form beschrieben, andere nicht (vgl. Kap. 4.2.2.). Darüberhinaus sind alle aufgeführten Algen ebenfalls Coenzym-bispezifisch.

Tabelle 23: Homologien der Aminosäuresequenzen der Isoenzyme von NAD(P)(H)-GAPDH. Die Homologien wurden, wie in Material und Methoden beschrieben, ermittelt.

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
1	GapB Spinat	100																			
2	GapB Tabak	95	100																		
3	GapB <i>Arabidopsis thaliana</i>	94	96	100																	
4	GapB Erbse	94	97	97	100																
5	GapA Spinat	87	90	89	90	100															
6	GapA Mais	86	87	86	87	93	100														
7	GapA Erbse	85	88	87	86	93	94	100													
8	GapA Tabak	84	86	86	87	88	86	92	100												
9	GapA <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	87	88	89	88	91	92	86	87	100											
10	GapA <i>Chondrus crispus</i>	83	84	83	84	86	83	84	84	84	100										
11	GapA <i>Gracilaria gracilis</i>	83	85	83	83	86	83	84	84	84	96	100									
12	G3P2 <i>Synechocystis PCC6803</i>	80	81	81	81	82	82	81	81	81	86	85	100								
13	Gap2 <i>Anabaena variabilis</i>	80	78	80	80	80	81	80	79	79	82	81	86	100							
14	GapC <i>B. steurothermophilus</i>	71	73	72	73	75	73	72	72	72	73	72	75	75	100						
15	GapC Mais	63	65	65	66	63	62	61	62	62	64	63	63	68	70	100					
16	GapC Senf	65	66	66	67	65	65	64	65	65	65	65	65	69	69	93	100				
17	GapC <i>Arabidopsis thaliana</i>	64	65	65	66	64	63	64	64	64	64	64	64	67	67	93	97	100			
18	GapC <i>Pinus sylvestris</i>	64	62	64	62	63	61	60	64	64	62	62	64	64	68	83	82	81	100		
19	GapCp <i>Pinus sylvestris</i>	64	65	65	65	65	62	61	63	63	65	65	65	66	69	91	93	93	84	100	
20	GapCp Rote Paprikafrucht	63	65	64	65	64	63	63	63	63	64	63	64	66	68	81	82	81	89	83	100

Die Verwandtschaft chloroplastidärer NAD(P)(H)-GAPDH ist zu cytosolischen NAD(H)-GAPDH-Isoenzymen deutlich geringer. GapA und GapB aus Spinat sind mit *B. stearothermophilus* (58%, 59%) wesentlich näher verwandt als mit den cytosolischen Isoenzymen GapC aus Mais, Senf, *Arabidopsis thaliana* und *Pinus sylvestris* (jeweils 48%). Die Identität mit GapCp aus *Pinus sylvestris* und roter Paprikafrucht beträgt ebenfalls 48%. Mittels bekannter Nucleotid- und Aminosäuresequenzen der GAPDH verschiedener Organismen wurden in den vergangenen Jahren detaillierte Evolutionsstammbäume aufgestellt, auf die in dieser Arbeit nicht näher eingegangen wird (MARTIN & SCHNARRENBARGER 1997, MARTIN 1996).

4.2.1. Die Rolle der CTE für die Aggregation

Im Gegensatz zu nicht-redoxmodulierten Enzymen im Chloroplasten sind einige Enzyme der Licht-/Dunkelmodulation unterworfen und besitzen eine interne oder externe Sequenzerweiterung (s. Abb. 43). In den meisten Fällen tragen die Extra-Sequenzen Cysteine, die möglicherweise für die Redox-Modifikation verantwortlich sind. Dies wurde für die NADP-Malat-Dehydrogenase und die γ -Untereinheit des Kopplungsfaktors (CF₁) nachgewiesen (SCHEIBE 1990). Die Sequenzerweiterung ist nicht notwendigerweise an den terminalen Enden der Sequenzen zu finden. Im Falle der FBPase und der ATPase ist sie in der Mitte der Sequenz lokalisiert. Für die anderen redoxmodulierten Enzyme ist noch unklar, ob es Extra-Sequenzen gibt, oder eine analytische Überprüfung der Sequenzen steht noch aus. Eine schematische Verteilung der untersuchten oder mutmaßlichen Cysteine, die eine Disulfidbrücke innerhalb der redoxmodulierten Enzyme bilden, ist in Abbildung 43 dargestellt.

Ausschließlich die Untereinheit GapB aus den Chloroplasten höherer Pflanzen besitzt die CTE. Viele Ergebnisse deuten an, dass die CTE an der Aggregation, bzw. Dissoziation der NAD(P)(H)-GAPDH beteiligt ist. Über die Tertiärstruktur der CTE ist nichts bekannt. Es wurden jedoch Kristallstrukturdaten cytosolischer NAD(H)-GAPDH-Isoenzyme verschiedener Organismen (VELLIEUX et al. (1993) und darin enthaltene Referenzen), sowie der chloroplastidären A₄-Form der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat (FERMANI et al. 2001) publiziert. In Abbildung 3 ist die Kristallstruktur eines Monomers der NAD(H)-GAPDH aus *B. stearothermophilus* dargestellt. Allen Isoformen der NAD(H)-GAPDH ist gleich, dass der N-Terminus und der C-Terminus an der Oberfläche eines jeden Tetramers liegen (s. Abb. 3, 46, 50). SANDERS konnte 1997 die Tertiärstruktur von NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat simulieren, indem er alle Aminosäuren von *B. stearothermophilus* gegen die Aminosäuren von GapA und GapB aus Spinat austauschte. So ergeben sich gute Hinweise, dass die Tetramere der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat sich in gleicher Weise wie die von *B. stearothermophilus* falten (SANDERS 1997). Die Tertiärstruktur der CTE konnte aufgrund fehlender Strukturdaten jedoch nicht gezeigt werden. Es kann aber angenommen werden, dass die zwei CTE-Sequenzen eines Tetramers in NAD(P)(H)-GAPDH-Isoenzymen höherer Pflanzen nach außen exponiert sind. Zunächst wurden die CTE-Aminosäuresequenzen von GapB verschiedener höherer Pflanzen auf besondere Merkmale überprüft.

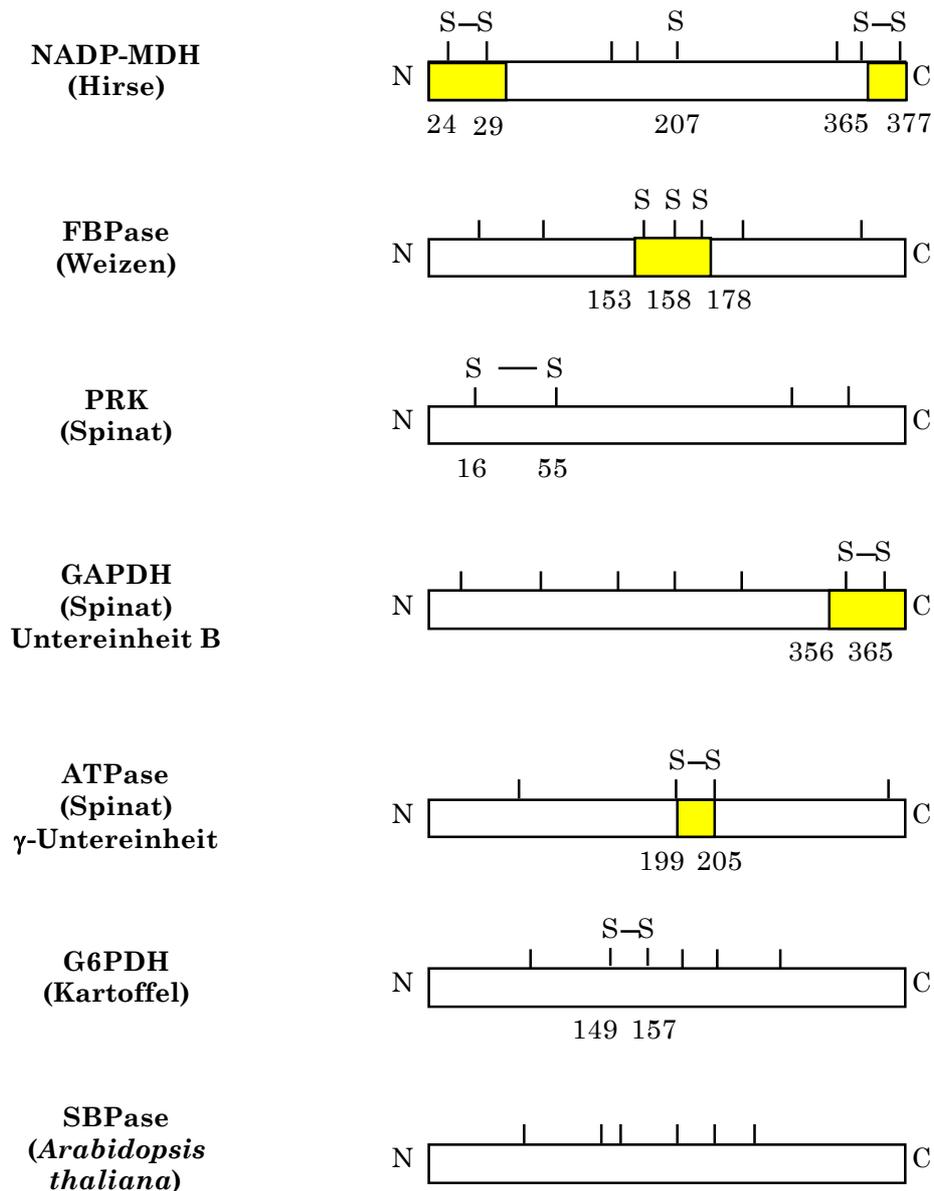


Abbildung 43: Lineare Repräsentation der lichtregulierten chloroplastidären Enzyme. Die Erweiterungen oder Insertionen, die für die Thiol-regulierten Enzyme spezifisch sind, sind in gelb dargestellt. Die Cysteine sind als vertikale Striche und die regulatorischen Disulfide, soweit sie identifiziert wurden, als S-S mit der Nummer des Aminosäurerests angegeben. Schema nach SCHEIBE (1990) und RUELLAND & MIGINIAC-MASLOW (1999), modifiziert.

4.2.1.1. Besondere Merkmale der CTE in höheren Pflanzen

Die CTE zeigt besondere Merkmale, die zur Vermittlung einer Aggregation benötigt werden (s. Abb. 44). Ein Vergleich der CTE-Sequenzen von GapB aus Spinat mit drei weiteren publizierten Sequenzen zeigt, dass in den 31 Aminosäuren ein extrem hoher prozentualer Anteil negativ geladener Aminosäuren (insgesamt sieben Aspartat- und Glutamatreste) konserviert ist. Diese Aminosäuren könnten durch elektrostatische Interaktionen mit anderen Nachbartetrameren in Kontakt treten, wodurch eine Aggregation in die $(A_2B_2)_4$ -Form stattfindet. Bei der Kontaktstelle muß es sich um einen positiv geladenen Bereich auf der Oberfläche eines benachbarten Tetramers handeln.

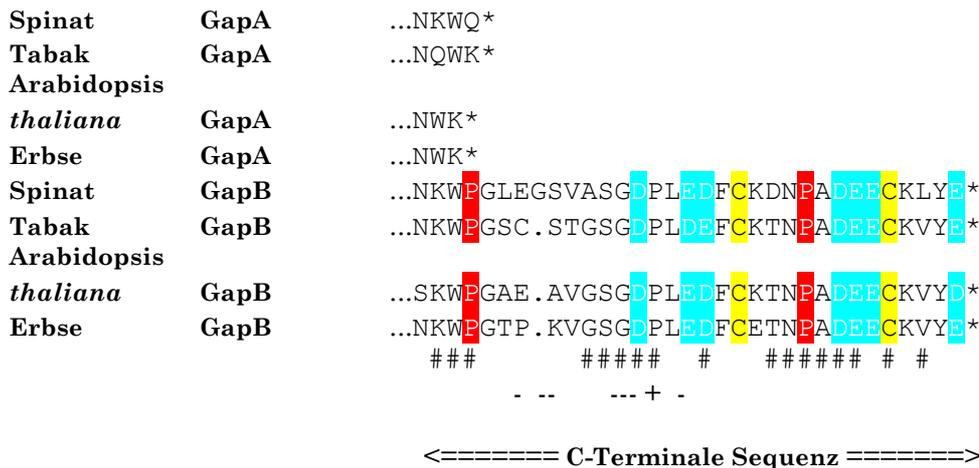


Abbildung 44: Vergleich der GapA und GapB C-Termini publizierter CTE-Sequenzen. Quellen der Sequenzen: Spinat (FERRI et al. 1990), *Arabidopsis thaliana* (SHIH et al. 1992), Erbse (BRINKMANN et al. 1989), Tabak (korrigierte publizierte Sequenz (BRINKMANN et al. 1989). *Stop codons* wurden mit einem Sternchen angegeben, '*' sind Lücken in der Sequenz. Konservierte Aminosäuren sind mit '#' gekennzeichnet, konservierte Ladungen mit '+' und '-'. Die beiden konservierten Cysteine (C) und die Proline (P) sind farblich markiert.

Auffällig sind ebenfalls zwei durch acht Aminosäuren entfernte konservierte Cysteine, in deren Mitte ein Prolin konserviert ist. Ein Prolin sorgt u.a. für einen Richtungswechsel bei der Faltung eines Proteins in die Tertiärstruktur. Theoretisch könnten daher die Cysteine eine Disulfidbrücke bilden und bei der Redoxmodulation der NAD(P)(H)-GAPDH eine wichtige Rolle spielen. Dieser Aspekt wird in Kapitel 4.2.2. diskutiert.

Falls die CTE die Aggregation in die 600 kDa-Form der NAD(P)(H) in Spinat vermittelt, sollte NAD(P)(H)-GAPDH, der die CTE fehlt, nicht in der Lage sein, zu aggregieren. Aus diesem Grund wurden Versuche, in denen die CTE durch Proteolyse abverdaut wurde, und Versuche, in denen rekombinante GapA^M-, GapB^M- und GapB^{MΔC}-Untereinheiten kloniert und exprimiert wurden, durchgeführt. Die Versuche sollten Aufschluß darüber geben, ob die CTE die Aggregation vermittelt.

4.2.1.2. Kann proteolytierte A₂B₂-NAD(P)(H)-GAPDH aggregieren?

Von ZAPPONI et al. (1993) wurde beschrieben, dass durch limitierte Proteolyse die 600 kDa-Form der NAD(P)(H)-GAPDH in die 150 kDa-Form dissoziiert. Sie inkubierten gereinigte NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat mit der Endoprotease aus *Staphylococcus aureus* V8 für mehrere Stunden. Dies führte zur Entfernung C-terminaler Aminosäuren beider Untereinheiten der NAD(P)(H)-GAPDH, die in die 150 kDa-Form dissoziierte. Die Dissoziation führte zu keinem signifikanten Aktivitätsverlust. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen jedoch, dass die Dissoziation der NAD(P)(H)-GAPDH zu einer Aktivitätssteigerung führt (s. Abb. 22). Während der Proteolyse der intakten NAD(P)(H)-GAPDH mit V8 Protease wird GapB von 43 kDa- in die 39 kDa-, GapA von der 39 kDa- in die 36 kDa-Form überführt. Das Entfernen der C-terminalen Aminosäuren von GapB und GapA führte innerhalb von drei Stunden zu einem Molekulargewichtswechsel von der 600 kDa-Form in die 110 kDa-Form (s. Abb. 23). Während dieser Zeit traten mehrere Zwischenformen auf (SCHEIBE et al. 1996). Die resultierende tetramere Form zeigte im Gegensatz zu den von ZAPPONI et al. (1993) durchgeführten Versuchen ohne vorherige Aktivierung ein vergleichbares Aktivitätsmaximum wie die zuvor mit DTT_{red} und 1,3bisPGA aktivierte intakte tetramere NAD(P)(H)-GAPDH (s. Abb. 22). Eine Reaggregation der proteolysierten NAD(P)(H)-GAPDH ist nicht möglich (s. Abb. 24).

Die durchgeführten Versuche deuten an, dass die CTE bei der Aggregation, bzw. Dissoziation der NAD(P)(H)-GAPDH involviert ist. Durch Proteolyse wird jedoch nicht nur die CTE, sondern ebenfalls Aminosäuren von GapA entfernt. Aus diesem Grund wurden GapA^M, GapB^{MAc} und GapB^M rekombinant hergestellt, um das Aggregationsverhalten intakter Untereinheiten und die Unterschiede zwischen GapA und GapB zu untersuchen.

4.2.1.3. Eigenschaften rekombinant hergestellter NAD(P)(H)-GAPDH: Rekombinant hergestellte Untereinheiten der chloroplastidären GapA^M, GapB^{MAc} und GapB^M aus Spinat sind katalytisch aktiv

Die in *E. coli* exprimierten rekombinanten GAPDH-Homomere (GapA^M, GapB^M und GapB^{MAc}, der die 31 Aminosäuren der CTE durch ein Lysin ersetzt wurden), besitzen sowohl NADPH- als auch NADH-abhängige Aktivitäten. Die beobachteten Aktivitäten sind ausschließlich den rekombinanten Proteinen zuzuschreiben, da keine NADPH-abhängigen Aktivitäten in Kontrollen, denen das Plasmid fehlt, gemessen wurden, und die in *E. coli* endogen vorkommende NAD(H)-GAPDH ausschließlich NAD(H) umsetzt (BRANLANT & BRANLANT 1985, MICHELS et al. 1994).

GapA^M, GapB^{MAc} und GapB^M, die in *E. coli* exprimiert wurden, unterscheiden sich von den nativen chloroplastidären Untereinheiten durch ein zusätzliches Methionin am N-Terminus. Das Methionin wird von vielen aber nicht allen Proteinen, die in *E. coli* exprimiert werden, entfernt (MOGUILVSKY et al. 1993). Die Spezifität der *E. coli*-Aminopeptidase für Met-Lys-, welches in den hier exprimierten Proteinen vorkommt, ist niedriger als für andere Substrate (BEN-BASSAT et al. 1987). So ist es möglich, dass das aminoternale Methionin in den exprimierten Proteinen enthalten ist.

GapA^M wurde aus *E. coli* als Homotetramer mit einer spezifischen Aktivität von 60 U/mg Protein (s. Abb. 28, Tab. 10) gereinigt. Die Aktivität ist damit nur halb so hoch als die der aktivierten 150 kDa-A₂B₂-Form des nativen Enzyms aus Spinat (s. Tab. 10). GapB^M wird mit einem Molekulargewicht von 470 kDa und einer spezifischen Aktivität von 15-35 U/mg Protein aus *E. coli* isoliert. Die spezifische Aktivität beträgt nur ein Viertel der tetrameren Form in Chloroplasten (s. Abb. 28, Tab. 10). NAD(P)(H)-GAPDH benötigt ein Minimum von vier Untereinheiten, um katalytisch aktiv zu sein. Die 470 kDa-Form von GapB^M stellt somit vermutlich ein Aggregat von B₄-Tetrameren dar, wobei unklar ist, wieviele B₄-Tetramere aggregieren. Möglicherweise behindern die CTEs sich bei einer korrekten Faltung gegenseitig, da die A-Untereinheiten fehlen. GapB^{MAc} erscheint als Homotetramer mit einer spezifischen Aktivität von 110-130 U/mg Protein, welche der Aktivität des nativen Heterotetramers entspricht (s. Abb. 28, Tab. 10). Unter allen Bedingungen, unter denen die tetramere NAD(P)(H)-GAPDH reaggregiert, bleiben GapA^M und GapB^{MAc} in ihren tetrameren Formen. Dies bestätigt die vorausgegangen Versuche mit der V8-Protease dahingehend, dass ausschließlich Untereinheiten mit intakter CTE Aggregation und somit Inaktivierung zeigen.

4.2.1.4. Kinetische Eigenschaften der rekombinant hergestellten Untereinheiten der chloroplastidären GapA^M, GapB^{MAc} und GapB^M aus Spinat

Obwohl GapA^M und GapB^{MAc} ausschließlich als Tetramere vorliegen, und sich die Sequenz beider Enzyme nur zu ca. 13% unterscheiden (s. Abb. 23), erreicht GapB^{MAc} mit 100-120 U/mg Protein eine doppelt so hohe Maximalaktivität als GapA^M (s. Abb. 10, vgl. Kap. 4.2.3.). Die spezifische Aktivität beider Tetramere ändert sich nicht, wenn sie mit 20 mM oder 50 mM DTT_{red}, oder mit 21 µM 1,3bisPGA inkubiert wurden (s. Tab. 10). GapB^M besitzt eine spezifische Aktivität von ca. 15-35 U/mg. Die Aktivität wird durch Inkubation

mit 20 mM DTT_{red} bzw. 21 μ M 1,3bisPGA nicht erhöht (s. Tab. 10). Jedoch besitzt GapB^M eine vergleichbar hohe Aktivität wie GapB^{M^{AC}}, wenn sie entsalzt wurde (Entfernen von NAD) (s. Abb. 29). Die Bestimmung der Affinitäten für 1,3bisPGA, GAP, NADH und NADPH ergab, dass die K_m -Werte der beiden rekombinanten tetrameren Formen GapA^M und GapB^{M^{AC}} unter den durchgeführten Bedingungen sehr gut mit den jeweiligen K_m -Werten der tetrameren Form der intakten NAD(P)(H)-GAPDH korrelieren (s. Abb. 11, 12, 14). Die K_m -Wert-Bestimmungen mit GapB stimmen dagegen unter den durchgeführten Bedingungen überwiegend mit denen der 600 kDa-Form der NAD(P)(H)-GAPDH überein (s. Abb. 11, 12, 14). Eine Ausnahme ist die geringe Affinität von GapB für NADPH (s. Abb. 12). Die durchgeführten K_m -Wert-Bestimmungen können zum Teil mit den von LI & ANDERSON (1997) bestimmten Werten für GapB^M und GapB^{M^{AC}} verglichen werden. Die K_m -Wert-Bestimmungen wurden in ihrer Arbeit mit nicht inkubiertem Enzym durchgeführt. Für GapB^M ermittelten die Autoren einen K_m -Wert für NADPH von 38 μ M und für GapB^{M^{AC}} von 44 μ M. Der K_m -Wert von GapB^M für NADPH steht in Diskrepanz zu dem in dieser Arbeit gemessenen Wert von 130 μ M, während der K_m -Wert von GapB^{M^{AC}} sich mit 44 μ M für NADPH in der gleichen Größenordnung wie dem in dieser Arbeit ermittelten K_m -Wert von 35 μ M befindet (s. Tab. 12). Die K_m -Wert-Bestimmung für NADH ergab für GapB^M 590 μ M und für GapB^{M^{AC}} 640 μ M. Diese K_m -Werte sind wie ebenfalls in dieser Arbeit ermittelt (210-530 μ M), eindeutig höher als die für NADPH. Aus den von LI & ANDERSON (1997) bestimmten K_m -Werten kann geschlossen werden, dass sich GapB^M bei den Messungen in der tetrameren Form befand.

4.2.1.5. Die CTE ist für die Aggregation der A₂B₂-NAD(P)(H)-GAPDH in höheren Pflanzen verantwortlich

Aus den Ergebnissen der bisherigen Versuche mit den rekombinant hergestellten Proteinen GapA^M, GapB^M und GapB^{M^{AC}} kann mit hoher Wahrscheinlichkeit gefolgert werden, dass die CTE die Aggregation der NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat und den Isoenzymen der NAD(P)(H)-GAPDH aus anderen höheren Pflanzen vermittelt. Weitere Versuche mit den gleichzeitig exprimierten Proteinen GapA^{M^{B^M}} und GapA^{M^{B^{AC}}} bestätigen diese Annahme. Bei der simultanen Expression von GapA^M und GapB^M erscheint unter aggregierenden Bedingungen zwar nicht die 600 kDa-, sondern eine Mischung der 470 und 300 kDa-Form, jedoch zeigt GapA^{M^{B^{AC}}} unter aggregierenden Bedingungen ein Molekulargewicht von 150 kDa (s. Abb. 31). Möglicherweise treten in der 300-470 kDa großen Form außer einer Aggregation von A₂B₂-Formen ebenfalls z.B. A₁B₃- oder A₃B₁-Formen auf. Dies ist jedoch aufgrund von sterischer Hinderung auszuschließen (pers. Mitteilung, R. Cerff, Technische Universität, Braunschweig). Dennoch kann davon ausgegangen werden, dass GapA^{M^{B^M}} als rekombinantes Enzym gleichermaßen in der Lage ist, wie die native NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat zu aggregieren, denn eine Mutante, der im CTE das Cystein 365 durch ein Serin ausgetauscht wurde, aggregierte in die 600 kDa-Form (s. Abb. 32). Eine erfolgreiche Aggregation von GapA^{M^{B^M}} in die 600 kDa-Form konnte von Scheibe et al. (2002) nachgewiesen werden.

4.2.1.6. Gibt es die A₄-Form der NAD(P)(H)-GAPDH in Chloroplasten höherer Pflanzen?

Neben der in dieser Arbeit untersuchten (A₂B₂)₄-Form der NAD(P)(H)-GAPDH wurde ein weiteres Isoenzym, die A₄-Form beschrieben. Diese wurde für *Sinapis alba*-Keimlinge (CERFF 1978b), *Chenopodium rubrum*-Chloroplasten (DE LOOZE & WAGNER 1983), Senf-Keimlinge (CERFF 1982) und für Spinat (FERRI et al. 1990) publiziert. Später wurde diskutiert, dass die A₄-Form ein Produkt partieller Proteolyse während der Reinigung darstellt und es sich um die (A₂B'₂)₄-Form handelt, bei der von beiden GapB-Untereinheiten

29 Aminosäuren abgetrennt wurden (BRINKMANN et al. 1989). Da die CTE für die Aggregation verantwortlich ist, kann die A₄-Form nicht aggregieren. Ergebnisse zeigen, dass in Dunkel-adaptierten Chloroplasten jedoch keine 150 kDa-Form vorkommt (SCAGLIARINI et al. 1993, s. Abb. 10). Die quantitative Überprüfung zur Bestimmung der GapA- und GapB-Untereinheiten ergab zusätzlich, daß in Dunkel-adaptierten Chloroplasten aus Spinat kein Überschuß von GapA vorhanden ist (s. Abb. 12). GapA wäre in der Menge überragend, wenn es zusätzlich zur (A₂B₂)₄-Form eine A₄-Form geben würde.

Weiterhin wurde die A₄-Form der NAD(P)(H)-GAPDH isoliert (SCAGLIARINI et al. 1998), doch in dieser Arbeit fehlen entsprechende Kontrollen, die ausschließen, dass es sich möglicherweise um die proteolytisierte NAD(P)(H)-GAPDH handelt. Kürzlich wurde die A₄-Form aus Spinat kristallisiert (FERMANI et al. 2001). Jedoch zeigt die strukturelle Darstellung, dass es sich statt um ein Tetramer, um ein Trimer handelt (s. Abb. 45).

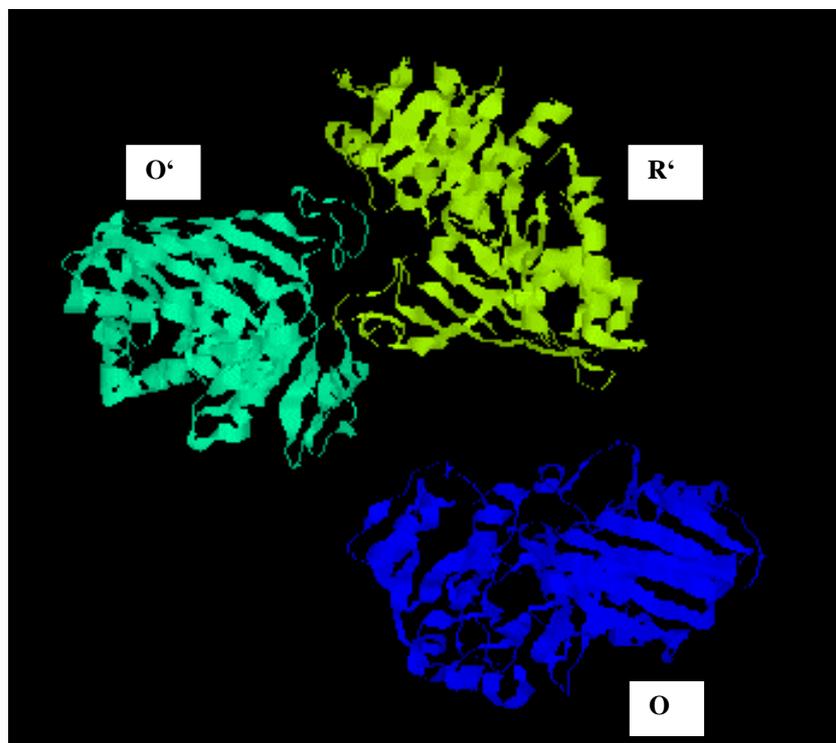


Abbildung 45: Strukturelle Darstellung der A₄-Form von NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat. Die Strukturdaten 1JN0 wurden der *RCSB Protein Data Bank* entnommen und mittels des Programms "Rasmol" dargestellt. Die Strukturdaten wurden in Fermani et al. (2001) publiziert. In der Abbildung sind drei Monomere in den Farben blau, türkis und hellgrün gezeigt. O' und R' bezeichnen ein Dimer, O ein Monomer (s. unterhalb der Abbildung aufgeführtes Zitat von Fermani et al. (2001)).

Die Autoren beschreiben die Synthese des Trimers zum Tetramer mit folgendem Wortlaut:

"The final model (A₄-Form, Anmerkung der Autorin) comprises three monomers, three NADP molecules, six sulphate ions and 212 water molecules in the asymmetric unit. The monomers are named O, O' and R' following the naming scheme of B. stearothermophilus GAPDH. The monomer O, close to the origin of the unit cell, generates a whole tetramer using the 222 point group symmetry. The dimer O'R' generates a second tetramer, using a crystallographic 2-fold axis coincident with the molecular axis P, which is also characterized by a non-crystallographic 22 symmetry" (FERMANI et al. 2001).

4.2.2. Die Rolle der CTE für die Redoxmodulation

Die Redoxmodulation beinhaltet, dass durch Reduktion einer Disulfidbrücke eine Konformationsänderung innerhalb des Enzyms ausgelöst wird. Diese Reduktion führt dazu, dass die Substrate einen Zugang zum aktiven Zentrum finden, der durch das Vorhandensein einer Disulfidbrücke versperrt ist (PACOLD et al. 1995b). Hinzu kommen bei den bisher bekannten redoxmodulierten Enzymen verschiedene Metabolite, die die Aktivierung des Enzyms durch entsprechende K_m - oder pH-Werte unterschiedlich positiv beeinflussen. In jedem Fall wirken die Spaltung einer Disulfidbrücke, Metabolite und/oder pH-Werte ergänzend zusammen, damit eine Aktivierung stattfinden kann.

Auch für die NAD(P)(H)-GAPDH ist noch unklar, ob die beiden Cysteine der CTE, oder andere Cysteinreste an der Redoxmodulation beteiligt sind. Gegenstand der Forschung waren bislang weitere in der Sequenz befindliche Cysteine. Jedoch wird seit Erscheinen der Publikationen LI & ANDERSON (1997) und BAALMANN et al. (1996) in Betracht gezogen, dass die Cysteine in der CTE für die Redoxmodulation verantwortlich sind (RUELLAND & MIGINIAC-MASLOW 1999). Um aufzuklären, um welche Cysteine es sich handelt, die die Disulfidbrücke in der NAD(P)(H)-GAPDH bilden, wurden von LI et al. (1994) intensive Modelling-Versuche durchgeführt. In die Kristalldaten der cytosolischen GAPDH von *B. stearothermophilus* in den bekannten Positionen wurden die konservierten Cysteine 18, 149, 153, 274 und 285 der NAD(P)(H)-GAPDH höherer Pflanzen eingefügt. In Abbildung 46 ist die erhaltene vorhergesagte Tertiär-Struktur der NAD(P)(H)-GAPDH aus Weizen dargestellt.

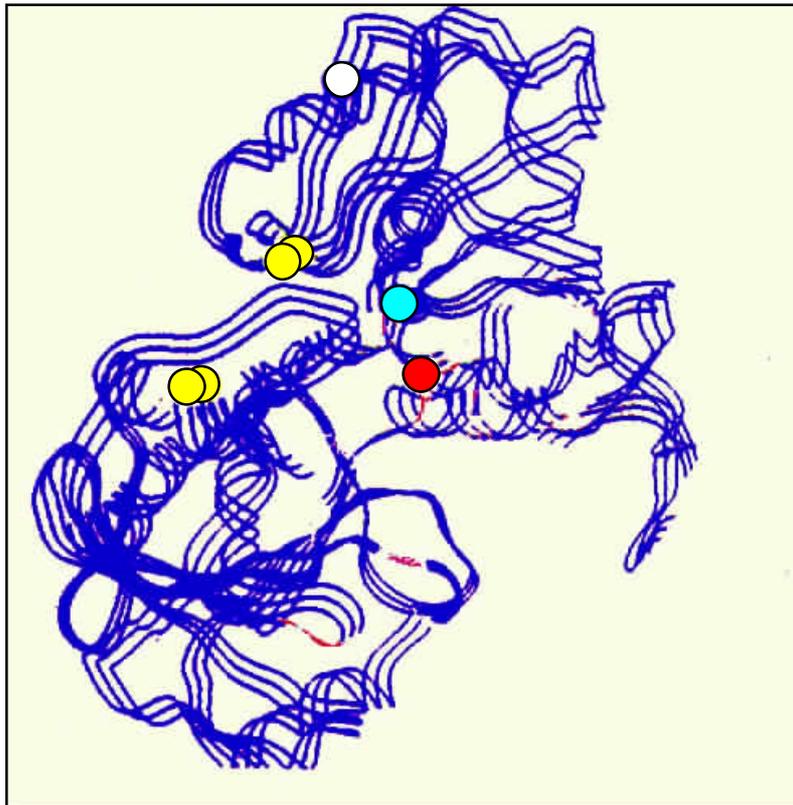


Abbildung 46: Vorhergesagte Tertiär-Struktur der Untereinheit A der NAD(P)(H)-GAPDH aus Weizen. Die entsprechenden Reste von *B. stearothermophilus*-NAD(H)-GAPDH wurden durch die Cysteinreste des chloroplastidären Enzyms aus Weizen ersetzt. Die Aminosäurereste des aktiven Zentrums sind in rot gezeigt. Der Abstand zwischen den Cysteinen 18 und 285 (beide in gelb dargestellt) beträgt 10,7 Å. Die Cysteine 149 (rot), 153 (türkis) und 274 (weiß) sind als Kugeln dargestellt. Abbildung nach LI et al. (1994), modifiziert.

Cystein 18 in der Nucleotidbindedomäne und Cystein 285 in der Substratbindedomäne sind um 10,7 Å voneinander entfernt. Die Katalyse des Enzyms beinhaltet eine Bewegung der beiden Domänen, so dass es zu kleinen Veränderungen in der Position struktureller Elemente gegenüber dem aktiven Zentrum kommt. Dadurch wird die Geometrie des aktiven Zentrums verändert und gleichzeitig die Beweglichkeit des Enzyms beeinflusst (SKARZYNSKI & WONACOTT 1988). LI et al. (1994, 1997) schlossen daraus, dass im inaktiven Zustand der NAD(P)(H)-GAPDH die Distanz zwischen den Cysteinen 18 und 285 nur noch 3 Å betragen könnte; zwischen den beiden Cysteinen folglich eine Disulfidbrücke gebildet wird.

Um zu untersuchen, ob eine Disulfidbrücke zwischen dem Cystein 18 und 285, oder eine Cysteinbrücke in der CTE gebildet wird, wurde zunächst das Vorhandensein von Cysteinen in NAD(P)(H)-GAPDH-Isoenzymen verschiedener Organismen untersucht. In der Tabelle 24 ist die Cysteinverteilung der NAD(P)(H)-GAPDH-Isoformen höherer Pflanzen dargestellt, die bislang als redoxmoduliert gelten. Im Vergleich sind auch einige Algen aufgeführt, bei denen die Redoxmodifikation umstritten ist. Die Nummerierung der Aminosäuren wurde mit Hilfe der *Brookhaven Databank* an die von *B. stearrowthermophilus* (BIESECKER et al. 1977) angepaßt.

Cytosolische NAD(H)-GAPDH besitzen ausschließlich zwei Cysteine im aktiven Zentrum (Cystein 149 u. 153). Das Cystein 18, sowie die Cysteine 149 und 153 im aktiven Zentrum, sind in allen NAD(P)(H)-GAPDH-Isoenzymen konserviert. Darüber hinaus sind in höheren Pflanzen ebenfalls die Cysteine in den Positionen 274 und 285, und in der CTE die Cysteine 355 und 364 konserviert. GapA aus Spinat besitzt ein zusätzliches Cystein in der Position 200 und GapB aus Tabak ein zusätzliches Cystein in der Position 342 in der CTE.

NAD(P)(H)-GAPDH kommt in höheren Pflanzen in den beiden Molekulargewichtsformen 600 und 150 kDa vor, wobei die 150 kDa-Form die aktive Form darstellt. NAD(P)(H)-GAPDH-Isoformen dieser Organismen werden in der Literatur als redoxmoduliert beschrieben. NAD(P)(H)-GAPDH in Algen wird entweder als 150 kDa-Form oder als eine höher aggregierte Form beschrieben. Das Molekulargewicht der NAD(P)(H)-GAPDH in höheren Pflanzen und in Algen spielt bei der Redoxmodulation eine Rolle. Dieser Aspekt wird in Kapitel 4.2.2. diskutiert. Die Redoxmodulation der NAD(P)(H)-GAPDH in Algen wird kontrovers diskutiert.

Erste Hinweise bei der Untersuchung der NAD(P)(H)-GAPDH in verschiedenen Algen zeigten, dass das Fehlen des Cysteins 285 mit dem Fehlen einer Redoxmodulationsfähigkeit übereinstimmen. Allen bekannten NAD(P)(H)-GAPDH-Isoenzymen in Blau-, Rot- und Grünalgen fehlt das Cystein 285 (s. Tab. 24). Die beiden Cynobakterien *Anabaena variabilis* und *Synechocystis 6803* werden als nicht redoxmoduliert beschrieben (PACOLD et al. 1995b). Die Autoren vermuteten jedoch, dass in der NAD(P)(H)-GAPDH von *Synechocystis PCC 6803* eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 18 und 288 gebildet werden kann, da das Cystein 288 sich nur drei Positionen nach Cystein 285 befindet. Den beiden Rotalgen *Gracilaria tikvahiae* und *Chondrus crispus* fehlt ebenfalls das Cystein 285. Beide sind weder *in vivo* lichtaktiviert noch *in vitro* durch Reduktion aktivierbar (PACOLD et al. 1995a). Dagegen fanden durch Reduktion mit DTT_{red} DUGGAN & ANDERSON (1975) eine Aktivitätssteigerung der NAD(P)(H)-GAPDH aus dem Cyanobacterium *Anacystis nidulans* (heute *Synechocystis PCC 6803*), und AUSTIN et al. (1992) sowie UDVARDY et al. (1982) eine Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH aus dem Cyanobacterium *Nostoc sp. Mac.*. TAMOI et al. (1996) konnten rekombinant hergestellte NAD(P)(H)-GAPDH aus *Synechococcus PCC 7942* nicht durch DTT_{red} aktivieren und keine Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH in Rohextrakten von *Synechococcus PCC 7942*, sowie *Synechocystis PCC 6803* durch Belichtung feststellen. Die beiden untersuchten NAD(P)(H)-GAPDH-Isoformen aus den

Tabelle 24: Cysteinverteilung der GAPDH unterschiedlicher Organismen: Die Nummerierung der Cysteine erfolgte nach einem Vergleich der Sequenz von *B. stearrowthermophilus*.

			18	29	73	14	15	20	24	27	28	28	28	28	34	35	36	
						9	3	0	0	4	1	4	5	8	2	5	4	
höhere Pflanzen:																		
Spinat	a	GapA ¹	*			*	*	*		*			*					
		GapB ¹	*			*	*			*			*				*	*
Tabak	a	GapA ²	*			*	*			*			*					
		GapB ³	*			*	*			*			*		*	*	*	*
<i>Arabidopsis thaliana</i>	a	GapA ⁴	*			*	*			*			*					
		GapB ⁴	*			*	*			*			*				*	*
Erbse	a	GapA ⁵	*			*	*			*			*					
		GapB ⁵	*			*	*			*			*				*	*
Cyano-Bakterien:																		
<i>Anabaena variabilis</i>	n	A2 ⁶	*		*	*	*											
<i>Synechocystis PCC 6803</i>	a/	GapA	*		*	*	*							*				
<i>Synechococcus PCC 7942</i>	a/	GapA	*			*	*											
Rotalgen:																		
<i>Chondrus crispus</i>	n	GapA ⁹	*	*		*	*		*		*							
<i>Gracilaria verrucosa</i>	n	GapA ¹⁰	*	*		*	*		*		*							
Grünalgen:																		
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	a	GapA ¹¹	*			*	*						*					

a: redoxmoduliert, n: nicht redoxmoduliert, a/n: redoxmoduliert oder nicht redoxmoduliert (Literaturangaben).

1) FERRI et al. 1990, 2) SHIH et al. 1986, 3) korrigierte publizierte Sequenz, BRINKMANN et al. 1989, 4) SHIH et al. 1992, 5) BRINKMANN et al. 1989, 6) MARTIN et al. 1993, 7) KOKSHAROVA et al. 1998, 8) TAMOI et al. 1996, 9) LIAUD et al. 1994, 10) ZHOU & RAGAN 1993, 11) KERSANACH et al. 1994.

Grünalgen *Scenedesmus obliquus* und *Chlamydomonas reinhardtii* werden entweder durch DTT_{red} oder Belichtung aktiviert (O'BRIEN & POWLS 1976, O'BRIEN et al. 1977, LI et al. 1997, WEDEL et al. 1997). ZIEGLER et al. (1967b) konnten bei mehreren untersuchten Rot- und Grünalgen eine Aktivitätssteigerung durch Belichtung feststellen. Diese widersprüchliche

Beschreibung der Redoxmodulation in den verschiedenen Algen macht deutlich, dass das Cystein 285 bei der Ausbildung einer Disulfidbrücke keine Rolle spielen kann.

Eine mögliche Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen 149 und 153 im aktiven Zentrum galt als ausgeschlossen, da sich beide auf dem gleichen α -helicalen Abschnitt befinden (LI et al. 1994, s. Abb. 4). Eine weitere Beobachtung unterstützt die Annahme, dass weder zwischen dem Cystein 149 und dem Cystein 153 im aktiven Zentrum, noch zwischen dem Cystein 18 und dem Cystein 285 eine Disulfidbrücke ausgebildet wird. Die Ausbildung beider Disulfidbrücken würde verhindern, dass die oxidierte 600 kDa-Form der NAD(P)(H)-GAPDH Substrat umsetzt, ohne reduziert vorzuliegen. Weiterhin könnte eine Aktivitätssteigerung durch verschiedene Effektoren, wie 1,3bisPGA, ATP, NADP und NADPH *in vitro* nicht stattfinden, denn die Metabolite besitzen nicht die Funktion von Thioredoxinen.

Grundsätzlich zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass NAD(P)(H)-GAPDH, der die CTE fehlt, weder durch DTT_{red} noch durch 1,3bisPGA oder in Kombination miteinander aktiviert werden kann. Auch diese Versuche zeigen, dass mit hoher Wahrscheinlichkeit innerhalb eines Tetramers keine Disulfidbrücke gebildet wird, sondern eine Disulfidbrücke in der CTE für die Redoxmodulation verantwortlich ist.

Für die Redoxmodulation in höheren Pflanzen ist die CTE verantwortlich. Da Blau-, Rot- und Grünalgen jedoch keine CTE besitzen, scheint die Fähigkeit zur Redoxmodulation für die Isoenzyme der NAD(P)(H)-GAPDH in diesen Organismen ausgeschlossen zu sein. Für einige Algen ist die Redoxmodulation der NAD(P)(H)-GAPDH jedoch beschrieben (vgl. Kap. 4.2.2., Kap. 4.2.2.2.1.) Diese Diskrepanz kann aufgehoben werden, wenn angenommen wird, dass in redoxmodulierten Algen ein GAPDH/PRK/CP12-Komplex existiert. Dieser Komplex besteht aus zwei GapA-, zwei PRK- und zwei CP12-Untereinheiten (WEDEL & SOLL 1998). Eine Aminosäuresequenz im C-terminalen Bereich von CP12 aus Spinat zeigt mit der Aminosäuresequenz der CTE aus Spinat hohe Homologien. WEDEL & SOLL (1998) beschrieben, dass sich in CP12 ebenfalls zwei Disulfidbrücken bilden. So entstehen zwei *loops*. Der N-terminale *loop* kann aufgrund der Anzahl hoher negativer Ladungen durch elektrostatische Wechselwirkungen an PRK, der C-terminale *loop* kann ebenfalls aufgrund der Anzahl hoher negativer Ladungen an GapA binden (s. Abb. 47).

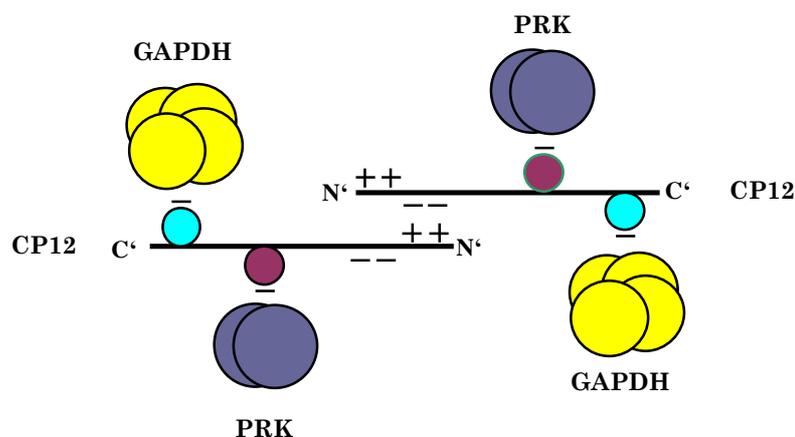


Abbildung 47: Schematische Darstellung des GAPDH/PRK/CP12-Komplexes in Algen, deren GAPDH redoxmoduliert ist. Ein CP12-Dimer bindet jeweils mit dem C-terminalen *loop* an ein NAD(P)(H)-GAPDH-Tetramers, mit dem N-terminalen *loop* an ein PRK-Dimer. Schema nach WEDEL et al. (1997), modifiziert.

Aus diesen Informationen kann gefolgert werden, dass CP12 in Algen die Funktion der CTE in höheren Pflanzen übernimmt, und in Algen für die Redoxmodulation von NAD(P)(H)-GAPDH verantwortlich ist. Voraussetzung dafür ist, dass GapA, PRK und CP12 in Algen mit redoxmodulierter NAD(P)(H)-GAPDH in einer hochmolekularen Form existieren. Eine hochmolekulare Form der NAD(P)(H)-GAPDH in Algen wurde u.a. für *Chlamydomonas reinhardtii* beschrieben. Das Isoenzym dieses Organismus wird als redoxmoduliert beschrieben. Der Widerspruch der Redoxfähigkeit der NAD(P)(H)-GAPDH in verschiedenen Algen läßt sich dadurch erklären, dass in einigen Fällen rekombinant hergestellte GapA, bzw. isolierte GapA zur Untersuchung genutzt wurden. In der tetrameren Form ist die Redoxmodulation jedoch ausgeschlossen. Aus diesem Grund bleibt es Gegenstand der Forschung, in welchen Algen eine Redoxmodulation der NAD(P)(H)-GAPDH stattfindet.

4.2.3. Die Rolle der CTE für die Nucleotidspezifität

Weiterhin wird untersucht, ob die CTE für die Nucleotidspezifität eine Rolle spielt. Die Kristallstrukturdaten mehrerer cytosolischer NAD(H)-abhängiger Isoenzyme der GAPDH zeigen, dass in einem Tetramer vier Mol NAD gebunden werden, wobei die Holo-Enzyme (NAD ist gebunden) wesentlich stabiler als die Apoenzyme (ohne NAD) sind. Die Bindung von NAD bewirkt eine Konformationsänderung im aktiven Zentrum (OLSEN et al. 1976, LESLIE & WONACOTT 1983, SKARZYNSKI & WONACOTT 1988, MOUGIN et al. 1988).

CORBIER et al. (1990) tauschten mittels *Site-Directed-Mutagenesis* in *B. stearothermophilus* zwei Aminosäuren Leu187 gegen Ala187 und Pro188 gegen Ser188, wie sie in chloroplastidären NAD(P)(H)-GAPDH-Isoformen vorkommen, aus. Die resultierende Mutante wurde daraufhin bispezifisch, konnte also auch NADP(H) umsetzen. Später kristallisierten DIDIERJEAN et al. (1997) die P188S-Mutante aus *B. stearothermophilus* und konnten die Ergebnisse von CORBIER et al. (1990) bestätigen. Von CLERMONT et al. (1993) und EYSCHEN et al. (1996) wurde eine Reihe weiterer Mutanten hergestellt. Vereinfacht läßt sich zusammenfassen, dass die Verteilung der Aminosäuren in den Positionen 187 und 188 und außerdem in den Positionen 32 und 33 davon abhängt, ob NAD(H) oder NAD(P)(H) umgesetzt werden kann. In der Tabelle 25 ist die Aminosäureverteilung der vier Positionen in unterschiedlichen Organismen aufgeführt.

Die kovalente Bindung der Substrate 1,3PGA und GAP erfolgt in cytosolischen und chloroplastidären Isoenzymen der GAPDH gleichermaßen am Cystein 149 im aktiven Zentrum. Die Funktion von Cystein 153 im aktiven Zentrum ist unbekannt.

Aus Tabelle 25 geht hervor, dass die Aminosäure Aspartat (D) in der Position 32 in allen Isoformen der GAPDH vorkommt. Eine D32G-Mutante führte zu einer höheren Umsetzung der katalytischen Rate mit NADP(H) (CLERMONT et al. 1993, EYSCHEN et al. 1996). In der Position 33 befindet sich in den A-Unterheiten höherer Pflanzen, von Cyanobakterien und von Rotalgen die Aminosäure Threonin (T); in den B-Untereinheiten höherer Pflanzen und von *Chlamydomonas reinhardtii* ein Serin (S). Ausnahmen bilden die cytosolischen NAD(H)-GAPDH-Isoformen höherer Pflanzen mit Prolin (P) und *B. stearothermophilus* mit Leucin (L). GapA und GapB höherer Pflanzen, sowie die NAD(P)(H)-GAPDH der Cyanobakterien und Rotalgen, besitzen in der Position 187 ein Alanin (A), cytosolische NAD(H)-GAPDH höherer Pflanzen ein Glycin (G), *Chlamydomonas reinhardtii* ein Aspartat (D) und *B. stearothermophilus* ein Leucin (L). Gleich hingegen sind GapA und GapB mit Serin (S) in der Position 188 und auch *Chlamydomonas reinhardtii* besitzt ein Serin (S). Hier bilden die Rotalgen mit einem Glycin (G) die Ausnahme. Alle cytosolischen NAD(H)-GAPDH-Isoenzyme haben in dieser Stelle jedoch ein Prolin (P) (s. Tab. 25).

Tabelle 25: Aminosäurezusammensetzung in den Positionen 32, 33, 187 und 188 in unterschiedlichen Organismen: Die Nummerierung der Cysteine erfolgte nach einem Vergleich der Sequenz von *B. stearothersophilus*.

		AS 32	AS 33	AS 187	AS 188
höhere Pflanzen:					
Spinat	GapA ¹	D	T	A	S
	GapB ¹	D	S	A	S
	GapC ²	D	P	G	P
Tabak	GapA ³	D	T	A	S
	GapB ⁴	D	S	A	S
	GapC ⁵	D	P	G	P
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GapA ⁶	D	T	A	S
	GapB ⁶	D	S	A	S
	GapC	D	P	G	P
Erbse	GapA ⁸	D	T	A	S
	GapB ⁸	D	S	A	S
	GapC ⁹	D	P	G	P
Cyano-bakterien:					
<i>Anabaena variabilis</i> ^b	A2 ¹⁰	D	T	A	S
<i>Synechocystis PCC 6803</i> ^b	GapA ¹¹	D	T	A	S
<i>Synechococcus PCC 7942</i>	GapA ¹²	D	T	A	S
Rotalgen:					
<i>Chondrus crispus</i>	GapA ¹³	D	T	A	G
<i>Gracilaria verrucosa</i>	GapA ¹⁴	D	T	A	G
Grünalgen:					
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	GapA ¹⁵	D	S	D	S
Bakterien:					
<i>B. stearothersophilus</i>	GapC ¹⁶	D	L	L	P

1) FERRI et al. 1990, 2) SPERANZA & GOZZER 1978, 3) SHIH et al. 1986, 4) korrigierte publizierte Sequenz, BRINKMANN et al. 1989, 5) SHIH et al. 1991, 6) SHIH et al. 1992, 7) SHIH et al. 1991, 8) BRINKMANN et al. 1989, 9) KERSANACH et al. 1994, 10) MARTIN et al. 1993, 11) KOKSHAROVA et al. 1998, 12) TAMOI et al. 1996, 13) LIAUD et al. 1994, 14) ZHOU & RAGAN 1993, 15) KERSANACH et al. 1994, 16) BIESECKER et al. 1977.

In der Abbildung 47A ist zunächst die Bindung von NAD in der NAD(H)-GAPDH von *B. stearothersophilus* gezeigt. *B. stearothersophilus* besitzt in den oben genannten für die Nucleotidbindung verantwortlichen Positionen folgende Zusammensetzung: D32, L33, L187 und P188. In diesem Bakterium wie in allen cytosolischen NAD(H)-GAPDH-Isoformen bindet NAD(H) ausschließlich an den Aminosäuren 32 und 33. Alle cytosolischen Isoformen

der NAD(H)-GAPDH besitzen in der Position 32 ein Glycin. In Position 33 befindet sich im Bakterium *B. stearothermophilus* ein Leucin, in den cytosolischen Isoenzymen höherer Pflanzen ein Prolin (s. Tab. 25). Die Aminosäuren in den Positionen 32 und 33 befinden sich nebeneinander auf der gleichen α -Helix eines Monomers (s. Abb. 3, 47A). Eine Bindung der Phosphatgruppe von NADPH an der Aminosäure 188 ist ausgeschlossen, da dies durch sterische Hinderung und Ladung des Prolins in der Position 188 unterbunden wird (s. Abb 47A).

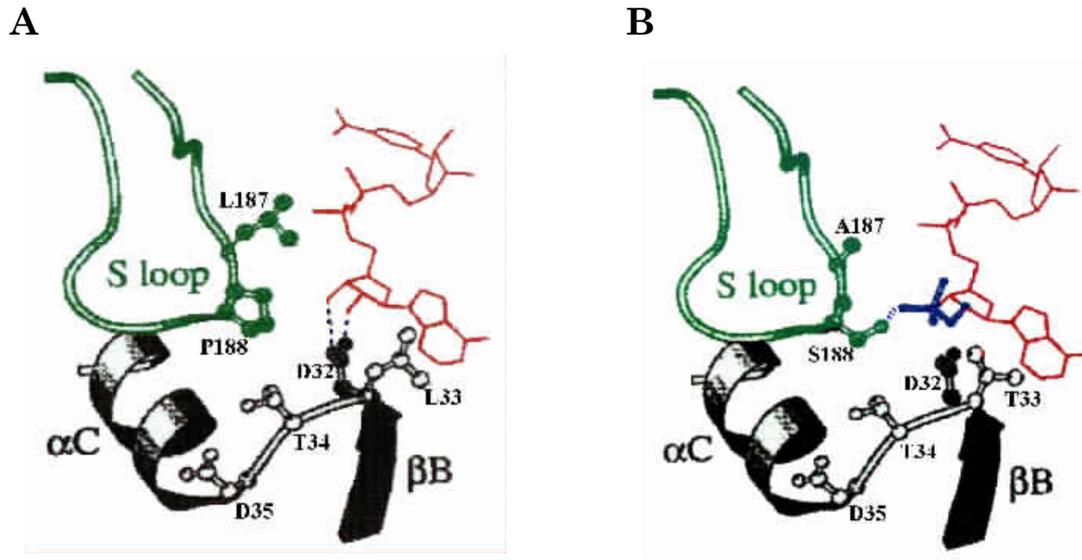


Abbildung 47: Schematische Darstellung der Bindung von NAD (A) in NAD(H)-GAPDH von *B. stearothermophilus* und die Simulation der Bindung von NADP(H) (B) mit in *B. stearothermophilus* ausgetauschten Aminosäuren L33T, P188S und L187A, wie sie in chloroplastidärer GapA vorkommt. Schema nach EYSCHEN et al. (1996), modifiziert.

In der Abbildung 47B ist die wahrscheinliche Bindung von NADP(H) in GapA dargestellt. In GapA sind die Aminosäurepositionen folgendermaßen festgelegt: D32, T33, A187 und S188. GapB besitzt in der Position 33 im Gegensatz zu GapA ein Serin (S).

Von EYSCHEN et al. (1996) wird vorgeschlagen, dass die NADP(H)-Bindung durch den Austausch zweier Aminosäuren mit dem 2'PO₄ in der Position 188 (P188S) und in der Position 187 (L187A) ermöglicht wird (s. Abb. 47B). NADPH kann daher an der Aminosäure 188 binden, da das Prolin 188 durch ein Serin 188 ausgetauscht wurde. Die sterische Hinderung der Bindung von NADP(H) durch Prolin 188, welches in den cytosolischen Isoenzymen vorkommt, ist damit aufgehoben. Wichtig ist in diesem Zusammenhang, dass sich die Aminosäuren 187 und 188 auf dem *S-loop* befinden, der in das aktive Zentrum eines benachbarten Monomers hineinragt. Außer NAD(P) kann die chloroplastidäre GapA ebenfalls NAD(H) umsetzen (nicht gezeigt), da das Coenzym aufgrund der schematischen Darstellung in Abbildung 47B ebenfalls an der Aminosäure D32 binden könnte (vgl. Abb. 47A).

Ein Serin (S188) kommt in allen höheren Pflanzen und Grünalgen, ein Threonin (T188) in allen Rotalgen vor. Ein Alanin (A187) kommt in allen höheren Pflanzen, Cyanobakterien und Rotalgen, ein Aspartat (D187) in Grünalgen vor (s. Tab 25, 26).

In der Tabelle 26 sind die Aminosäuresequenzen der *S-loops* von GAPDH-Isoenzymen unterschiedlicher Organismen gezeigt.

Tabelle 26: Der S-loop von GAPDH-Isoenzymen (Aminosäuren 178-200) in unterschiedlichen Organismen: Die Nummerierung der Aminosäuren (178-200) erfolgte nach einem Vergleich der Sequenz von *B. stearothermophilus*.

<u>höhere Pflanzen:</u>		A	bc	d	ef	g
Spinat	GapA ¹	YTGDR	LLD	ASH	RDL	RRARAAA
	GapB ¹	YTGDR	LLD	ASH	RDL	RRARAAA
Tabak	GapA ²	YTGDR	LLD	ASH	RDL	RRARAAA
	GapB ³	YTGDR	LLD	ASH	RDL	RRARAAA
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GapA ⁴	YTGDR	LLD	ASH	RDL	RRARAAA
	GapB ⁴	YTGDR	LLD	ASH	RDL	RRARAAA
Erbsen	GapA ⁵	YTGDR	LLD	ASH	RDL	RRARAAA
	GapB ⁵	YTGDR	LLD	ASH	RDL	RRARAAA
<u>Cyano- bakterien:</u>						
<i>Anabaena variabilis</i> ^b	A2 ⁶	YTGDR	LLD	ASH	RDL	RRARAAA
<i>Synechocystis PCC 6803</i> ^b	GapA ⁷	YTGDR	LLD	ASH	RDL	RRARAAA
<u>Rotalgen:</u>						
<i>Chondrus crispus</i>	GapA ⁸	YTGDR	LLD	AGH	RDL	RRARSA
<i>Gracilaria verrucosa</i>	GapA ⁹	YTGDR	LLD	AGH	RDL	RRARSA
<u>Grünalgen:</u>						
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	GapA ¹⁰	YTGDR	LLD	ASH	RDL	RRARAAA
<u>Armleuchteralge:</u>						
<i>Chlorokybus atmophyticus</i>	GapB ¹¹	YTGDR	LLD	ASH	RDL	RRARAAA
<u>Plastidäre GapCp:</u>						
<i>Pinus GapCp</i>	GapCp ¹²	TTATQKTVDG	PSM	KDW	RGG	R
<u>Cytosolische NAD(H)-GAPDH:</u>						
<i>Arabidopsis thaliana</i>	GapC ¹³	ITATQKTVDG	Pm	KDW	RGG	R
Mais	GapC ¹⁴	TTATQKTVDG	PA	KDW	RGG	R
<i>B. stearothermophilus</i>	GapC ¹⁵	YTNNQRILD	Ph	KDL	R	GA

a: Arginin 183, b: Alanin 187, c: Serin/Glycin 188, d: Arginin/Lysin 190, e: Arginin 193, f: Arginin 194, g: Arginin 196

1) FERRI et al. 1990, 2) SHIH et al. 1986, 3) korrigierte publizierte Sequenz, BRINKMANN et al. 1989, 4) SHIH et al. 1992, 5) BRINKMANN et al. 1989, 6) MARTIN et al. 1993, 7) KOKSHAROVA et al. 1998, 8) LIAUD et al. 1994, 9) TAMOI et al. 1996, 10) KERSANACH et al. 1994, 11) PETERSEN 1999, 12) MEYER-GAUEN et al. 1998, 13) SHIH et al. 1991, 14) RUSSELL et al. 1991, 15) BIESECKER et al. 1977.

Aus Tabelle 26 geht hervor, dass die Aminosäuren der *S-loops* von GAPDH-Isoenzymen höherer Pflanzen, Cyanobakterien, Grünalgen und von *Chlorokybus atmophyticus* identisch sind. In den *S-loops* von GAPDH aus den Rotalgen *Chondrus crispus* und *Gracilaria verrucosa* gibt es in den Positionen 188 und 197 nur zwei Austausch. Dagegen zeigen die *S-loops* der cytosolischen Isoformen der NAD(H)-GAPDH höherer Pflanzen sowie aus *B. stearothermophilus* und von GapCp aus *Pinus sylvestris* stärkere Abweichungen in der Aminosäuresequenz.

In Abbildung 47B ist nicht berücksichtigt, dass chloroplastidäre NAD(P)(H)-GAPDH sowohl in der tetrameren als auch in der hexadecameren Form vorkommt. Das Enzym besitzt in der aggregierten 600 kDa-, sowie in der dissoziierten 150 kDa-Form eine Affinität für NADPH von 30 μ M, bzw. 60 μ M. Da im Chloroplasten sowohl im Licht als auch im Dunkeln Konzentrationen von 130 bzw. 90 μ M NADPH (s. Tab. 21) vorhanden sind, könnte die NAD(P)(H)-GAPDH theoretisch auch im Dunkeln NADPH umsetzen. Während des Licht-Dunkel-Übergangs im Chloroplasten wechselt die NAD(P)(H)-GAPDH jedoch zwischen dem Coenzym NADPH und NAD. Die Ursache dafür ist bislang unklar.

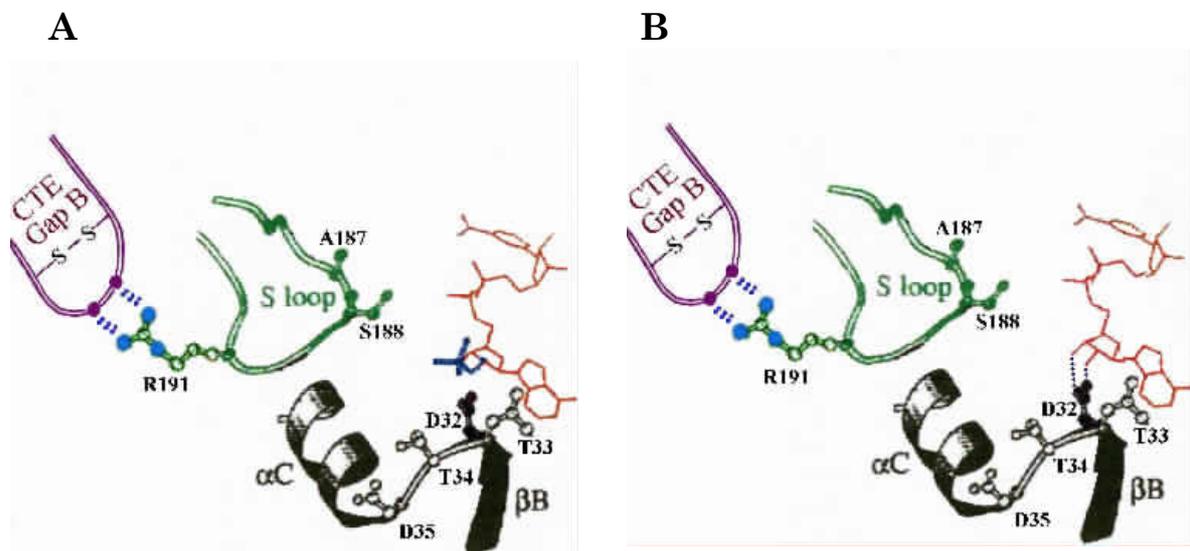


Abbildung 48: Weiterentwicklung der schematischen Darstellung der Abb. 47: Die Rolle der CTE bei der Nucleotidspezifität in chloroplastidärer NAD(P)(H)-GAPDH. (A) Bindung der CTE am *S-loop* von GapA: NADPH kann nicht mehr an den Aminosäuren 187 und 188 des hereinragenden *S-loops* binden. (B) Bindung der CTE am *S-loop* von GapA: NAD kann an den Aminosäuren 32 und 33 binden. Schema nach EYSCHEN et al. (1996), modifiziert.

Erste Hinweise zur Klärung dieses Phänomens ergeben sich aus Versuchen zur Inaktivierung der intakten NAD(P)(H)-GAPDH, sowie der drei rekombinanten Isoenzyme mit H_2O_2 . Durch Inkubation der vier Isoenzyme ergab sich ein unterschiedliches Bild. Die Grundaktivitäten der 600 kDa-Form der NAD(P)(H)-GAPDH von ca. 20 U/mg Protein und der 470 kDa-Form von ca. 35 U/mg Protein sanken erheblich (s. Abb. 33, 34). Diese Inaktivierung konnte durch Zugabe von DTT_{red} rückgängig gemacht werden (s. Abb. 33). Daraus wurde gefolgert, dass die Inkubation mit H_2O_2 zu einer Oxidation noch vorhandener Disulfidbrücken innerhalb der beiden Isoenzyme geführt hat. Inkubation der beiden rekombinanten Enzymformen GapA^M und GapB^{MAC} mit H_2O_2 bewirkte jedoch keinen Aktivitätsverlust (s. Abb. 34). Dies Ergebnis zeigte, dass die Oxidation keine intra- oder intermolekularen Disulfidbrücken betreffen kann. Die Oxidation kann also ausschließlich in der CTE stattfinden, und daher sind ausschließlich die beiden die CTE-tragenden NAD(P)(H)-GAPDH- und GapB^M-Isoenzyme betroffen. Ein weiteres Ergebnis der Inkubation

von H_2O_2 mit den vier Isoenzymen zeigt, dass eine Inaktivierung nur mit NADPH und nicht mit NADH möglich ist (s. Abb. 35).

Bei der Wahl des Coenzym muß also einerseits die CTE eine Rolle spielen, andererseits muß durch eine Oxidation verhindert werden, dass NADPH im Gegensatz zu NADH im aktiven Zentrum binden kann. NAD bindet ausschließlich an der Substratbindedomäne (AS 32 und 33) (s. Abb. 47A) des Monomers z.B. P, während NADPH wahrscheinlich außer an den Aminosäuren in den Positionen 32 und 33 an den Aminosäuren in den Positionen 187 und 188 auf dem *S-loop* des Monomers z.B. Q bindet (s. Abb. 47B). Eine mögliche Erklärung, dass NADPH nach Oxidation des Enzyms nicht mehr binden kann, ist, dass der *S-loop* um einige Å aus dem aktiven Zentrum gezogen wird. Ursache dafür könnte eine Bindung der CTE am *S-loop* sein. In der 600 kDa-Form, wenn die NAD(P)(H)-GAPDH NAD umsetzt, könnte die CTE am *S-loop* gebunden sein, und ihn somit aus dem aktiven Zentrum herausziehen. In der 150 kDa-Form, wenn die NAD(P)(H)-GAPDH NADPH umsetzt, müßte die CTE folglich nicht mehr am *S-loop* gebunden sein.

Um die Theorie unterstützen zu können, dass die CTE in allen chloroplastidären NAD(P)(H)-GAPDH-Isoformen an den *S-loop* bindet, müssen jedoch Voraussetzungen gewährleistet sein. Aufgrund des hohen Anteils negativ geladener Aminosäurereste im CTE könnte die CTE an einen positiv geladenen Bereich des *S-loops* binden, sofern ein positiv geladener homologer Bereich auf dem *S-loop* vorhanden ist. In Tabelle 26 ist aufgeführt, dass sich innerhalb des *S-loops* fünf positiv geladene Arginine (R) befinden. Vergleichsstudien zeigen, dass die fünf positiv geladenen Arginine in den Positionen 183, 190, 193, 194 und 196 in allen chloroplastidären NAD(P)(H)-GAPDH-Isoformen konserviert sind (s. Tab. 26). Die Voraussetzungen dafür, dass eine Bindung der CTE am *S-loop* stattfinden kann, sind daher erfüllt. Die Bindung erfolgt vermutlich über Salzbrücken.

In cytosolischer NAD(H)-GAPDH sind im Vergleich zwei Arginine in den Positionen 194 und 197 konserviert. Weiterhin befindet sich ein positiv geladenes Lysin (K) in der Position 190 (s. Tab. 26).

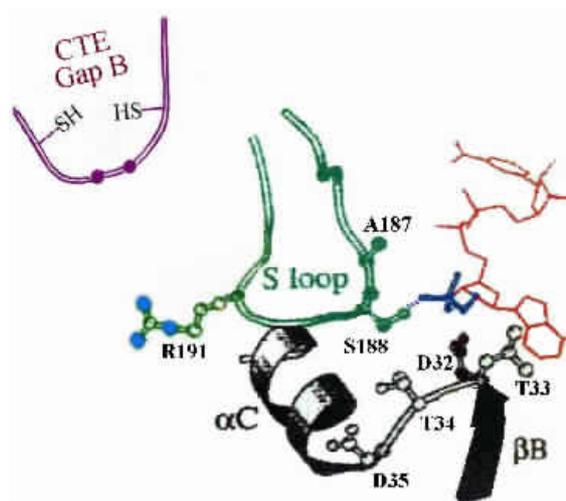


Abbildung 49: Weiterentwicklung der schematischen Darstellung der Abb. 47 und 48: Die Rolle der CTE bei der Nucleotidspezifität in chloroplastidärer NAD(P)(H)-GAPDH. Dissoziation der CTE vom *S-loop*: Es können sowohl NADP(H) Positionen 187 und 188, als auch NAD(H) in den Positionen 32 und 33 binden. Schema nach nach EYSCHEN et al. (1996), modifiziert.

Die schematische Darstellung in der Abbildung 48A veranschaulicht, dass eine Bindung von NADPH an der Aminosäure 188 auf dem *S-loop* nicht möglich wäre, wenn dieser durch Bindung der CTE aus dem aktiven Zentrum herausgezogen wurde. Der Umsatz von NAD

wäre unter diesen Bedingungen jedoch gewährleistet, da NADH weiterhin an der Aminosäure D 32 binden könnte (Abb. 48B).

Wenn durch Dissoziation der 600 kDa-Form die CTE vom *S-loop* getrennt ist, ragt der *S-loop* in das aktive Zentrum hinein, so dass die Phosphatgruppe von NADPH am Serin 188 binden kann (s. Abb. 49).

Aus den in Abb. 47, 48 und 49 vorgestellten Modellen der Coenzymbindung lassen sich folgende signifikante Schlüsse ziehen: Wenn die CTE in der 600 kDa-Form über Salzbrücken am *S-loop* eines benachbarten Tetramers gebunden ist, können die Coenzyme NADPH und NADP nicht an der Aminosäure in der Position 188 auf dem *S-loop* binden. Das Enzym ist vollkommen inaktiv. Das bedeutet, dass die Grundaktivitäten der NAD(P)(H)-GAPDH als isoliertes Enzym oder im isolierten Dunkel-adaptierten Chloroplasten, die mit NADPH gemessen werden, ausschließlich durch noch bestehende reduzierte Disulfidbrücken in der CTE resultieren. In der 600 kDa-Form kann jedoch NAD binden, wie es für die Rolle der NAD(P)(H)-GAPDH im Dunkelmetabolismus gefordert ist.

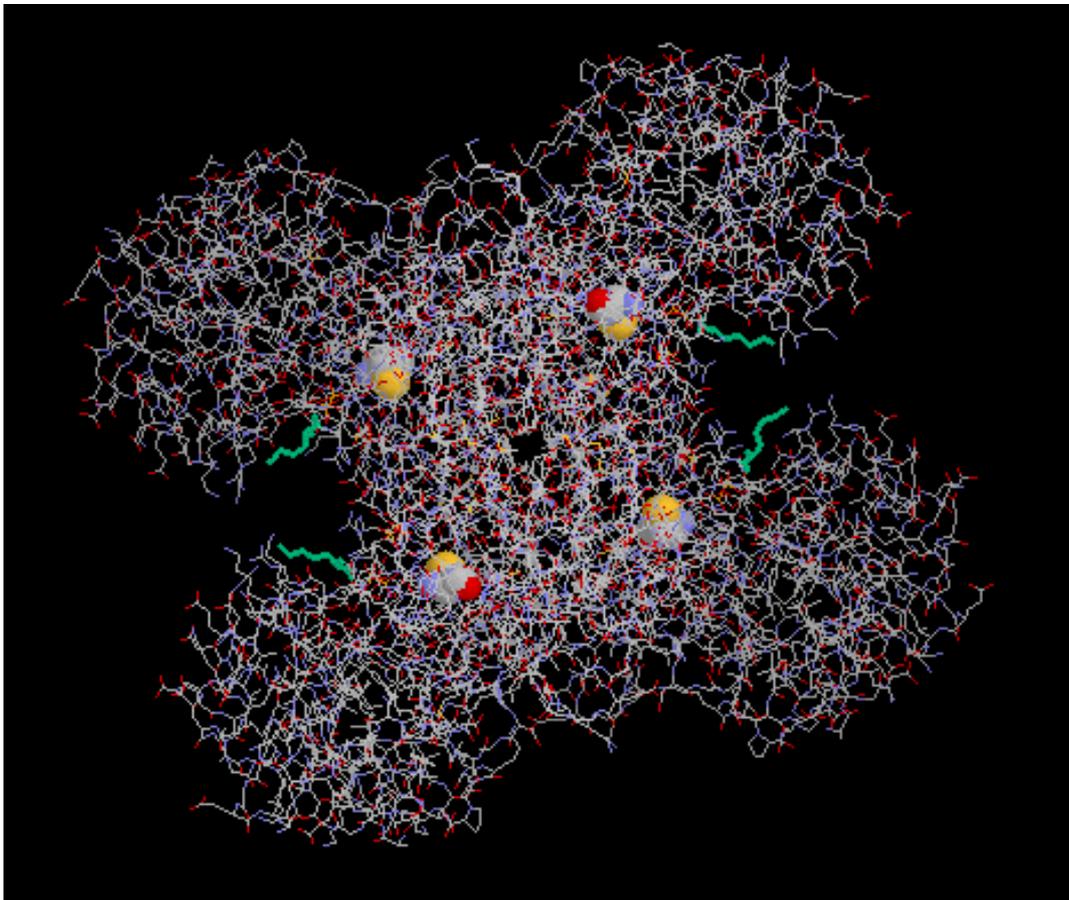


Abbildung 50: Strukturelle Darstellung der tetrameren Form von *B. stearothersophilus*. Die Strukturdaten 1gd1 für *B. stearothersophilus* wurden der *Brookhaven Data Bank* entnommen und mittels des Programms "Rasmol" dargestellt. Das positiv geladene Lysin in der Position 190 ist grün gekennzeichnet. Die Cysteine 149 inklusive Kohlenstoff, Sauerstoff, Wasserstoff und Schwefel der vier Untereinheiten sind als graue, blaue, rote bzw. gelbe Kugeln dargestellt.

Rekombinant hergestellte GapA^M- und GapB^{M^{AC}}-Tetramere sind beide sowohl mit NAD(H), als auch mit NADP(H) katalytisch aktiv. Auffällig ist jedoch, dass GapB^{M^{AC}} mit 120 U/mg Protein doppelt so aktiv ist als GapA^M mit ca. 60 U/mg Protein, wenn mit NADPH gemessen wird. Die bislang einzige mögliche Erklärung besteht darin, dass GapA^M in der Position 33

ein Threonin (T), GapB ein Serin (S) besitzt. Threonin besitzt im Vergleich zu Serin eine zusätzliche Methylgruppe. Ob die Methylgruppe Ursache für die unterschiedlichen Maximalaktivitäten ist, ist unbekannt.

Damit die CTE an den *S-loop* binden kann, müssen eine oder mehrere positiv geladene Arginine innerhalb eines (A_2B_2)-Tetramers von außen zugänglich sein.

In der Abbildung 50 ist die Struktur von *B. stearothermophilus* gezeigt, um zu untersuchen, ob der *S-loop*, an den theoretisch die CTE binden soll, nach außen exponiert ist. Stellvertretend für die positiv geladenen Arginine im *S-loop* höherer Pflanzen und Blau-, Rot- und Grünalgen wurde das in der Position 190 positiv geladene Lysin von *B. stearothermophilus* farblich gekennzeichnet. Aus der Abbildung 50 geht hervor, dass das Lysin von außen zugänglich ist. Theoretisch könnte die CTE über elektrostatische Wechselwirkungen mit ihren negativ geladenen Aminosäuren (s. Abb. 44) an das Lysin, bzw. mit hoher Wahrscheinlichkeit in höheren Pflanzen, an das positiv geladene Arginin 190 oder weiteren Argininen des *S-loops* binden.

4.2.4. Die Aktivierung der chloroplastidären NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat und anderer höherer Pflanzen in struktureller Hinsicht

Die in den Kapiteln 4.2.1. bis 4.2.3.4. diskutierten Ergebnisse und aufgeführten Theorien und Modelle zeigen, dass die CTE für die Aggregation/Dissoziation, die Redoxmodulation und die Nucleotidspezifität eine signifikante Rolle spielt. Weiterhin wird kurz zusammengefaßt, wie die chloroplastidäre NAD(P)(H)-GAPDH aus Spinat *in vivo* nach einem in dieser Arbeit entwickelten Konzept in Koordination dieser Gesichtspunkte reguliert wird. Die beschriebene A_4 -Form, sowie das Vorkommen der NAD(P)(H)-GAPDH in Multienzymkomplexen oder in Kombination mit CP12 und PRK in Spinat bleiben hier vorerst ausgeschlossen (vgl. Kap. 4.3.).

Die chloroplastidäre NAD(P)(H)-GAPDH in Spinat besteht in der inaktiven hexadecameren Form aus acht A- und acht B-Untereinheiten in der Zusammensetzung $(A_2B_2)_4$. GapA und GapB sind katalytisch aktiv. In der 600 kDa-Form der NAD(P)(H)-GAPDH bindet die stark negativ geladene CTE vermutlich über elektrostatische Wechselwirkungen an positiv geladene Arginine von *S-loops*. Da acht CTEs der B-Untereinheiten nur an acht *S-loops* binden können, wird davon ausgegangen, dass sie an jeweils acht benachbarte A-Untereinheiten und nicht an benachbarte B-Untereinheiten binden. Die CTE besitzt in der hexadecameren Form eine Disulfidbrücke. Inter- oder intramolekulare Disulfidbrücken der NAD(P)(H)-GAPDH sind nicht existent. Während die CTE am *S-loop* bindet, ist eine Bindung von NADPH nicht möglich, jedoch für NAD. *In vivo* werden in Dunkel-adaptierten Chloroplasten ausschließlich NAD und GAP umgesetzt (vgl. Kap. 4.1.4.2.). Bei Belichtung werden zunächst durch Reduktion die Disulfidbrücken in den CTEs aufgebrochen. Dadurch wird die gesamte Struktur des Hexadecamers 'aufgelockert'. Das Enzym ist jedoch weiterhin inaktiv, da 1,3bisPGA kurz nach Belichtung noch in zu geringen Konzentrationen vorkommt, um umgesetzt werden zu können. NADPH ist aufgrund des noch gebundenen CTE am *S-loop* von den Aminosäuren 188 und 187 auf dem *S-loop* räumlich zu weit entfernt, um zu binden. Nachdem die Disulfidbrücken in den CTEs aufgebrochen sind, und sich eine 1,3bisPGA-Konzentration von ca. 0,8 μM eingestellt hat, wird die CTE durch den alleinigen Effektor der NAD(P)(H)-GAPDH und gleichzeitigem Substrat 1,3bisPGA von seiner Bindestelle am *S-loop* abgetrennt. Die Abtrennung erfolgt aufgrund der negativ geladenen Phosphatgruppen von 1,3bisPGA. Das Enzym dissoziiert je nach vorhandener Effektorkonzentration zu einem entsprechenden Anteil in die tetramere Form. Durch die Dissoziation ist es NADPH möglich, an den Aminosäuren 187 und 188 zu binden. Die tetramere Form ist die aktive Form der NAD(P)(H)-GAPDH. *In vivo* werden in isolierten intakten belichteten Chloroplasten nach

6minütiger Belichtung Aktivitäten von ca. $600 \mu\text{mol (mg Chl)}^{-1} \text{ h}^{-1}$ gemessen, wobei das Enzym zu ca. 50-60% dissoziiert vorliegt.

Zu den *in vitro* gemessenen Aktivierungen gibt es Unterschiede und Gemeinsamkeiten: Für die Abtrennung der CTE's kommen *in vitro* mehrere Effektoren in Frage: NADPH, NADP, 1,3bisPGA und ATP. Gemeinsam ist den aktivatorisch wirkenden Metaboliten, dass sie eine oder mehrere negativ geladene Phosphatgruppen besitzen, die die Salzbrücke zwischen den negativ geladenen Bereichen der CTE und den positiv geladenen Argininen der *S-loops* aufbrechen können. Die Aufhebung der elektrostatischen Wechselwirkung kann ebenfalls durch hohen Druck oder durch chaotrope Anionen erreicht werden. Für die Aktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH *in vitro* durch Metabolite ist es nicht notwendig, dass das Enzym reduziert wurde.

Die Inaktivierung der NAD(P)(H)-GAPDH *in vivo* beinhaltet zunächst eine Oxidation der CTEs durch ein bislang nicht bekanntes Disulfid. Nach Absinken des 1,3bisPGA-Gehalts wird die Aggregation in die 600 kDa-Form über NAD und vermutlich zusätzlich über NADH und GAP vermittelt.

4.3. Alternative Modelle - *Multienzymkomplexe*

Neben der in dieser Arbeit untersuchten $(A_2B_2)_4$ -NAD(P)(H)-GAPDH wird NAD(P)(H)-GAPDH von mehreren Arbeitsgruppen als ein Teil eines Multienzymkomplexes (ME-Komplex) beschrieben, in dem verschiedene Enzyme des Calvin-Cyclus miteinander komplexiert vorliegen. Als Sinn und Zweck solcher Komplexe wird *metabolic channeling* der Intermediate diskutiert (GONTERO et al. 1994, RICARD et al. 1994). Der Hauptanteil solcher Komplexe wurde in Chloroplasten aus Spinat, Erbse und Grünalgen gefunden, während sie in Cyanobakterien und photosynthetisch aktiven Proteobakterien nicht beobachtet wurden. Die Arbeiten unterscheiden sich hauptsächlich darin, dass sich die Anzahl der beteiligten Enzyme und die Art der Protein-Protein-Wechselwirkungen unterscheiden. Auf diesem Gebiet sind bis heute viele Fragen offen, und es gibt keinen Konsensus bezüglich Funktion oder Signifikanz. Unterschiedliche Komplexe wurden mittels Ultrazentrifugation in Sucrose-Gradienten, durch Ausschlußchromatographie in Anwesenheit stabilisierender Komponenten wie Glycerol und NAD, oder durch Ionen-Austausch-Chromatographie und Immunelektronenmikroskopie isoliert. Im Folgenden werden einige beschriebene Komplexe und deren Besonderheiten diskutiert, wobei zwischen Komplexen in höheren Pflanzen und in Algen unterschieden wird. Eine detaillierte Auseinandersetzung mit den angewandten Methoden und dem Sinn solcher Komplexe soll hier nicht erfolgen. Dennoch werden einige ausgesuchte Komplexe diskutiert.

4.3.1. Multienzymkomplexe und Enzym-Interaktionen in höheren Pflanzen

Ein ME-Komplex, bestehend aus RubisCO, RPI (90 kDa) und PRK (54 kDa) wurde in Erbsen-Blättern mit 800-850 kDa beschrieben (SAINIS & HARRIS 1986). Ein vergleichbarer Komplex mit anderen prozentualen Verhältnissen wurde auch für Spinat gezeigt (SAINIS et al. 1989). Ebenfalls in Spinat fanden GONTERO et al. (1988, 1993) und RAULT et al. (1991, 1993) einen Fünf-Enzym-Komplex, bestehend aus RPI, PRK, RubisCO, PGK und NAD(P)(H)-GAPDH mit einem Molekulargewicht von 520-536 kDa. Das stöchiometrische Verhältnis beträgt $PRK_2:GapA_2:GapB_2:RubisCO_2S_4$. In dieser Rechnung wurden die Molekulargewichte von RPI und PGK mit jeweils einem Monomer angenommen, da sie quantitativ nicht bestimmbar waren. Zusätzlich wurde ein in diesem Komplex gefundenes, aber bislang nicht identifiziertes Polypeptid von 65 kDa addiert. Da in dem beschriebenen Komplex das Molekulargewicht der RubisCO mit 550 kDa zu groß ist, wurde vorgeschlagen, daß RubisCO in der L_2S_4 -Form vorkommt (RAULT et al 1993). Bislang wurde die RubisCO jedoch ausschließlich in der L_8S_8 -Form (550 kDa) kristallisiert (SHIBATA et al. 1996) und gilt

in höheren Pflanzen auch nur in dieser Form als katalytisch aktiv. Eine kleinere Form der RubisCO, die L₂S₂-Form kommt ausschließlich in photosynthetisch aktiven Bakterien vor (mündl. Mitteilung, P. Quick, Sheffield). Darüberhinaus wird diskutiert, dass die RubisCO durch die RubisCO-Activase in die aktive Form überführt werden muß. RubisCO-Activase entfernt bei diesem Prozeß Ribulose-5-Phosphat von der RubisCO, muß also an spezifischen Bindungsstellen der RubisCO angreifen können (BUCHANAN et al. 2001). Dass der in Spinat beschriebene ME-Komplex existiert, scheint daher unter den Gesichtspunkten der Größenangabe und der u.U. nicht gegebenen Funktionsmöglichkeit der RubisCO-Activase fragwürdig. Die Enzyme des ME-Komplexes in Spinat katalysieren im Calvin-Cyclus aufeinanderfolgende Reaktionen, weshalb ein *metabolic channeling* angenommen wurde.

Nachdem die Arbeitsgruppe um Easterby & Powls (NICHOLSON et al. 1987) einen Komplex zwischen PRK und NAD(P)(H)-GAPDH in der Grünalge *Scenedesmus obliquus* nachweisen konnten (vgl. Kap. 4.3.2.), fanden sie in Spinat einen ähnlichen Komplex (CLASPER et al. 1991). Dieser Komplex besteht außer aus NAD(P)(H)-GAPDH-A₂B₂-Tetrameren und PRK-Dimeren aus der zusätzlichen A₄-Form der NAD(P)(H)-GAPDH. Das Molekulargewicht beträgt 600 kDa und die Zusammensetzung des Komplexes wird mit folgenden Strukturen vorgeschlagen: (A₂B₂)₂A₄R₂ oder (A₂B₂)(A₄)₂R₂. Das Molekulargewicht von A (GapA) beträgt 39,5 kDa, von B (GapB) 41,5 kDa und R (Untereinheit der PRK) 40,5 kDa. Zusätzlich wurde in Spinat von diesen Autoren die 600 kDa-(A₂B₂)₄-NAD(P)(H)-GAPDH beschrieben.

Ein weiterer ME-Komplex, bestehend aus RPI, RubisCO, NAD(P)(H)-GAPDH, SBPase und FNR mit 900 kDa wurde ebenfalls für Spinat von SÜSS et al. (1993) beschrieben. Sämtliche Enzyme dieses Komplexes wurden mittels *Gold Immunolabeling* an den äußeren Membranen von Thylakoiden gefunden; mit Ausnahme von RubisCO, welches zusätzlich im Stroma nachgewiesen wurde (SÜSS et al. 1993, 1995, ADLER et al. 1993). In Chloroplasten von Erbsen wurden zwei weitere Komplexe, bestehend aus NAD(P)(H)-GAPDH und Aldolase, bzw. Aldolase und TPI charakterisiert. In dem Aldolase-TPI-Komplex können Aldolase-gebundenes GAP und TPI-gebundenes GAP als Substrat der NAD(P)(H)-GAPDH fungieren (ANDERSON et al. 1995). Weiterhin wurde von einem Bi-Enzymkomplex, bestehend aus NAD(P)(H)-GAPDH und PGK, in Weizenchloroplasten berichtet, der den Transfer von 1,3bisPGA zwischen den beiden Enzymen erleichtern soll (MALHOTRA et al. 1987, MACIOSZEK & ANDERSON 1987, MACIOSZEK et al. 1990).

4.3.2. Enzym-Interaktionen in Algen

Der in Kapitel 4.3.1. aufgeführte Komplex zwischen NAD(P)(H)-GAPDH und PRK aus *Scenedesmus obliquus* wurde mit einem Molekulargewicht von 560 kDa im Verhältnis von GAPDH₈/PRK₆ von NICHOLSON et al. (1987) beschrieben. Zuvor wurde die PRK allein von der gleichen Arbeitsgruppe mit einem Molekulargewicht von 470 kDa nachgewiesen (LAZARO et al. 1986), und später wurde von NICHOLSON et al. (1987) diskutiert, dass es sich dabei ebenfalls um einen PRK/GAPDH-Komplex, jedoch in der Zusammensetzung GAPDH₈/PRK₄, handeln könnte. Das Molekulargewicht einer Untereinheit von PRK beträgt 42 kDa, von NAD(P)(H)-GAPDH (GapA) 39 kDa.

Auch für *Chlamydomons reinhardtii* wurde ein PRK₄GAPDH₈-Komplex mit einem Molekulargewicht von 460 ± 30 kDa beschrieben (AVILAN et al. 1997, LEBRETON et al. 1997). Das Molekulargewicht der NAD(P)(H)-GAPDH-Untereinheit beträgt hier 38 kDa und das Molekulargewicht der PRK-Untereinheit 40 kDa. Dieser Komplex wird nur in Dunkelgehaltenen Chloroplasten gefunden, weshalb ein *metabolic channeling* im klassischen Sinne hier ausgeschlossen werden kann. Zudem arbeiten beide Enzyme nicht direkt zusammen.

4.3.3. NAD(P)(H)-GAPDH/PRK/CP12-Komplexe

Spinat-CP12 ist ein kleines, 8-12 kDa großes, nicht enzymatisch aktives Protein. Charakteristisch sind zwei durch wenige Aminosäuren getrennte Peptidschlaufen, die durch Oxidation und Bildung einer Disulfidbrücke an zwei Cysteinen entstehen. Am N-Terminus befindet sich eine lange Kette von Aminosäuren, welche zwei negativ und zwei positiv geladene Aminosäuren besitzt. Die Aminosäure-Sequenz des C-terminalen *loops* zeigt hohe Homologien mit der CTE der NAD(P)(H)-GAPDH-Untereinheit B aus Spinat. (POHLMAYER et al. 1996). Untersuchungen mittels des *yeast two-hybrid systems* ergaben, dass der C-terminale *loop* an NAD(P)(H)-GAPDH, der N-terminale *loop* an PRK bindet. Es handelt sich dabei nicht um kovalente Bindungen, sondern um Salzbrücken, welche zwischen CP12 und NAD(P)(H)-GAPDH, bzw. PRK bestehen. Die Bindung über Salzbrücken erfolgt ebenfalls zwischen negativ geladenen Aminosäuren der CTE von GapB und positiv geladenen Aminosäuren des *S-loops* von GapA (s. Abb. 48). GAPDH/PRK/CP12-Komplexe wurden in *Chlamydomonas reinhardtii*, *Synechocystis sp.* und in Spinat nachgewiesen (WEDEL et al. 1997, WEDEL & SOLL 1998, SCHEIBE et al. 2002). CP12 wurde außerdem in Tabak, Erbse und Moosen identifiziert und zeigt untereinander sehr hohe Homologien. Es ist wahrscheinlich, anzunehmen, dass in den genannten höheren Pflanzen neben der (A₂B₂)₄-NAD(P)(H)-GAPDH ein GAPDH/PRK/CP12-Komplex vorkommt. In Algen, in denen NAD(P)(H)-GAPDH redoxmoduliert ist, besteht dieser Komplex aus GAPDH (A₄), PRK und CP12.

Aufgrund der beschriebenen unterschiedlichen Zusammensetzung der MEs in höheren Pflanzen und der Tatsache, dass diese Komplexe in der Regel im Dunkel-gehaltenen Chloroplasten auftreten, werden sie in dieser Arbeit für zumindest fragwürdig angesehen, wenn es um *metabolic channeling* geht. Denn in den genannten Arbeiten wird beschrieben, dass die Komplexe in Anwesenheit von reduzierten Thiolen oder Licht dissoziieren. Hinzu kommt, dass RubisCO im Verhältnis zu den anderen Calvin-Cyclus-Enzymen in Chloroplasten reichlich vorhanden ist und ausschließlich in der 550 kDa-Form katalytisch aktiv ist. Aufgrund der Größe des Molekulargewichts können weiterhin nicht alle aktiven Calvin-Cyclus-Enzyme in diesen MEs vorkommen (RUTNER 1970). Im Sinne von MARTIN et al. (1999) wird in dieser Arbeit die Meinung vertreten, dass Interaktionen zwischen verschiedenen Enzymen des Calvin-Cyclus bestehen, aber es nach wie vor ungeklärt ist, wieviele Enzyme interagieren und ob dies in verschiedenen Organismen (z.B. Algen und höheren Pflanzen) unterschiedlich sein kann.

5. Zusammenfassung

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen dienten dazu, die Eigenschaften und Grundlagen zur Regulation der chloroplastidären NAD(P)(H)-GAPDH im Wechsel zwischen Licht- und Dunkelmetabolismus aufzuklären. Dazu wurden Untersuchungen mit dem System 'isoliertes Enzym' und dem System 'isolierte Chloroplasten' durchgeführt. Durch die Herstellung proteolysierter NAD(P)(H)-GAPDH und rekombinanter Untereinheiten GapA^M, GapB^M und GapB^{M^ΔC}, sowie gleichzeitig exprimierter GapA^MB^M und GapA^MB^{M^ΔC} war die Möglichkeit geschaffen, die Funktion der CTE bei der Regulation zu untersuchen. Eigenschaften von NAD(H)-abhängiger plastidärer GapCp konnten mit angereinigtem und rekombinant hergestelltem Enzym aus roter Paprikafrucht ermittelt werden.

Regulation von NAD(P)(H)-GAPDH in isolierten intakten Chloroplasten aus Spinat

Durch Reduktion von NAD(P)(H)-GAPDH in belichteten isolierten intakten Spinatplastiden, vermutlich durch Thioredoxin, ist das Enzym sensitiver gegenüber 1,3bisPGA, da der K_a -Wert von 17-21 μ M auf ca. 1-2 μ M gesenkt wird. Die gleichzeitig steigende Konzentration von 1,3bisPGA auf ca. 0,8 μ M im Chloroplasten führt zur Aktivierung und damit verbundener Dissoziation des Enzyms. Die Aktivierung betrifft ausschließlich die NADPH-abhängigen Aktivitäten. NADPH, NADP und ATP scheiden als Aktivatoren *in vivo* aus, da sie bei im Chloroplasten im Licht und im Dunkeln herrschenden Konzentrationen von 140 μ M NAD das Enzym nicht aktivieren und unphysiologisch hohe Konzentrationen der Effektoren zur Aktivierung des Enzyms benötigt würden. Die Inaktivierung im Dunkeln erfolgt durch Absenkung der 1,3bisPGA-Konzentration, und das Enzym wird durch ein bislang nicht bekanntes Oxidationsmittel oxidiert. NAD, sowie möglicherweise auch GAP und NADH sind an der Inaktivierung und gleichzeitigen Aggregation beteiligt.

Die CTE der Untereinheit B ist für die Aggregation/Dissoziation von NAD(P)(H)-GAPDH verantwortlich

Im Vergleich von NAD(P)(H)-GAPDH-Isoenzymen besitzt ausschließlich GapB aus Chloroplasten höherer Pflanzen eine CTE von 28-32 Aminosäuren Länge. Sie ist gekennzeichnet durch zwei konservierte Cysteine, zwischen denen sich acht Aminosäuren befinden. In der Mitte dieser acht Aminosäuren befindet sich ein Prolin, welches u.a. für den Richtungswechsel bei der Faltung eines Proteins verantwortlich ist, so dass sich zwischen den beiden Cysteinen eine Disulfidbrücke ausbilden könnte. Die CTE aus Spinat besitzt außerdem einen hohen Anteil von sieben negativ geladenen Aminosäuren. In Rahmen dieser Arbeit wurde ein Modell entwickelt, welches beinhaltet, dass die Aggregation von vier (A₂B₂)-Tetrameren über Salzbrückenbindung negativ geladener Aminosäuren der CTE und nach außen exponierten positiv geladenen Aminosäuren von GapA vermittelt wird. Ergebnisse mit NAD(P)(H)-GAPDH, der die CTE fehlt, d.h. proteolysierte NAD(P)(H)-GAPDH und rekombinant hergestellte GapA^M, GapB^{M^ΔC} und GapA^MB^{M^ΔC} bestätigen das Modell. Die drei tetrameren Formen, sowie die gleichzeitig exprimierte GapA^MB^{M^ΔC} sind nicht fähig, zu aggregieren. Ausschließlich GapB und die gleichzeitig exprimierte GapA^MB^{M^ΔC} aggregieren in eine hochmolekulare Form von ca. 470 kDa, bzw. eine Mischung von 470 und 300 kDa.

Die CTE der Untereinheit B ist für die Redoxmodulation von NAD(P)(H)-GAPDH verantwortlich.

NAD(P)(H)-GAPDH höherer Pflanzen besitzt fünf konservierte Cysteine: 18, 149, 153, 274 und 285, wovon sich Cystein 149 und Cystein 153 im aktiven Zentrum befinden. Cystein 153 in nicht an der Katalyse beteiligt. In der CTE von GapB sind zusätzlich zwei Cysteine 355 und 364 konserviert. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die lange Zeit

prognostizierte intramolekulare Disulfidbrücke zwischen Cystein 18 und 285 nicht vorhanden ist. Dies ergibt sich aus der Tatsache, dass in Algen, deren NAD(P)(H)-GAPDH als redoxmoduliert beschrieben ist, Cystein 285 nicht vorkommt. Weiterhin zeigen eigene Ergebnisse, dass NAD(P)(H)-GAPDH, der die CTE fehlt, d.h. proteolytisierte NAD(P)(H)-GAPDH, rekombinant hergestellte GapA^M und GapB^{M^{AC}}, weder durch DTT_{red} noch in Kombination mit 1,3bisPGA aktiviert werden. Die tetrameren Formen sind nicht redoxmoduliert. Daraus wird gefolgert, dass die für die Redoxmodulation verantwortliche Disulfidbrücke sich in der CTE von GapB befindet.

Die CTE der Untereinheit B ist für die Nucleotidspezifität von NAD(P)(H)-GAPDH verantwortlich

Die Bindung von NADPH, bzw. NADH in den verschiedenen Isoenzymen von NAD(P)(H)-GAPDH hängt von der Aminosäurezusammensetzung in den Positionen 32, 33, 187 und 188 ab. Die Aminosäuren 187 und 188 befinden sich auf einem *S-loop*, der in das aktive Zentrum eines benachbarten Monomers hineinreicht und mit ihm eine funktionelle Einheit bildet. NAD(H) wird in den Positionen 32 und 33 gebunden; eine Bindung von NADP(H) ist durch sterische Hinderung und Ladung des Prolins 188, welches in cytosolischer NAD(H)-GAPDH vorkommt, nicht möglich. Da chloroplastidäre NAD(P)(H)-GAPDH in der Position 188 ein Serin besitzt, kann die Phosphatgruppe von NADP(H) binden. Aufgrund der Affinitäten der inaktiven 600 kDa- und aktiven 150 kDa-NAD(P)(H)-GAPDH für NADPH, bzw. der in Chloroplasten im Licht wie im Dunkeln herrschenden NADPH-Konzentrationen, wäre es theoretisch möglich, dass das Coenzym sowohl bei Belichtung als auch im Dunkeln umgesetzt wird. Während des Licht-Dunkel-Übergangs wechselt das Enzym jedoch zwischen dem Coenzym NADPH und NAD. In dieser Arbeit konnte anhand eines Modells aufgezeigt werden, dass im Dunkel-adaptierten Chloroplasten die Bindung von NADPH an der Aminosäure 188 unterbunden ist, da der *S-loop* um einige A aus dem aktiven Zentrum gezogen wird. Ursache dafür ist mit großer Wahrscheinlichkeit die CTE, die in der 600 kDa-Form an positiv geladenen Aminosäuren des *S-loops* bindet.

Die Aktivierung von NAD(P)(H)-GAPDH in struktureller Hinsicht.

Die 600 kDa-Form von NAD(P)(H)-GAPDH ist mit dem Coenzym NADPH inaktiv, da sich innerhalb der CTE eine Disulfidbrücke gebildet hat. Die strukturelle Änderung der CTE erlaubt es, dass negativ geladene Aminosäuren der CTE an nach außen exponierten positiv geladenen Aminosäuren eines *S-loops* von GapA binden können. Dadurch ist eine Bindung von NADPH im aktiven Zentrum an den *S-loop* nicht möglich. NAD kann ungehindert binden. Bei einsetzender Belichtung wird die Disulfidbrücke der CTE aufgebrochen, ohne dass das Enzym dissoziiert. Mit steigenden Konzentrationen von dreifach negativ geladenem 1,3bisPGA wird die Salzbrückenbindung zwischen der CTE und dem *S-loop* gelöst, so dass NAD(P)(H)-GAPDH in vier Tetramere dissoziiert und gleichzeitig NADPH umsetzen kann.

6 Literaturverzeichnis

- ADLER, K., ARKONA, C., MANTEUFFEL, R., SÜSS, K.-H. (1993) Electron-microscopical localization of chloroplast proteins by immunogold labelling on cryo-embedded spinach leaves. *CELL BIOL. INTERNATIONAL* 17, 213-220
- AMINO, S. (1992) Intracellular conversion of malate and localization of enzymes involved in the metabolism of malate in photoautotrophic cell cultures of *Chenopodium rubrum*. *Z. NATURFORSCH.* 47, 545-552
- ANDERSON, L. E., GOLDBERGER-GORDON, I. M., LI, D., TANG, X.-Y., XIANG, M., PRAKASH, N. (1995) Enzyme-enzyme interaction in the chloroplast: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, triose phosphate isomerase and aldolase. *PLANTA* 196, 245-255
- ARNON, D. I. (1949) Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *PLANT PHYSIOL.* 24, 1-15
- AUSTIN, P. A., STUART ROSS, I., MILLS, J. D. (1992) Light/dark regulation of photosynthetic enzymes within intact cells of the cyanobacterium *Nostoc sp. Mac.*. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 1099, 226-232
- AVILAN, L., GONTERO, B., LEBRETON, S., RICARD, J. (1997) Memory and imprinting effects in multienzyme complexes. I. Isolation, dissociation, and reassociation of a phosphoribulokinase-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complex from *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *EUR. J. BIOCHEM.* 246, 78-84
- BAALMANN, E. (1993) Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus der chloroplastidären Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase aus Spinat. Diplomarbeit, Universität Osnabrück
- BAALMANN, E., BACKHAUSEN, J. E., KITZMANN, C., SCHEIBE, R. (1994) Regulation of NADP-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase activity in spinach chloroplasts. *BOT. ACTA* 107, 313-320
- BAALMANN, E., BACKHAUSEN, J. E., RAK, C., VETTER, S., SCHEIBE, R. (1995) Reductive modification and nonreductive activation of purified spinach chloroplast NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS.* 324, 201-208
- BAALMANN, E., SCHEIBE, R., CERFF, R., MARTIN, W. (1996) Functional studies of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase subunits A and B expressed in *Escherichia coli*: Formation of highly active A₄ and B₄ homotetramers and evidence that aggregation of the B₄ complex is mediated by the B subunit carboxy terminus. *PLANT MOL. BIOL.* 32, 505-513
- BACKHAUSEN, J. E., KITZMANN, C., SCHEIBE, R. (1994) Competition between electron acceptors in photosynthesis: Regulation of the malate valve during CO₂ fixation and nitrite reduction. *PHOTOSYNTH. RES.* 42, 75-86
- BACKHAUSEN, J. E., VETTER, S., BAALMANN, E., KITZMANN, C., SCHEIBE, R. (1998) NAD-dependent malate dehydrogenase and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase isoenzymes play an important role in dark metabolism of various plastid types. *PLANTA* 205, 359-366
- BANAS, T., MALARSKA, A., KROTHKIEWSKA, B., MARCINKOWSKA, A. (1987) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase investigation on the regions responsible for self-assembly of subunits. *COMP. BIOCHEM. PHYSIOL.* 87B, 391-401
- BEN-BASSAT, A., BAUER, K., CHANG, S.-Y., MYAMBO, K., BOOSMAN, A., CHANG, S. (1987) Processing of the initiation methionine from proteins: Properties of the *Escherichia coli* methionine aminopeptidase and its gene structure. *J. BACT.* 169, 751-757
- BERGMAYER, H. U. (1974) Die biochemischen Reagentien. In: *METHODEN DER ENZYMATISCHEN ANALYSE*, 3. Auflage, (Bergmayer, H. U., Ed.), pp. 445-593, Verlag Chemie, Weinheim
- BERKEMEYER, M., SCHEIBE, R., OCHERETINA, O. (1998) A novel NAD-dependent malate dehydrogenase from chloroplasts of *Arabidopsis thaliana* L., that is not redox-regulated. *J. BIOL. CHEM.* 273, 27927-27933
- BIESECKER, G., HARRIS, J. I., THIERRY, J. C., WALKER, J. E., WONACOTT, A. J. (1977) Sequence and structure of D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. *NATURE* 266, 328-333

- BRADFORD, M. M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *ANAL. BIOCHEM.* 72, 248-254
- BRANLANT, G., BRANLANT, C.** (1985) Nucleotide sequence of the *Escherichia coli* gap gene. *EUR. J. BIOCHEM.* 150, 61-66
- BREMER, K.** (1985) Summary of green plant phylogeny and classification. *CLADISTICS* 1, 369-385
- BRINKMANN, H., CERFF, R., SALOMON, M., SOLL, J.** (1989) Cloning and sequence analysis of cDNAs encoding the cytosolic precursors of subunits GAPA and GAPB of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from pea and spinach. *PLANT MOL. BIOL.* 13, 81-94
- BUCHANAN, B. B., CRAWFORD, N. A., WOLOSIIUK, R. A.** (1978) Ferredoxin/Thioredoxin system functions with effectors in activation of NADP-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase of barley seedlings. *PLANT SCIENCE LETT.* 12, 257-264
- BUCHANAN, B. B.** (1980) Role of light in the regulation of chloroplast enzymes. *ANN. REV. PLANT PHYSIOL.* 31, 341-374
- BUCHANAN, B. B., SCHÜRMAN, P., DECOTTIGNIES, P., LOZANO, R. M.** (1994) Thioredoxin: A multifunctional regulatory protein with a bright future in technology and medicine. *ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS.* 314, 257-260
- BUCHANAN, B. B., GRUISSEM W., JONES, R L.** (eds.) (2000) *BIOCHEMISTRY & MOLECULAR BIOLOGY OF PLANTS*, American Society of Pant Physiologists, Rockvill, Maryland
- BÜCHER, T. H.** (1963) Phosphoglycerate kinase from brewer's yeast. *METH. ENZYMOL.* 5, 415-422
- BÜHNER, M., FORD, G. C., MORAS, D., OLSEN, K. W.** (1973) D-Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Three dimensional structure and evolutionary significance. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* 70, 3052-3054
- BULLOCK, W. O., FERNANDEZ, J. M., SHORT, J. M.** (1987) XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming recA *Escherichia coli* strain with β -galactosidase selection. *BIOTECHNIQUES* 5, 376-379
- BURNETTE, W. N.** (1981) "Western-blotting": Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *ANAL. BIOCHEM.* 112, 195-203
- CAMARA, B.** (1993) Plant phytoene synthase complex: Component enzymes, immunology, and biogenesis. *METH. ENZYMOL.* 214, 352-365
- CERFF, R.** (1978a) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP) from *Sinapis Alba*: Steady state kinetics. *PHYTOCHEM.* 17, 2061-2067
- CERFF, R.** (1978b) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP) from *Sinapis Alba* L.. NAD(P)-induced conformation changes of the enzyme. *EUR. J. BIOCHEM.* 82, 45-53
- CERFF, R., CHAMBERS, S. E.** (1978) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP) from *Sinapis alba* L.. Isolation and electrophoretic characterization of isoenzymes. *HOPPE-SEYLER'S Z. PHYSIOL. CHEM.* 359, 769-772
- CERFF, R.** (1979) Quaternary structure of higher plant glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *EUR. J. BIOCHEM.* 94, 243-247
- CERFF, R.** (1982) Separation and purification of NAD- and NADP-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from higher plants. In: *METHODS IN CHLOROPLAST MOLECULAR BIOLOGY* (Edelmann, M., Hallick, R. B., Chua N. H., Eds.), pp. 683-694, Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford
- CLASPER, ST., EASTERBY, J. S., POWLS, R.** (1991) Properties of two high-molecular-mass forms of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from spinach leaf, one of which also possesses latent phosphoribulokinase activity. *EUR. J. BIOCHEM.* 202, 1239-1246
- CLASPER, ST., CHELVARAJAN, R., EASTERBY, J. S., POWLS, R.** (1994) Isolation of multiple dimeric forms of phosphoribulokinase from an alga and a higher plant. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 1209, 101-106

- CLERMONT, S., CORBIER, C., MELY, Y., GERARD, D., WONACOTT, A., BRANLANT, G. (1993) Determinants of coenzyme specificity in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Role of the acidic residue in the fingerprint region of the nucleotide binding fold. *BIOCHEM.* 32, 10178-10184
- CORBIER, C., CLERMONT, S., BILLARD, P., SKARZYNSKI, T., BRANLANT, C., WONACOTT, A., BRANLANT, G. (1990) Probing the coenzyme specificity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases by site-directed mutagenesis. *BIOCHEM.* 29, 7101-7106
- DELOOZE, ST., WAGNER, E. (1983) *In vitro* and *in vivo* regulation of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase isozymes from *Chenopodium rubrum*. I. Purification and properties of isozymes. *PHYSIOL. PLANT.* 57, 231-237
- DIDIERJEAN, C., RAHUEL-CLERMONT, S., VITOUX, B., DIDEBERG, O., BRANLANT, G., AUBRY, A. (1997) A crystallographic comparison between mutated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from *Bacillus stearothermophilus* complexed with either NAD⁺ or NADP. *J. MOL. BIOL.* 268, 739-759
- DUÉE, E., OLIVIER-DEYRIS, L., FANCHON, E., CORBIER, C., BRANLANT, G., DIDEBERG, O. (1996) Comparison of the structures of wild-type and a N313T mutant of *Escherichia coli* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases: Implication for NAD binding and cooperativity. *J. MOL. BIOL.* 257, 814-838
- DUGGAN, J., ANDERSON, L. E. (1975) Light-regulation of enzyme activity in *Anacystis nidulans*. *PLANTA* 122, 293-297
- DUGGLEBY, R. G., DENNIS, D. T. (1974) Nicotinamide adenine dinucleotide-specific glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from *Pisum sativum*. Assay and steady state kinetics. *J. BIOL. CHEM.* 249, 167-174
- EDWARDS, G. E., WALKER, D. A. (Eds.) (1983) C3-C4. In: MECHANISMS, AND CELLULAR AND ENVIRONMENTAL REGULATION OF PHOTOSYNTHESIS, Blackwell Scientific Publications, Oxford, London
- EYSCHEN, J., VITOUX, B., RAHUEL-CLERMONT, S., MARRAUD, M., BRANLANT, G., CUNG, M. T. (1996) Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies on coenzyme binding and specificity in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *BIOCHEM.* 35, 6064-6072
- FERMANI, S., RIPAMONTI, A., SABATINO, P., ZANOTTI, G., SCAGLIARINI, S., SPARLA, F., TROST, P., PUPILLO, P. (2001) Crystal structure of the non-regulatory A4-isoform of spinach chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complexed with NADP. *J. MOL. BIOL.* 314, 527-542
- FERRI, G., COMERIO, G., IADAROLA, P., ZAPPONI, M. C., SPERANZA, L. (1978) Subunit structure and activity of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from spinach chloroplasts. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 522, 19-31
- FERRI, G., STOPPINI, M., IADAROLA, P., ZAPPONI, M. C., GALLIANO, M., MINCHIOTTI, L. (1987) Structural characterization of the subunits of spinach chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP). *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 915, 149-156
- FERRI, G., STOPPINI, M., MELONI, M. L., ZAPPONI, M. C., IADAROLA, P. (1990) Chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP): Amino acid sequence of the subunits from isoenzyme I and structural relationship with isoenzyme II. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 1041, 36-42
- FLIEGE, R., FLÜGGE, U. I., WERDAN, K., HELDT, H.-W. (1978) Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate and triosephosphates across the inner membrane of the envelope in spinach chloroplasts. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 502, 232-240
- FOYER, C. H., LELANDAIS, M., HARBINSON, J. (1992) Control of the quantum efficiencies of photosystem I and II, electron flow, and enzyme activation states following dark-to light transitions in pea leaves. *PLANT PHYSIOL.* 99, 979-986
- FRIDLYAND, L. E., BACKHAUSEN, J. E., HOLTGREFE, S., KITZMANN, C., SCHEIBE, R. (1997) Quantitative evaluation of the rate of 3-phosphoglycerate reduction in chloroplasts. *PLANT CELL PHYSIOL.* 38, 1177-1186
- FRIEDL, T. (1997) The evolution of the green algae. In: ORIGINS OF ALGAE AND THEIR PLASTIDS (Bhattacharya, D., ed.), pp. 87-101, Springer-Verlag, Wien

- FURBANK, R. T., FOYER, C. H., WALKER, D. A. (1987) Regulation of photosynthesis in isolated spinach chloroplasts during orthophosphate limitation. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* **894**, 552-561
- GONTERO, B., CARDENAS, M. L., RICARD, J. (1988) A functional five-enzyme complex of chloroplasts involved in the Calvin cycle. *EUR. J. BIOCHEM.* **173**, 437-443
- GONTERO, B., MULLIERT, G., RAULT, M., GIUDICI-ORTICONI, M.-T., RICARD, J. (1993) Structural and functional properties of a multi-enzyme complex from spinach chloroplasts. Modulation of the kinetic properties of enzymes in the aggregated state. *EUR. J. BIOCHEM.* **217**, 1075-1082
- GONTERO, B., GIUDICI-ORTICONI, M.-T., RICARD, J. (1994) The modulation of enzyme reaction rates within multi-enzyme complexes. Information transfer within a chloroplast multi-enzyme complex containing ribulose biphosphate carboxylase-oxygenase. *EUR. J. BIOCHEM.* **226**, 999-1006
- GOUGH, J., MURRAY, N. (1983) Sequence diversity among related genes for recognition of specific targets in DANN molecules. *J. MOL. BIOL.* **166**, 1-19
- GRAHAM, L. E. (1984) Coleochaete and the origin of land plants. *AMERICAN J. BOT.* **71**, 603-608
- GRISSOM, F. E., KAHN, J. S. (1975) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from *Euglena gracilis*. Purification and physical and chemical characterization. *ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS.* **171**, 444-458
- HABENICHT, A., HELLMANN, U., CERFF, R. (1994) Non-phosphorylating GAPDH of higher plants is a member of the aldehyde dehydrogenase superfamily with no sequence homology to phosphorylating GAPDH. *J. MOL. BIOL.* **237**, 165-171
- HAMPP, R. (1985) Luminometric method. In: *METHODS OF ENZYMATIC ANALYSIS*, Vol VII (Bergmeyer, H. U., Ed.), pp. 370-379, VCH Verlagsgesellschaft, Weinheim
- HARRIS, J. I., WATERS, M. (1976) Glyceraldehyde-3-phosphate. In: *The enzymes*, Vol III, (Boyer, P. D., ed.), pp. 1-49, Academic Press, New York, San Francisco, London
- HELDT, H.-W. (1969) Adenine nucleotide translocation in spinach chloroplasts. *FEBS LETT.* **5**, 11-14
- HELDT, H.-W., RAPLEY, L. (1970) Specific transport of inorganic phosphate, 3-phosphoglycerate and dihydroxyacetone phosphate, and of dicarboxylates across the inner membrane of spinach chloroplasts. *FEBS LETT.* **10**, 143-148
- HELDT, H.-W. (1980) Measurement of metabolite movement across the envelope and of the pH in the stroma and the thylakoid space in intact chloroplasts. *METH. ENZYMOL.* **69**, 604-613
- HOLTGREFE, S., BACKHAUSEN, J. E., KITZMANN, C., SCHEIBE, R. (1997) Regulation of steady-state photosynthesis in isolated intact chloroplasts under constant light: Responses of carbon fluxes, metabolite pools and enzyme-activation to changes of electron pressure. *PLANT CELL PHYSIOL.* **38**, 1207-1216
- HUANG, X., MILLER, W. (1991) A time-efficient, linear-space local similarity algorithm. *ADV. APL. MATH.* **12**, 337-357
- IGLESIAS, A. A., LOSADA, M. (1988) Purification and structural properties of spinach leaf NADP-dependent nonphosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS.* **260**, 830-840
- KELLY, G. J., GIBBS, M. (1973) Nonreversible D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase in plant tissues. *PLANT PHYSIOL.* **52**, 111-118
- KERSANACH, R., BRINKMANN, H., LIAUD, M.-F., ZHANG, D.-X., MARTIN, W., CERFF, R. (1994) Five identical intron positions in ancient duplicated genes of eubacterial origin. *NATURE* **367**, 387-389
- KIM, H., FEIL, I. K., VERLINDE, C. L. M. J., PETRA, P. H., HOL, W. G. J. (1995) Crystal structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Leishmania mexicana*: Implications for structure-based drug design and a new position for the inorganic phosphate binding site. *BIOCHEM.* **34**, 14975-14986
- KITZMANN, C. (1996) Regulatorische Wechselwirkung zwischen Pyridinnukleotid- und Adenylat-Pool in intakten isolierten Spinatchloroplasten. Dissertation, Humboldt-Universität, Berlin

- KOKSHAROVA, O., SCHUBERT, M., SHESTAKOV, S., CERFF, R. (1998) Genetic and biochemical evidence for distinct key functions of two highly divergent GAPDH genes in catabolic and anabolic carbon flow of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. PLANT MOL. BIOL. 36, 183-194
- KORNDÖRFER, I., STEIPE, B., HUBER, R., TOMSCHY, A., JAENICKE, R. (1995) The crystal structure of holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* at 2.5 Å resolution. J. MOL. BIOL. 246, 511-521
- KRYSTEVA, N. G., GEORGIEVA, M. A., TOMOVA, N. G. (1982) Purification, molecular weight, and subunit structure of NAD (NADP)-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Chlorella*. BIOKHIMIYA 46, 1740-1747, translated
- LAEMMLI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. NATURE 227, 680-685
- LAZARO, J. J., SUTTON, C. W., NICHOLSON, S., POWLS, R. (1986) Characterisation of two forms of phosphoribulokinase isolated from the green alga *Scenedesmus obliquus*. EUR. J. BIOCHEM. 156, 423-429
- LEBRETON, S., GONTERO, B., AVILAN, L., RICARD, J. (1997) Memory and imprinting effects in multienzyme complexes. II. Kinetics of the bienzyme complex from *Chlamydomonas reinhardtii* and hysteretic activation of chloroplast oxidized phosphoribulokinase. EUR. J. BIOCHEM. 246, 85-91
- LEEGOOD, R. C. (1990) Enzymes of the Calvin cycle. METH. PLANT BIOCHEM. 3, 15-37
- LESLIE, A. G. W., WONACOTT, A. J. (1983) Coenzyme binding in crystals of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. J. MOL. BIOL. 165, 375-391
- LI, D., STEVENS, J., SCHIFFER, M., ANDERSON, L. E. (1994) Mechanism of light modulation: Identification of potential redox-sensitive cysteines distal to catalytic site in light-activated chloroplast enzymes. BIOPHYS. J. 67, 29-35
- LI, A. D., ANDERSON, L. E. (1997) Expression and characterization of pea chloroplastic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase composed of only the B-subunit. PLANT PHYSIOL. 115, 1201-1209
- LI, A. D., STEVENS, F. J., HUPPE, H. C., KERSANACH, R., ANDERSON, L. E. (1997) *Chlamydomonas reinhardtii* NADP-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase contains the cysteine residues identified as potentially domain-locking in the higher plant enzyme and is light activated. PHOTOSYNTH. RES. 51, 167-177
- LIAUD, M. F., VALENTIN, C., MARTIN, W., BOUGET, F. Y., KLOAREG, B., CERFF, R. (1994) The evolutionary origin of red algae as deduced from the nuclear genes encoding cytosolic and chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases from *Chondrus crispus*. J. MOL. EVOL. 38, 319-327
- LILLEY, R. McC, FITZGERALD, M. P., RIENITS, K. G., WALKER, D. A. (1975) Criteria of intactness and the photosynthetic activity of spinach chloroplasts preparations. NEW PHYTOL. 75, 1-10
- LOWRY, O. H., PASSONNEAU, J. V. (eds.) (1972) In: A FLEXIBLE SYSTEM OF ENZYMATIC ANALYSIS. Academic Press, New York
- MACIOSZEK, J., ANDERSON, L. E. (1987) Changing kinetic properties of the two-enzyme phosphoglycerate kinase/ NADP-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase couple from pea chloroplasts during photosynthetic induction. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 892, 185-190
- MACIOSZEK, J., ANDERSON, J. B., ANDERSON, L. E. (1990) Isolation of chloroplastic phosphoglycerate kinase. Kinetics of the two-enzyme phosphoglycerate kinase/ glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase couple. PLANT PHYSIOL. 94, 291-296
- MALHOTRA, O. P., KUMAR, A., TIKOO, K. (1987) Isolation and quaternary structure of a complex of glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and phosphoglycerate kinase. IND. J. BIOCHEM. BIOPHYS. 24, 16-20
- MARTIN, W., BRINKMANN, H., SAVONNA, C., CERFF, R. (1993) Evidence for a chimeric nature of nuclear genomes: Eubacterial origin of eukaryotic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase genes. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 90, 8692-8696

- MARTIN, W. (1996) Is something wrong with the tree of life? *BIOESSAYS* 18, 523-527
- 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, 1-18
- MARTIN, W., SCHEIBE, R., SCHNARRENBERGER, C. (1999) The Calvin Cycle and its regulation. In: *PHYSIOLOGY AND METABOLISM* (Leegood, R. C., v. Caemmerer, S., eds.), pp. 1-43
- MARQUES, I. A., FORD, D. M., MUSCHINEK, G., ANDERSON, L. E. (1987) Photosynthetic carbon metabolism in isolated pea chloroplasts: Metabolite levels and enzyme activities. *ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS.* 252, 458-466
- MATEOS, M. I., SERRANO, A. (1992) Occurrence of phosphorylating and non-phosphorylating NADP⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in photosynthetic organisms. *PLANT SCIENCE* 84, 163-170
- MCGOWAN, R. E., GIBBS, M. (1974) Comparative enzymology of the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenases from *Pisum sativum*. *PLANT PHYSIOL.* 54, 312-319
- MERCER, W. D., WINN, S. I., WATSON, H. C. (1976) Twinning in crystals of human skeletal muscle D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. MOL. BIOL.* 104, 277-283
- MEYER-GAUEN, G., SCHNARRENBERGER, C., CERFF, R., MARTIN, W. (1994) Molecular characterization of a novel, nuclear-encoded, NAD⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in plastids of the gymnosperm *Pinus sylvestris* L.. *PLANT MOL. BIOL.* 26, 1155-1166
- MEYER-GAUEN, G., HERBRANDT, H., PAHNKE, J., CERFF, R., MARTIN, W. (1998) Gene structure, expression in *Escherichia coli* and biochemical properties of the NAD⁺-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Pinus sylvestris* chloroplasts. *GENE* 209, 167-174
- MICHELIS, S., SCAGLIARINI, S., DELLA SETA, F., CARLES, C., RIVA, M., TROST, P., BRANLANT, G. (1994) Arguments against a close relationship between non-phosphorylating and phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. *FEBS LETT.* 339, 97-100
- MISHLER, B. D., CHURCHILL, S. P. (1985) Transition to a land flora: Phylogenetic relationships of the green algae and bryophytes. *CLADISTICS* 1, 305-328
- MOGUILVSKY, N., VARSALONA, F., GUILLAUME, J.-P., GILLES, P., BOLLEN, A., ROBOOL, K. (1993) Production of authentic proapolipoprotein A-I in *Escherichia coli*: Strategies for the removal of the aminoterminal methionine. *J. BIOTECHNOL.* 27, 159-172
- MORAS, D., OLSEN, K. W., SABESAN, M. N., BUEHNER, M., FORD, G. C., ROSSMANN, M. G. (1975) Studies of asymmetry in the three-dimensional structure of lobster D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. BIOL. CHEM.* 250, 9137-9162
- MOUGIN, A., CORBIER, C., SOUKRI, A., WONACOTT, A., BRANLANT, C., BRANLANT, G. (1988) Use of site-directed mutagenesis to probe the role of Cys149 in the formation of charge-transfer transition in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *PROTEIN ENGINEERING* 2, 45-48
- MOURIOUX, G., DOUCE, R. (1981) Slow passive diffusion of orthophosphate between intact isolated chloroplasts and suspending medium. *PLANT PHYSIOL.* 67, 470-473
- MÜLLER, B., ZIEGLER, I., ZIEGLER, H. (1969) Lichtinduzierte, reversible Aktivitätssteigerung der NADP-abhängigen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase in Chloroplasten. Zum Mechanismus der Reaktion. *EUR. J. BIOCHEM.* 9, 101-106
- MÜLLER, B. (1970) On the mechanism of the light-induced activation of the NADP-dependent glyceraldehyde phosphate dehydrogenase. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 205, 102-109
- NAINAWATEE, H. S., MEHTA, S. L., DAS, N. B. (1974) Soluble and chloroplast malate dehydrogenase isoenzymes of *Triticum aestivum*. *PHYTOCHEM.* 13, 553-557
- NEUHAUS, H. E., BATZ, O., THOM, E., SCHEIBE, R. (1993) Purification of highly intact plastids from various heterotrophic plant tissues: Analysis of enzymic equipment and precursor dependency for starch biosynthesis. *BIOCHEM. J.* 296, 395-401
- NEUHAUS, H. E., MAAB, U. (1996) Unidirectional transport of orthophosphate across the envelope of isolated cauliflower-bud amyloplasts. *PLANTA* 198, 542-548

- NEUHAUS, H. E., SCHULTE, N. (1996) Starch degradation in chloroplasts isolated from CAM-induced *Mesembryanthemum crystallinum* L.. *BIOCHEM. J.* 318, 945-953
- NEUHAUS, H. E., THOM, E., MÖHLMANN, T., STEUP, M., KAMPFENKEL, K. (1997) Characterization of a novel eukaryotic ATP/ADP translocator located in the plasmid envelope of *Arabidopsis thaliana* L.. *PLANT J.* 11, 73-82
- NICHOLSON, S., EASTERBY, J. S., POWLS, R. (1987) Properties of a multimeric protein complex from chloroplasts possessing potential activities of NADPH-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and phosphoribulokinase. *EUR. J. BIOCHEM.* 162, 423-431
- NIELSEN, T. H., SKJARBAEK, H. C., KARLSEN, P. (1991) Carbohydrate metabolism during fruit development in sweet pepper (*Capsicum annuum*) plants. *PHYSIOL. PLANT.* 82, 311-319
- O'BRIEN, M. J., POWLS, R. (1976) Algal glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Pyridine-nucleotide requirements of two enzymes purified from *Scenedesmus obliquus*. *EUR. J. BIOCHEM.* 63, 155-161
- O'BRIEN, M. J., EASTERBY, J. S., POWLS, R. (1977) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Scenedesmus obliquus*. Effects of dithiothreitol and nucleotide on coenzyme specificity. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 481, 348-358
- OLSEN, K. W., GARAVITO, R., SABESAN, M., ROSSMANN, M. G. (1976) Studies on coenzyme binding to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. MOL. BIOL.* 107, 577-584
- PACOLD, M. E., ANDERSON, L. E., LI, D. (1995a) Redox sensitivity and light modulation of enzyme activity in the rhodophytes *Gracilaria tikvahiae* and *Chondrus crispus*. *J. PHYCOL.* 31, 297-301
- PACOLD, M. E., STEVENS, F. J., LI, D., ANDERSON, L. E. (1995b) The NADP-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases of *Anabaena variabilis* and *Synechocystis PCC 6803*, which lack one of the cysteines found in the higher plant enzyme, are not reductively activated. *PHOTOSYNTH. RES.* 43, 125-130
- PAWLIZKI, K., LATZKO, E. (1974) Partial separation and interconversion of NADH- and NADPH-linked activities of purified glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase from spinach chloroplasts. *FEBS LETT.* 42, 285-288
- PAWLIZKI, K. (1975) Glycerinaldehyd 3-Phosphat Dehydrogenase aus Spinatchloroplasten. Dissertation, Technische Universität, München
- PETERSEN, J. (1999) Duplikationen und lateraler Transfer von Genen als Motor der Evolution: Molekulare Studien am GAPDH-Genesystem von Grünalgen, Landpflanzen und Chlorarachniophyta. Dissertation, Technische Universität Carolo-Wilhelmina, Braunschweig
- PHARMACIA (1998) Gel filtration, PRINCIPLES AND METHODS, in: Amersham Pharmacia Biotech, 8 th edition, pp. 3-101
- POHLMAYER, K., PAAP, B. K., 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
- PRAT-GAY, G., PALADDINI, A., STEIN, M., WOLOSUIK, R. A. (1991) The effect of high hydrostatic pressure on the modulation of regulatory enzymes from spinach chloroplasts. *J. BIOL. CHEM.* 266, 20913-20921
- PRICE, G. D., EVANS, J. R., v. CAEMMERER, S., YU, J.-W., BADGER, M. R. (1995) Specific reduction of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity by antisense RNA reduces CO₂ assimilation via a reduction in ribulose biphosphate regeneration in transgenic tobacco plants. *PLANTA* 195, 369-378
- PUPILLO, P., GIULIANI PICCARI, G. (1973) The effect of NADP on the subunit structure and activity of spinach chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS.* 154, 324-331
- PUPILLO, P., GIULIANI PICCARI, G. (1975) The reversible depolymerization of spinach chloroplast glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase. Interaction with nucleotides and dithiothreitol. *EUR. J. BIOCHEM.* 51, 475-482
- PUPILLO, P., FAGGIANI, R. (1979) Subunit structure of three glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenases of some flowering plants. *ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS.* 194, 581-592
- QUAIL, P. H. (1979) Plant cell fractionation. *ANNU. REV. PLANT PHYSIOL.* 30, 425-484

- RAK, C.** (1996) Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus der chloroplastidären Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase aus Spinat. Diplomarbeit, Universität Osnabrück
- RAULT, M., GONTERO, B., RICARD, J.** (1991) Thioredoxin activation of phosphoribulokinase in a chloroplast multi-enzyme complex. *EUR. J. BIOCHEM.* 197, 791-797
- RAULT, M., GIUDICI-ORTICONI, M.-T., GONTERO, B., RICARD, J.** (1993) Structural and functional properties of a multi-enzyme complex from spinach chloroplast. 1. Stoichiometry of the polypeptide chains. *EUR. J. BIOCHEM.* 217, 1065-1073
- REICHERT, A., BAALMANN, E., VETTER, S., BACKHAUSEN, J. E., SCHEIBE, R.** (2000) Activation properties of the redox-modulated chloroplast enzymes glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase and fructose-1,6-bisphosphatase. *PHYSIOL. PLANT.* 110, 330-341
- RICARD, J., GIUDICI-ORTICONI, M. T., GONTERO, B.** (1994) The modulation of enzyme reaction rates within multi-enzyme complexes: 1. Statistical thermodynamics of information transfer through multi-enzyme complexes. *EUR. J. BIOCHEM.* 226, 993-998
- ROBINSON, S. P., WALKER, D. A.** (1979) The control of 3-phosphoglycerate reduction in isolated chloroplasts by the concentrations of ATP, ADP and 3-phosphoglycerate. *BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA* 545, 528-536
- RUELLAND, E., MIGINIAC-MASLOW, M.** (1999) Regulation of chloroplast enzyme activities by thioredoxins: Activation or relief from inhibition. *TRENDS IN PLANT SCIENCE* 4, 136-141
- RUSSELL, D. A., SACHS, M. M.** (1991) The maize cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase gene family: Organ-specific expression and genetic analysis. *MOL. GEN. GENET.* 229, 219-228
- RUTNER, A. C.** (1970) Spinach 5-phosphoribose isomerase. Purification and properties of the enzyme. *BIOCHEM.* 9, 178-184
- SAINIS, J. K., HARRIS, G. C.** (1986) The association of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase with phosphoriboisomerase and phosphoribulokinase. *BIOCHEM. BIOPHYS. RES. COMM.* 139, 947-954
- SAINIS, J. K., MERRIAM, K., HARRIS, G. C.** (1989) The association of D-ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase with phosphoribulokinase. *PLANT PHYSIOL.* 89, 368-374
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E. F., MANIATIS, T.** (eds.) (1989) *MOLECULAR CLONING. A laboratory manual*, 2. Ausg. Cold Spring Harbour Laboratory Press. Cold Spring Harbour, New York
- SANDERS, C.** (1997) Untersuchungen zur Regulation der chloroplastidären NAD(P)-Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase aus Spinat (*Spinacia oleracea* L.). Diplomarbeit, Universität, Osnabrück
- SCAGLIARINI, S., TROST, P., PUPILLO, P., VALENTI, V.** (1993) Light activation and molecular-mass changes of NAD(P)-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenases of spinach and maize leaves. *PLANTA* 190, 313-319
- SCAGLIARINI, S., TROST, P., PUPILLO, P.** (1998) The non-regulatory isoform of NAD(P)-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from spinach chloroplasts. *J. EXP. BOT.* 49, 1307-1315
- SCHEIBE, R.** (1990) Light/dark modulation: Regulation of chloroplast metabolism in a new light. *BOT. ACTA* 103, 327-334
- SCHEIBE, R.** (1991) Redox-modulation of chloroplast enzymes. A common principle for individual control. *PLANT PHYSIOL.* 96, 1-3
- SCHEIBE, R.** (1996) Die Regulation der Photosynthese durch das Licht. *BIOLOGIE IN UNSERER ZEIT* 26, 27-34
- SCHEIBE, R., BAALMANN, E., BACKHAUSEN, J. E., 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
- SCHEIBE, R., WEDEL, N., VETTER, S., EMMERLICH, V., SAUERMAN, S. M.** (2002) Co-existence of two regulatory NADP-glyceraldehyde 3-P dehydrogenase complexes in higher plant chloroplasts. *EUR. J. BIOCHEM.* 269, 5617-5624

- SCHÜRMAN, P., JACQUOT, J.-P. (2000) Plant thioredoxin systems revisited. ANNU. REV. PLANT PHYSIOL. PLANT MOL. BIOL. 51, 371-400
- SCHULMANN, M. D., GIBBS, M. (1968) D-glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenases of higher plants. PLANT PHYSIOL. 43, 1805-1812
- SCHWARZ, Z. (1974) Zur Regulation der NADP-abhängigen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase in den Primärblättern von *Phaseolus vulgaris* L.. Die Wirkung von Na-Cholat auf die Aktivität des Enzyms *in vitro*. BIOCHEM. PHYSIOL. PFLANZEN 166, 525-536
- SCHWARZ, Z., MARETZKI, D., SCHÖNHERR, J. (1976) Dissociated and associated forms of NAD(P)-dependent glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase after dark-light transitions in bean leaves. BIOCHEM. PHYSIOL. PFLANZEN 170, 37-50
- SERRANO, A., LÖFFELHARDT, W. (1994) Identification of two different glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases (phosphorylating) in the photosynthetic protist *Cyanophora paradoxa*. ARCH. MICROBIOL. 162, 14-19
- SHIH, M.-C., LAZAR, G., GOODMAN, H. M. (1986) Evidence in favor of the symbiotic origin of chloroplasts: Primary structure and evolution of tobacco glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases. CELL 47, 73-80
- SHIH, M.-C., HEINRICH, P., GOODMAN, H. M. (1991) Cloning and chromosomal mapping of nuclear genes encoding chloroplast and cytosolic glyceraldehyde-3-phosphat-dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. GENE 104, 133-138
- SHIH, M.-C., HEINRICH, P., GOODMAN, H. M. (1992) Cloning and chromosomal mapping of nuclear genes encoding chloroplast and cytosolic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*. GENE 119, 317-319 (korrigierte Version von 1991)
- SIEBKE, K., LAISK, A., NEIMANIS, S., HEBER, U. (1991) Regulation of chloroplast metabolism in leaves: Evidence that NADP-dependent GAPDH, but not ferredoxin-NADP reductase, controls electron flow to phosphoglycerate in the dark-light transition. PLANTA 185, 337-343
- SKARZYNSKI, T., MOODY, P. C. E., WONACOTT, A. J. (1987) Structure of the holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus* at 1.8 Å of resolution. J. MOL. BIOL. 193, 171-187
- SKARZYNSKI, T., WONACOTT, A. J. (1988) Coenzyme-induces conformational changes in glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Bacillus stearothermophilus*. J. MOL. BIOL. 203, 1097-1118
- SONG, S., LI, J., LIN, Z. (1998) Structure of the holo-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Palinurus versicolor* refined at 2.0 Å resolution. ACTA CRYSTALLOG. SECT. D. 54, 558-569
- SOUZA, D. H. F., GARRATT, R., C., ARAUJO, A. P. U., GUIMARAES, B. G., JESUS, W. P. D., MICHELS, P. A. M. (1998) *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: Structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. FEBS LETT. 424, 131-135
- SPERANZA, M. L., GOZZER, C. (1978) Purification and properties of NAD-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from spinach leaves. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 522, 32-42
- STITT, M., LILLEY, McC. R., GERHARDT, R. (1989) Metabolite levels in specific cells and subcellular compartments of plant leaves. METH. ENZYMOL. 174, 518-552
- STRYER, L. (Ed.) (1990) BIOCHEMIE. Spektrum der Wissenschaft. Verlagsgesellschaft, Heidelberg
- SÜSS, K.-H., ARKONA, C., MANTEUFFEL, R., ADLER, K. (1993) Calvin cycle multienzyme complexes are bound to chloroplast thylakoid membranes of higher plants *in situ*. PROC. NATL. ACAD. SCI. USA 90, 5514-5518
- SÜSS, K.-H., PROKHORENKO, I., ADLER, K. (1995) *In situ* association of Calvin cycle enzymes, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, ferredoxin-NADP⁺ reductase, and nitrite reductase with thylakoid and pyrenoid membranes of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as revealed by immunoelectron microscopy. PLANT PHYSIOL. 107, 1387-1397
- TAKAHAMA, U., SHIMIZU-TAKAHAMA, M., HEBER, U. (1981) The redox state of the NADP system in illuminated chloroplasts. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 637, 530-539

- TAKEDA, T., YOKOTA, A., SHIGEOKA, S. (1995) Resistance of photosynthesis to hydrogen peroxide in algae. *PLANT CELL PHYSIOL.* **36**, 1089-1095
- TAMOI, M., ISHIKAWA, T., TAKEDA, T., SHIGEOKA, S. (1996) Enzymic and molecular characterization of NADP-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Synechococcus PCC 7942*: Resistance of the enzyme to hydrogen peroxide. *BIOCHEM. J.* **316**, 685-690
- TANNER, J. J., HECHT, R. M., KRAUSE, K. L. (1996) Determinants of enzyme thermostability observed in the molecular structure of *Thermus aquaticus* D-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase at 2.5 Å resolution. *BIOCHEM.* **35**, 2597-2609
- THEISS-SEUBERLING, H.-B. (1981) Zur Regulation der NADPH-abhängigen Glycerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase in *Euglena gracilis*. *BER. DEUTSCH. BOT. GES.* **94**, 733-743
- TOMOVA, N. G., KRISTEVA, N. G., GEORGIEVA, M. A. (1982) NAD (NADP)-dependent glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Chlorella*. Kinetics of inhibition by the reaction products NAD and NADP. *BIOKIMIYA* **46**, 1748-1753, translated
- TROST, P., SCAGLIARINI, S., VALENTI, V., PUPILLO, P. (1993) Activation of spinach glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase: Effect of glycerate 1,3-bisphosphate. *PLANTA* **190**, 320-326
- UDVARDY, J., BALOGH, A., FARKAS, G. L. (1982) Modulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenases in *Anacystis nidulans* by glutathione. *ARCH. MICROBIOL.* **133**, 2-5
- V SCHAEWEN, A., LANGENKÄMPER, G., GRAEWE, K., WENDEROTH, I., SCHEIBE, R. (1995) Isolation and characterization of the plastidic glucose-6-phosphate dehydrogenase from potato and its cytosolic counterpart. *PLANT PHYSIOL.* **109**, 1327-1335
- VACCHI, C., GIULIANI PICCARI, G., PUPILLO, P. (1972) Characterization of NADP-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Euglena Gracilis*. *Z. PFLANZENPHYSIOL.* **69**, 351-358
- VELLIEUX, F. M. D., HAJDU, J., VERLINDE, C. L. M. J., GROENDIJK, H., READ, R. J., GREENHOUGH, T. J., CAMPBELL, J. W., KALK, K. H., LITTLECHILD, J. A., WATSON, H. C., HOL, W. G. J. (1993) Structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* determined from laue data. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **90**, 2355-2359
- VELLIEUX, F. M. D., HAJDU, J., HOL, W. G. J. (1995) Refined 3.2 Å resolution structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei*. *ACTA CRYSTALLOG. SECT. D* **51**, 575-589
- WANG, X., TANG, X.-y., ANDERSON, L. E. (1996) Enzyme-enzyme interaction in the chloroplast: Physical evidence for association between phosphoglycerate kinase and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase *in vitro*. *PLANT SCIENCE* **117**, 45-53
- WALKER, D. (ed.) (1987) THE USE OF THE OXYGEN ELECTRODE AND FLUORESCENCE PROBES IN SIMPLE MEASUREMENTS OF PHOTOSYNTHESIS. Oxygraphics Limited, Sheffield
- WALKER, D. A., LEEGOOD, R. C., SIVAK M. N. (1986) Ribulose bisphosphate carboxylase oxygenase - its role in photosynthesis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B-Biol. Sci.* **313**, 305-324
- WARA-ASWAPATI, O., KEMBLE, R. J., BRADBEER, J. W. (1980) Activation of glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase (NADP) and phosphoribulokinase in *Phaseolus vulgaris* leaf extracts involves the dissociation of oligomers. *PLANT PHYSIOL.* **66**, 34-39
- WEBER, K., OSBORN, M. (1969) The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *J. BIOL. CHEM.* **244**, 4406-4412
- WEDEL, N., SOLL, J., PAAP, B. K. (1997) CP12 provides a new mode of light regulation of Calvin cycle activity in higher plants. *PROC. NATL. ACAD. SCI. USA* **94**, 10479-10484
- WEDEL, N., SOLL, J. (1998) Evolutionary conserves 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
- WOLOSIUK, R. A., BUCHANAN, B. B. (1976) Studies on the regulation of chloroplast NADP-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J. BIOL. CHEM.* **251**, 6456-6461

- WOLOSIUK, R. A., BUCHANAN, B. B. (1978) Regulation of chloroplast phosphoribulokinase by the Ferredoxin/ thioredoxin system. ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. 189, 97-101
- WOLOSIUK, R. A., CORLEY, E., CRAWFORD, N. A., BUCHANAN, B. B. (1985) Dual effects of organic solvents on chloroplast phosphoribulokinase and NADP-glyceraldehyde-3-P dehydrogenase. FEBS LETT. 189, 212-216
- WOLOSIUK, R. A., HERTIG, C. M., BUSCONI, L. (1986) Activation of spinach chloroplast NADP-linked glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by concerted hysteresis. ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. 246, 1-8
- WOLOSIUK, R. A., STEIN, M. (1990) Modulation of spinach chloroplast NADP-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by chaotrophic anions. ARCH. BIOCHEM. BIOPHYS. 279, 70-77
- WOODROW, S., O'BRIEN, M. J., EASTERBY, J. S., POWLS, R. (1979) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Scenedesmus obliquus*. A kinetic analysis of the effects of nucleotide and dithiothreitol on the production of NADPH-dependent activity. EUR. J. BIOCHEM. 98, 425-430
- ZAPPONI, M. C., BERNI, R., IADAROLA, P., FERRI, G. (1983) Spinach chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP) formation of complexes and substrates. BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA 744, 260-264
- ZAPPONI, M. C., IADAROLA, P., STOPPINI, M., FERRI, G. (1993) Limited proteolysis of chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (NADP) from *Spinacia oleracea*. BIOL. CHEM. HOPPE-SEYLER 374, 395-402
- ZEIKUS, J. G., FUCHS, G., KENEALY, W., THAUER, R. K. (1977) Oxidoreductases involved in cell carbon synthesis of *Methanobacterium thermoautotrophicum*. J. BACTERIOL. 132, 604-613
- ZHOU, Y.-H., RAGAN, M. A. (1993) Cloning and characterization of the nuclear gene encoding plastid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the red alga *Gracilaria verrucosa*. CURR. GENET. 23, 483-489
- ZIEGLER, H., ZIEGLER, I. (1965) Der Einfluss der Belichtung auf die NADP⁺-abhängige Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase. PLANTA 65, 369-380
- ZIEGLER, H., ZIEGLER, I. (1967) Die lichtinduzierte Aktivitätssteigerung der NADP⁺-abhängigen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. Das Verhalten von Meeresalgen. PLANTA 72, 162-169
- ZIEGLER, H., ZIEGLER, I., BETH, K. (1967) Die lichtinduzierte Aktivitätssteigerung der NADP⁺-abhängigen Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase. Der Einfluss des Zellkernes auf den Effekt. PLANTA 72, 247-251

7 Anhang

Abkürzungen

1,3bisPGA	1,3-bis-Phosphoglycerat
3PGA	3-Phosphoglycerat
6PGlu	6-Phosphogluconat
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
ADPGlc	Adenosin-5'-diphosphat-Glucose
Amp	Ampicillin
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (bovine serum albumine)
Chl	Chlorophyll
CTE	C-terminale Sequenzerweiterung
CO ₂	Kohlendioxid
DHAP	Dihydroxyacetonphosphat
DNase	Desoxyribonuklease
DT	Dicarboxylattranslokator
DTT _{red}	reduziertes DL-Dithiothreitol
E-Cup	Eppendorf-Reaktionsgefäß
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F6P	Fructose-6-Phosphat
FBP	Fructose-1,6-bisphosphat
FBPase	Fructose-1,6-bisphosphatase
FPLC	Fast performance Liquid Chromatography
FTR	Ferredoxin-Thioredoxin-Reduktase
<i>g</i>	Erdbeschleunigung
G1P	Glucose-1-Phosphat
G6P	Glucose-6-Phosphat
G6PDH	Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase
GAP	Glycerinaldehyd-3-Phosphat
GapA	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, Untereinheit A
GapB	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, Untereinheit B
GapC	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, cytosolisch
GapCp	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase, plastidär
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GSH	reduziertes Glutathion
GSSG	oxidiertes Glutathion
h	Stunde
H ⁺	Wasserstoff
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure
HClO ₄	Perchlorsäure
Hepes	4-(-2-Hydroxyethyl)-1-piperazinethansulfonsäure
IPTG	Isopropylthio-β-D-Thiogalaktopyranosid
K _a	Aktivierungskonstante
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilo-Dalton
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
KH ₂ CO ₃	Kaliumcarbonat
KH ₂ PO ₄	Kaliumdihydrogenphosphat
K _m	Michaelis-Menten-Konstante
KOH	Kaliumhydroxid
M	molar
Mal	Malat
MDH	Malatdehydrogenase

MgCl ₂	Magnesiumchlorid
MgSO ₄	Magnesiumsulfat
MnCl ₂	Manganchlorid
mM	Millimolar
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid, reduzierte Form
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, oxidierte Form
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat, reduzierte Form
NaHCO ₃	Natriumascorbat
NaN ₃	Natriumacid
NaOH	Natriumhydroxid
Na(SO ₃) ₂	Natriumbisulfit
nm	Nanometer
O ₂	molekularer Sauerstoff
OAA	Oxalacetat
OAA-T	Oxalacetat-Translokator
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PEG	Phosphoenolpyruvat
PGK	Phosphoglyceratkinase
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionenkonzentration
P _i	anorganisches Phosphat
PFK	Phosphofruktokinase
PRK	Phosphoribulokinase
RNase	Ribonuklease
Ru5P	Ribulose-5-Phosphat
RuBP	Ribulose-1,5-bisphosphat
RubisCO	Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/Oxygenase
S7P	Sedoheptulose-7-Phosphat
SDS	Natrium-Dodecyl-Sulfat (Sodium-dodecylphosphat)
SBP	Sedoheptulose-1,7-bisphosphat
SBPase	Sedoheptulose-1,7-bisphosphatase
Tes	N-(Tris-(hydroxymethyl)-methyl)-2-aminoethansulfonsäure
TP	Triosephosphate
TPT	Triosephosphattranslokator
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit = μmol Substratumsatz pro Minute
V _{max}	Maximalaktivität
v/v	Volumenanteil am Endvolumen

Aminosäurecode

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

Basen

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

Lebenslauf

Name: Elisabeth Baalman
Geburtsdatum: 14.03.1963 in Aschendorf (Papenburg II)

Schulbildung:

1969 - 1973 Grundschule Lehe
1973 - 1982 Mariengymnasium Papenburg
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife

Berufsausbildung:

08.1982 - 06. 1984 Berufsfachschule für technische Assistenten der Rheinischen Akademie e. V. Köln
Abschluß: Staatlich geprüfte Biologisch-technische Assistentin

10.1984 - 07.1985 Studium der Literaturwissenschaft und Philosophie an der Universität Osnabrück

10.1985 - 07.1993 Studium der Biologie an der Universität Osnabrück
Abschluß: Diplom in der Pflanzenphysiologie bei Prof. Dr. R. Scheibe
Thema der Diplomarbeit:
'Untersuchungen zum Aktivierungsmechanismus der chloroplastidären Glyzerinaldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase aus Spinat'

Wissenschaftliche Tätigkeit:

08.1993 - 07.1997 Praktische Arbeiten zur Dissertation im Institut für Pflanzenphysiologie an der Universität Osnabrück

08.1997 - 07.1999 Gastwissenschaftlerin im Institut der Pflanzenphysiologie an der Universität Osnabrück

Berufliche Tätigkeit:

seit 08.1999 Technische Leiterin in der Firma BioPräp in Osnabrück

Danksagungen

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. R. Scheibe. Nach Beendigung meines Diploms überließ sie mir weiterhin während meiner Mitarbeit im Institut die Erforschung von GAPDH. Fachlich hat sie mich stets intensiv betreut und war immer zu Diskussionen bereit. Ich danke ihr darüberhinaus, weil sie für mich in persönlicher Hinsicht jederzeit sehr viel Verständnis aufbrachte und mich unterstützt hat.

Dr. Jan-E. Backhausen gilt gleichermaßen besonderer Dank. Er hat mich stets freundschaftlich und intensiv betreut und mich mit seinem *Know-how*, was die Spinat-Plastiden-Physiologie angeht, inspiriert und tatkräftig unterstützt. Während der Ausarbeitung meiner Dissertation konnte er mir in konstruktiven Diskussionen wertvolle Tips und Ratschläge geben. Außerdem kümmerte er sich in jeglicher Hinsicht und zu jeder Zeit um EDV-Angelegenheiten. Während der persönlichen und fachlichen Zusammenarbeit in der Pflanzenphysiologie haben wir eine schöne Zeit verbracht. Darüberhinaus danke ich ihm sehr herzlich für seine Geduld, seinen Rückhalt und für seine Freundschaft.

Bei Susanne Vetter möchte ich mich ebenfalls sehr herzlich bedanken. Sie hat viele Experimente qualifiziert durchgeführt und dadurch sehr zur Fertigstellung der praktischen Arbeit beigetragen. Außerdem möchte ich ihr für die angenehme Zusammenarbeit und Hilfsbereitschaft danken.

Mein besonderer Dank gilt auch Dr. Simone Holtgrefe für ihr in jeglicher Hinsicht freundschaftliches als auch fachliches Engagement während unserer gemeinsamen Zeit in der Pflanzenphysiologie, als auch in der Zeit danach. Für die gute Zusammenarbeit im Labor, viele wertvolle Ratschläge und nicht zuletzt das jederzeit freundliche Arbeitsklima möchte ich Dr. Oksana Ocheretina, Dr. Kerstin Graeve, Dr. Maria Faske, Dr. Camillo Kitzmann, Dr. Irina Wenderoth, Dr. Elisabeth Falkenstein, Christiane Rak, Prof. Dr. Antje von Schaewen, Prof. Dr. H. E. Neuhaus und Dr. Rüdiger Hauschild herzlich danken. Kirsten Meyer danke ich für die professionelle Anzucht des Spinates.

Allen weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe Pflanzenphysiologie danke ich für ihre Kooperativität und das kameradschaftliche Verhältnis.

Prof. Dr. William Martin habe ich ebenfalls sehr viel zu verdanken. Fachlich sehr engagiert und gleichermaßen persönlich freundschaftlich hat er mich während eines Aufenthaltes in Braunschweig zuvorkommend betreut. Mein spezieller Dank gilt auch Christiane Lindemann für ihre kompetente Betreuung in dieser Zeit. Durch die dort durchgeführten Klonierungen der rekombinanten Untereinheiten von GAPDH und den anschließend in Osnabrück exprimierten Untereinheiten habe ich letztendlich sehr viel Verständnis darüber gewonnen, wie GAPDH reguliert wird. Für die Zusammenarbeit bei den Arbeiten zu GapCp bedanke ich mich ebenfalls bei Dr. Jörn Petersen.

Dr. Norbert Wedel möchte ich für seine Diskussionsbereitschaft und für die Entdeckung von CP12 danken. Das kleine Protein war für meine Arbeit von großer Bedeutung.

Weiterhin möchte ich mich sehr bei meiner Familie für den Rückhalt, die Unterstützung und das Verständnis für mich bedanken. Insbesondere danke ich meinen Eltern und meiner Schwester Maria, die mir immer neue Motivation und Zuversicht gaben.

Ein herzliches Dankeschön für Rücksichtnahme, Verständnis, sowie helferische Leistungen in jeglicher Form gelten meinen Freunden, sowie meinen Mitarbeitern der Firma Biopräp.

Erklärung über die Eigenständigkeit der erbrachten wissenschaftlichen Leistung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig verfaßt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich weder an der Universität Osnabrück noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Osnabrück, den 17. Mai 2003

Elisabeth Baalmann