

Phylogenie und Genexpression der Glutamat-Synthase (GOGAT) in verschiedenen Algengruppen

Inaugural-Dissertation

**zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
(Fachbereich Biologie)
der Justus-Liebig-Universität Gießen**

vorgelegt von

**Silja Röttgers
aus Bochum**

Gießen 2002

“In cosmic dimensions, the biosphere of this planet is little more than a flimsy layer on its surface. The vast number of individuals of far more than one million species are crowded within that layer. Consequently, living organisms constitute a considerable part of the environment of other organisms.”

(Peter Sitte)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Funktion der Glutamat-Synthase	1
1.2 GOGAT Isoformen in höheren Pflanzen	2
1.3 Organisation von GOGAT Genen und Enzymen verschiedener Organismen.....	4
1.4 Endosymbiontentheorie, Evolution von DNA enthaltenden Organellen.....	6
1.4.1 Plastidenevolution.....	7
1.5 Evolution der GOGAT Isoenzyme	8
1.6 Regulation der verschiedenen Isoenzyme.....	9
1.7 GOGAT Enzyme und Gene in Algen	9
1.8 Zielsetzung der Arbeit.....	10
2. Material und Methoden	12
2.1 Versuchsobjekte, Anzucht und Ernte der Algen.....	12
ALGEN MIT PRIMÄREN PLASTIDEN	12
2.1.1 Rhodophyta.....	12
2.1.2 Chlorophyta.....	13
2.1.3 Glaucocystophyta.....	13
ALGEN MIT KOMPLEXEN (SEKUNDÄREN) PLASTIDEN	13
2.1.4 Heterokontophyta.....	13
2.1.5 Haptophyta.....	14
2.1.6 Cryptophyta.....	14
MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	15
2.2 Isolierung von DNA.....	15
2.2.1 Klassische Methode	15
2.2.2 Genomic-Tip™ 100 G von QIAGEN.....	15
2.2.3 CTAB-Methode	16
2.3 Caesiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation.....	16
2.4. Agarose-Gelelektrophorese.....	16
2.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen und PCR-Ansätzen.....	17
2.6 Restriktionsenzymatischer Verdau der DNA.....	17
2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion	18

2.8 Klonieren von PCR-Produkten	18
2.8.1. PCR TOPO™ Cloning Kit	18
2.8.2 InsT/Aclone™ PCR Cloning Kit	19
2.8.3 PCR-Script™ AmpSk(+) Cloning Kit	19
2.8.4 Ligation in pBluescript II KS (+)-TA-Vektoren	19
2.9 Herstellen des pBluescript II KS (+)-TA-Vektors	19
2.10 Herstellen von kompetenten Zellen	20
2.11 Transformation in <i>E.coli</i> DH5 α -Zellen	20
2.12.1 Plasmidminipräparation mit Hilfe von „QIAprep Spin Plasmid“	20
2.12.2 Präparation der Plasmide mit dem Kit der Sequenzierfirma SeqLab	21
2.13 DNA-Sequenzierungen	21
2.13.1 T7-Sequencing	21
2.13.2 TAQ-Cycle-Sequencing	22
2.13.3 Auftragssequenzierungen	22
2.14 Verwendete Computerprogramme zum Auswerten von DNA-Sequenzen	22
2.15 Isolieren von Gesamt-RNA	23
2.15.1 Gesamt-RNA-Isolation mit RNA-Clean	23
2.15.2 Qiagen RNA/DNA Kit	23
2.16 Fällern von Gesamt-RNA mit LiCl	24
2.17 Gewinnung von Poly(A)+ mRNA mit Dynabeads	24
2.18 RNA-Agarose-Gelelektrophorese	24
2.19 Reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR)	25
2.19.1 cDNA Erststrangsynthese	25
2.19.2 Semiquantitative RT-PCR	25
PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	26
2.20 Probenvorbereitung	26
2.21 Proteinquantifizierung	26
2.22 Bestimmung der Ferredoxin-abhängigen Glutamat-Synthase (Fd-GOGAT)	26
2.23 Messung der N-GOGAT-Aktivität	28
2.24 Isolation von Plastiden	28
2.25 Lösungen und Puffer	29
3. Ergebnisse	30
NACHWEIS VON GOGAT ENZYMEN UND DEREN GENEN IN VERSCHIEDENEN ALGENGRUPPEN	30

3.1 Nachweis von spezifischen GOGAT-Enzymaktivitäten in Algen mit primären und Algen mit sekundären Plastiden.....	30
3.1.1 Spezifische GOGAT-Enzymaktivitäten in Rhodophyten.....	33
Rhodophyta	33
3.1.2 GOGAT-Aktivitäten in der heterokonten Alge <i>H. carterae</i>	33
3.1.3 Nachweis von GOGAT Aktivitäten in der chlorophytischen Alge <i>A. acetabulum</i>	33
3.2 Kontrolle der N-GOGAT Messungen mit dem spezifischen Hemmstoff Azaserin	34
3.3 Vorgehensweise bei der Klonierung von GOGAT-Teilsequenzen	35
3.4 Amplifikation von GOGAT-Genfragmenten.....	35
3.4.1 GOGAT Gene in Rhodophyta	39
3.4.2 GOGAT Gene in heterokonten Algen	40
3.4.3 GOGAT Gene in Cryptophyta	41
3.4.4 GOGAT Gene in Haptophyten	42
3.4.5 GOGAT Gene in chlorophytischen Algen.....	42
3.4.6 GOGAT Gene in Glaucocystophyta	43
PHYLOGENETISCHE ANALYSEN DER GOGAT GENE UND ENZYME	43
3.5 Alignments der Aminosäuresequenzen.....	44
3.6 Phylogenetische Bäume und Ähnlichkeitstabellen.....	44
3.6.1 Phylogenetischer Baum der Fd-GOGAT.....	49
3.6.2 Phylogenetischer Baum der α -GOGAT.....	50
3.6.3 Phylogenetischer Baum der N-GOGAT	52
REGULATION VERSCHIEDENER GOGAT ISOFORMEN.....	54
3.7 Vergleichende Untersuchungen zur Regulation spezifischer GOGAT-Enzymaktivitäten in verschiedenen Algen durch den externen Faktor Licht	54
3.8 Untersuchungen zur circadianen Regulation der Fd-GOGAT in <i>H. carterae</i>	56
3.9 Regulation von GOGAT Enzymaktivitäten durch das Angebot an Stickstoff.....	57
3.10 Regulation der GOGAT auf der Ebene der Transkription.....	62
Charakterisierung der N-GOGAT Aktivitäten in <i>H. carterae</i>	66
3.11 Kompartimentierung der N-GOGAT in <i>H. carterae</i>	66
3.12 Kontrolle mit veränderter Meßtemperatur	69
3.13 Stabilität der N-GOGAT bezüglich Einfrierens	69
4. Diskussion	70
4.1 GOGAT Enzyme	70
4.2 Vergleichende Analyse von GOGAT Enzymen und deren Genen in Algen.....	70

4.3 GOGAT in Eubakterien	71
4.4 Putative GOGAT Gene in Archaeobakterien	71
4.5 GOGAT in nicht-photosynthetisch aktiven Eukaryoten.....	72
4.6 Die ursprüngliche Form der GOGAT	73
4.7 Mögliche Ursprünge von GOGAT Enzymen in Pflanzen	74
4.8 Modelle zur Evolution von GOGAT Enzymen	74
4.9 Modell für die Evolution der Fd-GOGAT	75
4.10 Modell für die Evolution der α -GOGAT	77
4.11 Modell für die Evolution der N-GOGAT in Eukaryoten.....	79
4.12 GOGAT-Evolution und Plastidenevolution.....	81
4.13 Coenzympezifität und Lokalisation von GOGAT Enzymen in Algen.....	82
4.14 Temperaturabhängigkeit der N-GOGAT Enzymaktivität	84
4.15 Regulation der GOGAT-Expression und Enzymaktivität in Pflanzen	85
4.16 Regulation der GOGAT in Algen durch Licht	85
4.17 Photorezeptoren in marinen Algen	86
4.18 Die Aktivität der Fd-GOGAT unterliegt einer circadianen Rhythmik	88
4.19 Regulation der GOGAT Enzyme in Algen durch Stickstoffmangel	89
4.20 Mögliche Aufgaben der verschiedenen GOGAT Isoenzyme in Algen	90
4.21 Ausblick	91
5. Zusammenfassung	93
6. Literaturverzeichnis	94
7. Anhang.....	109

1. Einleitung

1.1 Funktion der Glutamat-Synthase

Pflanzen sind durch ihre autotrophe Lebensweise charakterisiert. Einfache anorganische Moleküle dienen ihnen als Nährstoffe. Sie werden von der Wurzel aufgenommen und anschließend in die für Wachstums- und reproduzierende Prozesse notwendigen organischen Verbindungen assimiliert.

Die Assimilation einiger Nährstoffe - insbesondere von Stickstoff und Schwefel - erfordert eine komplexe Abfolge biochemischer Reaktionen. Sie gehören zu den energieaufwendigsten Reaktionen, die in lebenden Organismen ablaufen. Gleichzeitig stellt gerade Stickstoff oft den limitierenden Faktor für das pflanzliche Wachstum dar (Canovas et al., 1998).

Aus dem Boden wird anorganischer Stickstoff meist in Form von Nitrat (NO_3^-) aufgenommen, und zunächst in zwei Schritten zu Ammonium reduziert (Lea et al., 1990; Temple et al., 1998). Einige Pflanzen, vor allem Leguminosen, bilden eine Symbiose mit Rhizobien die in der Lage sind, auch atmosphärischen Stickstoff zu Ammonium zu reduzieren (Heichel et al., 1981; Schönbeck et al., 2000). Innerhalb des pflanzlichen Stoffwechsels entsteht Ammonium außerdem in signifikanten Mengen in der Photorespiration (Keys et al., 1978), der Phenylpropanoid Biosynthese und dem Aminosäurekatabolismus (Lea et al., 1990; Lam et al., 1996). Diese sehr unterschiedlichen Quellen in der Pflanze anfallenden Ammoniums erfordern, wenn eine toxische Wirkung vermieden werden soll, einen effizienten und gut regulierten Einbau von Ammonium in organische Verbindungen.

Die Glutamat-Synthase (Glutamin-Oxoglutarat-Aminotransferase oder GOGAT) stellt zusammen mit der Glutamin-Synthetase (GS) ein Schlüsselenzym bei der Assimilation von Ammonium in den pflanzlichen Stoffwechsel dar (Lea und Mifflin, 1974; Keys et al., 1978; Lea et al., 1990; Sechley et al., 1992; Canovas et al., 1998; Temple et al., 1998). Die von ihnen katalysierten Reaktionen sind in Abbildung 1 zusammengefasst. Die Glutamin-Synthetase katalysiert die ATP-abhängige Aminierung von Glutamat, bei der Glutamin entsteht. Der anschließende reduktive Transfer der Amidgruppe von Glutamin auf 2-Oxoglutarat, bei dem

zwei Moleküle Glutamat entstehen, wird von der GOGAT katalysiert (Boland und Benny, 1977). Beide Reaktionen werden als GS/GOGAT-Weg zusammengefasst (Lea et al., 1990).

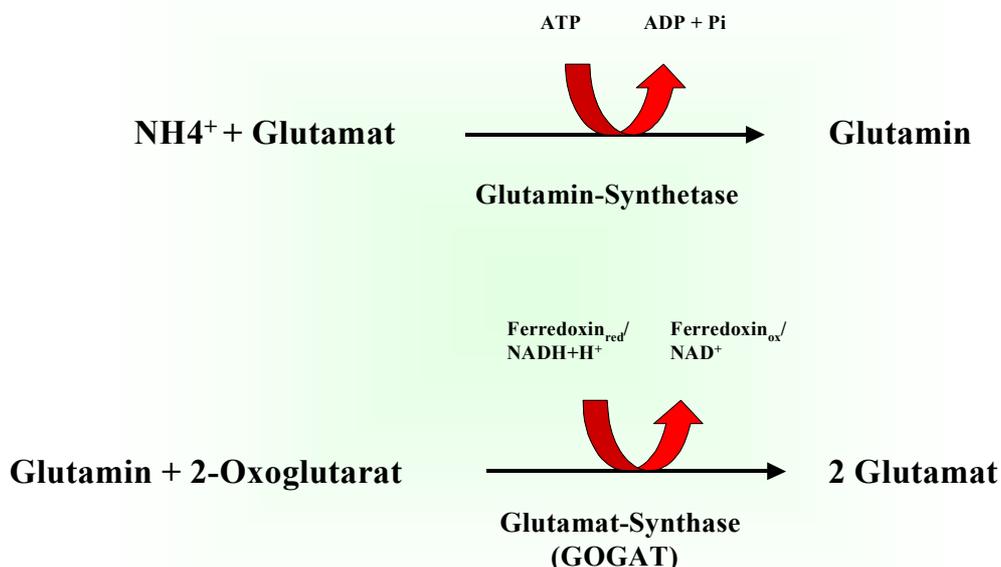


Abbildung 1: Der Glutamin-Synthetase/Glutamat-Synthase Weg als Eintrittspforte von anorganischem Stickstoff in den pflanzlichen Metabolismus bzw. zur Reassimilation freigewordener Ammoniumionen. Im ersten Schritt wird Ammonium via Glutamin-Synthetase unter ATP-Verbrauch an Glutamat gebunden, es entsteht Glutamin. Dieses reagiert mit 2-Oxoglutarat zu zwei Molekülen Glutamat. Das Enzym, das diesen zweiten Schritt katalysiert ist die Glutamat-Synthase (GOGAT). Je nach Isoform können ihr Ferredoxin oder NADH als Coenzym dienen (siehe 1.2).

Das gebildete Glutamat kann entweder den Glutamat-Pool für die Glutamin-Synthetase wieder auffüllen oder aber als Stickstoffdonor für die Synthese weiterer Aminosäuren, von Nukleinsäuren oder anderer Stickstoff enthaltender Komponenten dienen (Lea et al., 1990).

Wichtige Folgeprodukte von Glutamin und Glutamat sind unter anderem die Aminosäuren Aspartat und Asparagin, die in vielen Pflanzen den Transport von Stickstoff vom Ort der Assimilation zu dem Ort des Verbrauchs übernehmen.

1.2 GOGAT Isoformen in höheren Pflanzen

Von der GOGAT sind in höheren Pflanzen zwei Isoformen bekannt, die mit unterschiedlichen Coenzymen assoziiert sind. Ein Ferredoxin-abhängiges, die Fd-GOGAT (EC 1.4.7.1) und ein NADH-abhängiges, die N-GOGAT (EC 1.4.1.14) (Sechley et al., 1992; Gregerson et al., 1993; Lancien et al., 2000). Zusätzlich zu ihrer Coenzym-spezifität unterscheiden sich beide Isoenzyme hinsichtlich ihrer Molekularmasse, ihrer Enzymkinetik, ihrer Antigenizität und ihrer metabolischen Funktion (Suzuki und Gadal, 1984; Avila et al., 1987; Sakakibara et al., 1991;

Gregerson et al., 1993). Sie werden von unterschiedlichen Genen kodiert, werden unterschiedlich reguliert und haben möglicherweise unterschiedliche evolutionäre Ursprünge (Valentin et al., 1993).

Die Fd-GOGAT ist die Hauptform der GOGAT in grünem Gewebe (Lea et al., 1990; Vance et al., 1995). Diese Isoform ist bei höheren Pflanzen bereits gut charakterisiert. Vollständige cDNA-Klone, die für eine Ferredoxin-abhängige Isoform der GOGAT kodieren, konnten u.a. aus den Blättern von *Zea mays* (Sakakibara et al., 1991) und *Arabidopsis thaliana* (Suzuki und Rothstein, 1997) isoliert werden. Das entsprechende Isoenzym konnte außerdem im Chloroplastenstroma von *Lycopersicon esculentum* (Botella et al., 1988; Avila et al., 1994), von *Z. mays* (Wallsgrave et al., 1977; Sakakibara et al., 1991), *Pisum sativum* (Wallsgrave et al., 1977), *Spinacia oleracea* (Hirasawa und Tamura, 1984), *Pinus pinaster* (Garcia-Gutierrez et al., 1995), und *Vicia faba* (Wallsgrave et al., 1977) nachgewiesen werden. Es handelt sich um ein Eisen-Schwefel-Flavoprotein mit einer Masse von 130-180 kDa, das generell als Monomer aktiv ist (Wallsgrave et al., 1977; Matoh et al., 1979; Tamura et al., 1980; Temple et al., 1998), mit einem FMN und einem Eisen-Schwefel-Cluster als prosthetische Gruppen. Zusammen mit der plastiden-lokalisierten Form der Glutamin-Synthetase scheint sie im Allgemeinen in höheren Pflanzen vor allem die Reassimilation von Ammonium aus der Photorespiration zu katalysieren (Keys et al., 1978; Sommerville und Ogren, 1980; Kendall et al., 1986; Sakakibara et al., 1991). Zumindest in *Z. mays* und *A. thaliana* sind aber zwei Ferredoxin-abhängige Isoenzyme nachgewiesen worden (GLU1 und GLU2), die von verschiedenen Genen kodiert werden und offensichtlich innerhalb der Pflanze auch unterschiedliche Aufgaben übernehmen. So wird in *Arabidopsis* das *GLU1*-Gen vor allem in den Blättern exprimiert, während die Expression von *GLU2* vor allem in den Wurzeln erfolgt (Oliveira et al., 1997; Coschigano et al., 1998). Auch in Mais scheint nur eines der Enzyme für die Photorespiration benötigt zu werden. Mutanten, denen dieses Enzym fehlt, sind unter photorespiratorischen Bedingungen letal (Sommerville und Ogren, 1982). Das andere Ferredoxin-abhängige Isoenzym dagegen übernimmt in den Plastiden der Wurzeln die Assimilation von Ammoniumionen, die direkt aus dem Boden aufgenommen wurden (Lam et al., 1996).

Auch bei der NADH-abhängigen GOGAT handelt es sich um ein Eisen-Schwefel-Flavoprotein, das bei höheren Pflanzen als Monomer von 200-240 kDa auftritt (Trotta et al., 1974; Boland und Benny, 1977; Matoh et al., 1980; Anderson et al., 1989). Zusätzlich zu den prosthetischen Gruppen der Fd-GOGAT enthält sie ein FAD und ein oder zwei weitere Eisen-

Schwefel-Cluster. Vollständige DNA-Sequenzen die für eine NADH-abhängige GOGAT kodieren, sind mittlerweile u.a. aus *M. sativa* (Gregerson et al., 1993), *A. thaliana* (Lam et al., 1996) und *Oryza sativa* (Goto et al., 1998) bekannt. Dieses Isoenzym scheint aber im Gegensatz zu der Fd-GOGAT vor allem in den Plastiden des nicht photosynthetischen Gewebes wie den Wurzeln, den Leitbündeln oder den sich entwickelnden Blättern von Bedeutung zu sein.

Eine besondere Rolle kommt der N-GOGAT in den Wurzelknöllchen von Leguminosen zu (Trepp et al., 1999a und b). Hier übernimmt sie zusammen mit der cytosolischen Form der Glutamin-Synthetase das Fixieren des Ammoniums, das von den Bakteroiden in die Pflanze exportiert wird (Temple et al., 1998). Dabei scheint es aber zumindest in Wurzelknöllchen von Bohnen zwei Isoformen der NADH-abhängigen GOGAT zu geben (I und II), von denen vor allem die Aktivität des Isoenzym II durch die Entwicklung von Knöllchen erhöht wird (Chen und Cullimore, 1988).

Die Ursprünge und die Evolution der verschiedenen GOGAT Isoformen in höheren Pflanzen können ohne eine Übersicht über das Vorkommen und die Organisation der GOGAT in anderen Organismen nicht verstanden werden.

1.3 Organisation von GOGAT Genen und Enzymen verschiedener Organismen

Zusätzlich zu den in Pflanzen nachgewiesenen Ferredoxin- und NADH-abhängigen Isoformen der GOGAT ist eine weitere bekannt. Diese NADPH-abhängige GOGAT (EC 1.4.1.13), die im allgemeinen in Eubakterien vorkommt, setzt sich aus zwei Untereinheiten zusammen (Oliver et al., 1987; Castano et al., 1992; Pelanda et al., 1993). Die große Untereinheit von ca. 150 kDa wird durch das *gltB*-Gen, die kleine (ca. 50 kDa) durch *gltD* kodiert (Oliver et al., 1987; Pelanda et al., 1993). Beide Gene sind bei *E. coli* hintereinander auf einem Operon lokalisiert (Oliver et al., 1987).

NADH-abhängige Enzyme (EC 1.4.1.14) kommen außer in höheren Pflanzen auch bei Tieren und Pilzen vor. Sie sind sowohl zu der großen (GltB) als auch zu der kleinen Untereinheit (GltD) der Glutamat-Synthase in Bakterien homolog. Beide Fragmente sind lediglich durch eine kurze hydrophile Region voneinander getrennt (Temple et al., 1998). Das für diese Isoform kodierende Gen (*glsN*) resultiert offensichtlich aus einer Fusion der beiden bakteriellen

Gene und zwar sowohl in den bisher untersuchten Pflanzen als auch in Pilzen und Tieren (Filetici et al., 1996; Suzuki und Gadal, 1984; Wilson et al., 1994). Es ist bei höheren Pflanzen im Kerngenom lokalisiert (Sakakibara et al., 1991; Gregerson et al., 1993).

Ferredoxin-abhängige Enzyme (EC 1.4.7.1) wurden bisher ausschließlich in photosynthetisch aktiven Pro- und Eukaryoten wie Cyanobakterien, Rhodophyta und Chlorophyta nachgewiesen. Das für diese Isoform kodierende *glsF*-Gen ist dem Gen für die große Untereinheit der N-GOGAT in Bakterien homolog, aber nicht mit einem *gltD*-Gen assoziiert. Es ist bei Rhodophyten auf dem Plastidengenom (Reith und Munholland, 1993; Valentin et al., 1993), bei Chlorophyten im Kern gelegen.

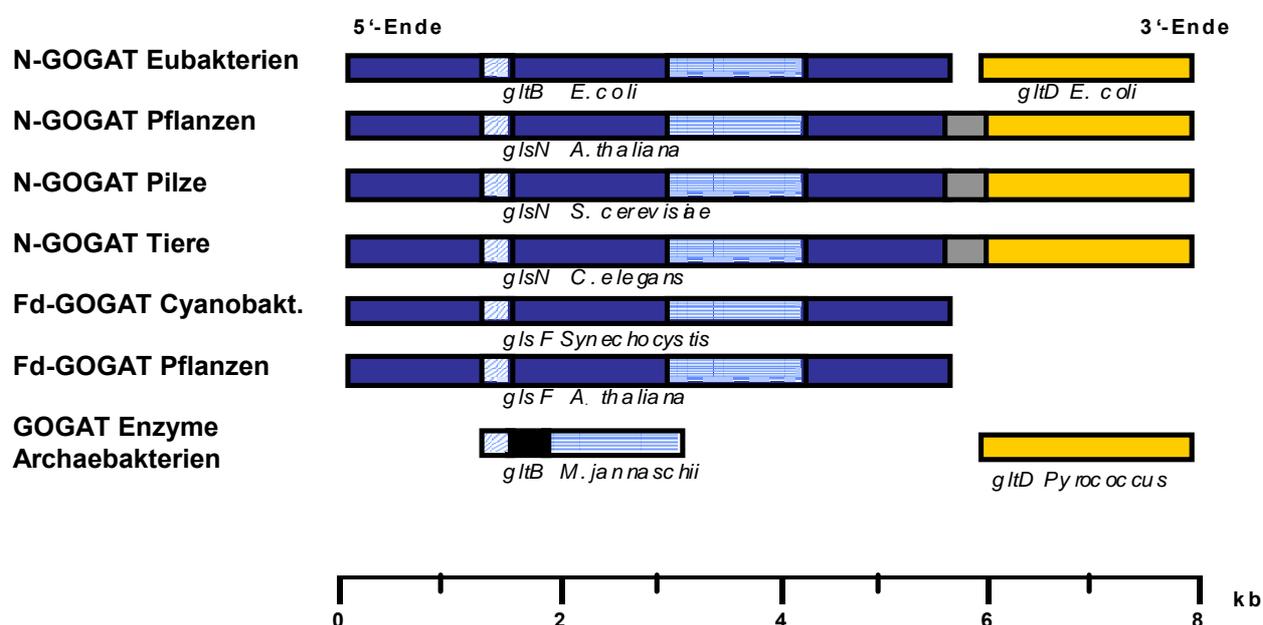


Abbildung 2: Homologien verschiedener GOGAT Gene (verändert nach Temple et al., 1998). Die Gene für die große (*GltB*) und die kleine (*GltD*) Untereinheit der Glutamat-Synthase sind bei *E. coli* hintereinander auf einem Operon gelegen (*gltBD*-Operon). In höheren Pflanzen, Pilzen und Tieren sind sie zu dem *glsN*-Gen fusioniert. Ferredoxin-abhängige Enzyme in Pflanzen und Cyanobakterien sind dagegen nur zu der großen Untereinheit der N-GOGAT in Bakterien homolog. In Archaeobakterien sind jeweils nur kleine Fragmente von *gltB*- oder *gltD*-homologen Genen vorhanden. Die blau gekennzeichneten Abschnitte mit Quer- sowie Diagonalstreifen kommen in allen *gltB*-homologen Genen einschließlich des GOGAT-Gens in *M. jannaschii* vor. Einfach blau markierte Bereiche: Homologe Bereiche in allen *gltB*-, *glsF*- und *glsN*-Genen ausgenommen der archaeobakteriellen GOGAT. Gelb gekennzeichnet sind alle *gltD*-homologen Gene bzw. Genabschnitte. Graue Bereiche: Linker zwischen fusionierten Genabschnitten.

Die Analyse einiger Genome von Archaeobakterien hat gezeigt, dass in dieser Gruppe zwei unterschiedliche putative GOGAT Enzyme vorkommen (Bult et al., 1996; Kawarabayasi et al., 1998; Klenk et al., 1997; Smith et al., 1997). Es handelt sich dabei um GOGAT Enzyme, die jeweils nur zu einem kleinen Fragment der Isoenzyme aus Eubakterien homolog sind. So konnte in *Pyrococcus* sp. *KOD1* eine GOGAT nachgewiesen werden, die zu der kleinen

Untereinheit aus *E. coli* (GltD) homolog ist (Jongsareejit et al., 1997). Ohne eine zusätzliche große Untereinheit ist das Enzym als Tetramer mit einem Molekulargewicht von 205 kDa als NADPH-abhängige GOGAT aktiv (IBID).

Die putative GOGAT in einem anderen Archaeobakterium (*Methanococcus jannaschii*) dagegen setzt sich aus zwei Fragmenten von GltB zusammen, die bei Eubakterien etwa 1,5 kb voneinander getrennt sind.

Ähnlichkeitstabellen, die auf der Basis von Aminosäure-Sequenzvergleichen von GOGAT Enzymen erstellt wurden, haben gezeigt, dass sowohl die Fd- als auch die NADH-GOGAT in Pflanzen hoch konserviert sind (60-90% Übereinstimmung) und dass beide Isoenzyme zueinander aber auch zu der bakteriellen N-GOGAT homolog sind (Röttgers, unveröffentlicht; Lenz, pers. Mitteilung; Temple et al., 1998). Eine phylogenetische Analyse dieser Isoenzyme ist jedoch vor dem Hintergrund der Evolution der Pflanzen an sich und insbesondere ihrer Organellen zu betrachten.

1.4 Endosymbiontentheorie, Evolution von DNA enthaltenden Organellen

Die Endosymbiontentheorie, die in ihrem Grundkonzept schon vor 100 Jahren formuliert wurde besagt, dass die DNA-haltigen Zellorganellen der Eukaryoten, die Mitochondrien und Plastiden, ihren phylogenetischen Ursprung in freilebenden Prokaryoten haben. Diese wurden in einem frühen evolutionären Stadium von einer Ur-Wirtszelle phagozytiert und dann als Endosymbionten integriert.

Die Frage nach dem Ursprung der Wirtszelle haben Martin et al., 1998 zu klären versucht. Nach der von ihnen formulierten Wasserstoff-Hypothese entstand die Ur-Eucyte aus der Fusion eines methanbildenden, von Wasserstoff abhängigen Ur-Archaeobakteriums mit einem H₂-produzierenden Ur-Proteobakterium. Das endosymbiontisch aufgenommene Proteobakterium könnte dabei sowohl der Vorläufer des Nukleus als auch der Mitochondrien sein (Martin et al., 1998; Martin und Müller, 1998).

Unabhängig von dieser Hypothese sollen Mitochondrien von α -Proteobakterien-ähnlichen Prokaryoten abstammen (John und Whatley, 1975; John, 1987; Yang et al., 1985; Cedergren et al., 1988; Gray et al., 1989; Van de Peer et al., 1990), während Cyanobakterien-ähnliche Prokaryoten als Vorläufer zumindest der primären Plastiden gelten (Margulis, 1981; Whatley und Whatley, 1981; Giovannoni et al., 1988; Gray, 1989).

1.4.1 Plastidenevolution

Grundsätzlich können zwei Typen von Plastiden voneinander unterschieden werden, die primären Plastiden der Chlorophyta, Rhodophyta und Glaucocystophyta, die von zwei Hüllmembranen umgeben sind und die komplexen Plastiden (Sitte, 1993) die von drei oder mehr Membranen umgeben sind (Bhattacharya und Medlin, 1998).

Die erste Gruppe von Plastiden sind Produkte der primären Endosymbiose, ihr Ursprung sind freilebende cyanobakterien-ähnliche Prokaryoten (Margulis, 1981; Whatley und Whatley, 1981; Giovannoni et al., 1988; Gray, 1989). Im Laufe der Evolution haben sie einen großen Teil ihrer ursprünglichen Gene in den Kern der Wirtszelle transferiert oder sie durch eukaryotische Wirtsgene ersetzt (Tingey et al., 1988; Palmer, 1991). Die meisten ihrer Proteine werden daher im Cytoplasma synthetisiert und anschließend in die Plastiden importiert (Lubben et al., 1988; Keeggstra, 1989).

Plastiden mit mehr als zwei Hüllmembranen, wie sie in den Gruppen der Euglenophyta, Dinoflagellata, Heterokonten Algen, Haptophyten, Apikomplexa, Cryptophyta und Chlorarachniophyta vorkommen, sollen nicht im Rahmen dieser primären Endosymbiosen verbunden mit der Inkorporierung eines Cyanobakteriums entstanden sein, vielmehr durch die Aufnahme bereits existierender photosynthetischer Eukaryoten („sekundäre Endosymbiose“, Gibbs, 1981; Ludwig und Gibbs, 1987; Douglas et al., 1991; Gray, 1992; Valentin et al., 1992; Häubner et al., 1994; Gilson und Mc Fadden, 1996; Palmer und Delwiche, 1996; Oliveira und Bhattacharia, 2000). Als phylogentischer Ursprung werden zum einen einzellige Grünalgen angesehen, zum anderen primitive Rotalgen. Als Ursprung von Plastiden in den Gruppen der Cryptophyta, Haptophyta und Heterokonta wird ein primitiver einzelliger Rotalgen-Endosymbiont angenommen. Dieser Zusammenhang ist auf der Basis von Sequenzvergleichen und der Anordnung von Plastidengenomen mittlerweile gut dokumentiert (Valentin und Zetsche, 1990; Douglas et al., 1991; Valentin et al., 1992; Bhattacharia und Medlin, 1995; Palmer und Delwiche, 1996; Daugbjerg und Andersen, 1997; Medlin et al., 1997; Douglas und Penny, 1999; Durnford et al., 1999).

Auch im Zuge der sekundären Endosymbiosen soll ein Transfer von Genen aus dem Genom des Symbionten in den Kern der sekundären Wirtszelle stattgefunden haben.

In jüngster Zeit gibt es Hinweise auf eine tertiäre Endosymbiose. Die ungewöhnlich pigmentierten Dinoflagellaten *Gymnodinium galatheanum*, *Gyrodinium aureolum* und

Gymnodinium breve besitzen Plastiden, die möglicherweise durch die Aufnahme einer Haptophyte entstanden sind (Tengs et al., 2000).

1.5 Evolution der GOGAT Isoenzyme

Unter Berücksichtigung der Endosymbiontentheorie läßt sich folgendes Modell für die Evolution der GOGAT Isoenzyme in Pflanzen erstellen (verändert nach Valentin et al., 1993): Für die heute in höheren Pflanzen vorkommenden GOGAT Isoformen (Fd-GOGAT und N-GOGAT) kann eine voneinander unabhängige Evolution angenommen werden. Von den pflanzlichen Enzymen ist die N-GOGAT die phylogenetisch ältere Isoform. Sie lässt sich auf die N-GOGAT in Bakterien zurückführen. Die Fusion der beiden bakteriellen Untereinheiten zu einem monomeren Enzym ist außer bei Pflanzen auch bei Pilzen (Cogoni et al., 1995) und niederen Tieren (Wilson et al., 1994) nachgewiesen worden. Das deutet darauf hin, dass dieses Isoenzym in der frühen Eukaryotenevolution entstanden ist. Auch phylogenetische Bäume lassen auf einen gemeinsamen Ursprung der eukaryotischen GOGAT Enzyme in der frühen Eukaryotenentwicklung schließen (Temple et al., 1998).

Ob die Ferredoxin-abhängige GOGAT erstmals bei den Cyanobakterien auftrat oder ihr Ursprung bei den Archaeobakterien zu suchen ist, ist bisher noch unklar (Dinkturk und Knaff, 2000). Zumindest scheint die Fd-GOGAT in höheren Pflanzen und Algen jedoch im Zuge der primären Endosymbiose von dem Cyanobakterien-Endosymbionten übernommen und in den pflanzlichen Stoffwechsel integriert worden zu sein (Valentin et al., 1993).

Anhaltspunkte für diese Hypothese sind, dass bei den Rotalgen *Porphyra purpurea* (Reith und Munholland, 1993), *Antithamnionella spirographidis* (Valentin et al., 1993) und *Cyanidium caldarium* (Glöckner et al., 2000) das für die Fd-GOGAT kodierende Gen (*glsF*) auf dem Plastidengenom liegt und dass die Sequenzen plastidärer Fd-GOGAT Enzyme phylogenetisch mit den Sequenzen aus Cyanobakterien clustern (Röttgers, unveröffentlicht; Temple et al., 1998).

1.6 Regulation der verschiedenen Isoenzyme

In höheren Pflanzen scheint die Expression der verschiedenen GOGAT Isoformen ihren Aufgaben in der Pflanze entsprechend reguliert zu sein. So haben die Plastidenentwicklung und der externe Faktor Licht auf die Expression der N-GOGAT offensichtlich keinen Einfluss (Wallsgrave et al., 1982, Murillo und Jimenez, 1985), während in allen untersuchten Pflanzen ein durch die Differenzierung der Plastiden und durch Licht induzierter Anstieg der Fd-GOGAT Enzymaktivität zu verzeichnen war (Matoh und Takahashi, 1981, Wallsgrave et al., 1982; Murillo und Sanchez de Jimenez, 1985, Suzuki et al., 1987, Hecht et al., 1988).

In *Arabidopsis* und Mais, in denen zwei voneinander unabhängige Ferredoxin-abhängige GOGAT Enzyme gefunden wurden, scheint jeweils nur eines dieser Isoenzyme unter photorespiratorischen Bedingungen essentiell zu sein und entsprechend durch Licht reguliert zu werden. Unter Einfluss von Licht ist ein Anstieg der Aktivität dieses Enzyms bis um das zehnfache zu verzeichnen (Avila et al., 1993).

Generell wird die N-GOGAT bei höheren Pflanzen konstitutiv exprimiert und ist verantwortlich für das Wachstum unter nichtphotorespiratorischen Bedingungen (Sommerville und Ogren, 1980; Wallsgrave et al., 1982).

In Alfalfa Wurzelknöllchen scheint die Expression der NADH-GOGAT von der Präsenz von Bakteroiden abhängig zu sein (Chen und Cullimore, 1988; Anderson et al., 1989; Gregerson et al., 1993; Vance et al., 1995). Beginnende Stickstofffixierung durch die Bakterioide führt zu einem dramatischen Anstieg der N-GOGAT Genexpression (Gregerson et al., 1993). In Mutanten mit leeren Wurzelknöllchen konnten dagegen keine Transkripte nachgewiesen werden (Trepp et al., 1999a).

1.7 GOGAT Enzyme und Gene in Algen

In den verschiedenen Gruppen von Algen ist bisher wenig über das Vorkommen der GOGAT bekannt. Fd-GOGAT Enzymaktivitäten konnten bisher nur in den Rhodophyten *A. spirographidis* und *C. caldarium* (Röttgers, unveröffentlicht) sowie den heterokonten Algen *Ochromonas danica* (Lenz, pers. Mitteilung), *Heterosigma carterae* und *Ectocarpus siliculosus* (Röttgers, unveröffentlicht) nachgewiesen werden. Die für sie kodierenden Gene (*glsF*) liegen bei Rhodophyta auf dem Plastidengenom (*P. purpurea*, Reith und Munholland, 1993; A.

spirographidis, Valentin et al., 1993 und *C. caldarium*, Glöckner et al., 2000), bei *O. danica* konnte dagegen ein zu *glsF*-Genen homologes Genfragment aus dem Kerngenom isoliert werden (Lenz, pers. Mitteilung).

Gene mit der größten Übereinstimmung zu den in höheren Pflanzen für die NADH-abhängige Isoform der GOGAT kodierenden *glsN*-Genen wurden bisher nur in den heterokonten Algen *O. danica* (Lenz, pers. Mitteilung) und *E. siliculosus* (Röttgers, unveröffentlicht) nachgewiesen. Das NADH-abhängige Isoenzym scheint in Pflanzen vor allem für den Grundstoffwechsel zuständig zu sein. Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass es auch in anderen Algengruppen vorhanden ist.

Neben den bereits aus höheren Pflanzen bekannten GOGAT Isoformen konnten in der heterokonten Alge *H. carterae* und der Rhodophyte *A. spirographidis* weitere Gene für GOGAT Enzyme gefunden werden (Röttgers, unveröffentlicht und Valentin, pers. Mitteilung). Die Sequenzen dieser Isoform clustern im phylogenetischen Baum mit der Aminosäuresequenz einer GOGAT aus einem alpha-Purpurbakterium (Röttgers, unveröffentlicht). Es handelt sich bei dieser GOGAT höchstwahrscheinlich ebenfalls um ein NAD(P)H-abhängiges Enzym. Zur Unterscheidung von den bereits bekannten GOGAT Enzymen und aufgrund ihrer Position im phylogenetischen Baum wird diese Isoform im weiteren Verlauf der Arbeit als „ α -GOGAT“ bezeichnet. Gene, die für diese Isoform kodieren, werden *gltA*-Gene genannt.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte genauer untersucht werden, welche Isoformen der GOGAT in verschiedenen Algenklassen vorkommen. Mit Hilfe spezifischer Enzymaktivitätstests sollten die Isoenzyme nachgewiesen und mittels Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) Fragmente der für sie kodierenden Gene isoliert werden.

Im nächsten Schritt sollte anhand der abgeleiteten Aminosäuresequenzen eine phylogenetische Analyse verschiedener GOGAT Isoenzyme durchgeführt werden. Diese ist vor dem Hintergrund der Endosymbiontentheorie und insbesondere der Plastidenevolution zu betrachten. Dazu wurden für die Analysen eine Reihe phylogenetisch interessanter Gruppen von Algen herangezogen. Aus der Gruppe der Algen mit primären Plastiden waren die

Rhodophyten von besonderem Interesse, weil sie als Vorläufer einer ganzen Reihe von komplexen (sekundären) Plastiden gelten.

Die Glaucocystophyte *Cyanophora paradoxa* ist ebenfalls ein interessantes Untersuchungsobjekt, weil ihre Cyanellen neben den roten und grünen Plastiden eine eigenständige Gruppe zu bilden scheinen, deren phylogenetische Einordnung bisher noch unklar ist.

Daneben sollte aus der Gruppe der Chlorophyta ein Vertreter untersucht werden, der phylogenetisch an der Basis dieser Klasse steht.

Neben den Rhodophyten sollten auch die heterokonten Algen einen Schwerpunkt der Arbeit darstellen. Ihre komplexen Plastiden sind aus primitiven einzelligen Rotalgen hervorgegangen (sekundäre Endosymbiose, Gibbs, 1981, Valentin und Zetsche, 1990, Valentin et al., 1992). Ihre GOGAT Enzyme können aus der Wirtszelle stammen oder aus der aufgenommenen Rotalge.

Ähnliches gilt für die Gruppen der Cryptophyta und der Haptophyta. Die Cryptophyta enthalten zusätzlich einen Nucleomorph, der als Rest des Rotalgenkerns betrachtet wird (Maier, 1992; Zauner et al., 2000).

Schließlich sollte die Regulation verschiedener GOGAT-Isoenzyme in den Gruppen der Rhodophyta, heterokonten und chlorophytischen Algen untersucht und mit Hilfe von biochemischen sowie molekularbiologischen Methoden erfasst werden. Dabei lag der Schwerpunkt auf der Regulation durch den Faktor Licht.

Soweit möglich, sollten zudem die unterschiedlichen Enzymaktivitäten verschiedenen Kompartimenten der Zelle zugeordnet werden.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsobjekte, Anzucht und Ernte der Algen

ALGEN MIT PRIMÄREN PLASTIDEN

2.1.1 Rhodophyta

Porphyridium aerugineum

(Taxonomy ID: 2792)

Linie: Rhodophyta; Bangiophyceae;

Porphyridiales; Porphyridiaceae; Porphyridium

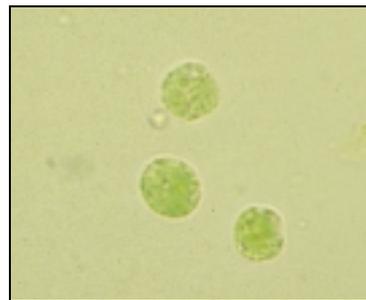


Abb. 3: *P. aerugineum* Zellen, 1600x

Cyanidium caldarium RKL

(Nagashima und Fukura, 1981)

(Taxonomy ID: 2771)

Linie: Rhodophyta; Bangiophyceae;

Porphyridiales; Porphyridiaceae;

Cyanidium



Abb. 4: *C. caldarium*, 250x

Antithamnionella spirographidis

(ehemals *Antithamnion* sp.)

(Taxonomy ID: 2767)

Linie: Rhodophyta; Florideophyceae;

Ceramiales; Ceramiaceae; Antithamnion



Abb.5: *A. spirographidis*, Ausschnitt aus Fadenthallus, 250x

Die Anzucht der Algenkulturen erfolgte für *C. caldarium* und *P. aerugineum* wie bei Steinmüller et al., 1983 und für *A. spirographidis* in dem von Kaling, 1983 beschriebenen Nährmedium.

2.1.2 Chlorophyta

Acetabularia acetabulum

(Taxonomy ID: 35845)

Linie: Chlorophyta; Ulvophyceae;

Dasycladales; Dasycladaceae; Acetabularia

Abb. 6: *A. acetabulum* (G. Felicini, entnommen der Datenbank algaeBASE)



Die Anzucht erfolgte wie bei Vogel (1998) beschrieben im Erd-Schreiber (ES) Medium (Schweiger et al., 1977).

2.1.3 Glaucocystophyta

Cyanophora paradoxa

(Taxonomy ID: 2762)

Linie: Glaucocystophyta; Glaucocystophyceae; Cyanophoraceae; Cyanophora

C. paradoxa wurde wie bei Valentin und Zetsche (1990) beschrieben in einem leicht modifizierten Kulturmedium nach Schenk (1977) angezogen.

ALGEN MIT KOMPLEXEN (SEKUNDÄREN) PLASTIDEN

2.1.4 Heterokontophyta

Heterosigma carterae

(ehemals *Olistodiscus luteus*)

(Taxonomy ID: 28465)

Linie: Heterokontophyta;

Raphidophyceae; Heterosigma



Abb.7: *H. carterae* Zelle; 250x

Ectocarpus siliculosus

(Taxonomy ID: 2880)

Linie: Heterokontophyta; Phaeophyceae;

Ectocarpales; Ectocarpaceae; Ectocarpus

Abb. 8: *E. siliculosus*, Ausschnitt aus dem Fadenthallus, 250x

Die Anzucht beider Algen erfolgte wie bei Röttgers (1996) beschrieben in O3- bzw. Provasoli's Medium.

2.1.5 Haptophyta***Cricosphaera carterae***

Taxonomy ID: 73021

Linie: Haptophyta; Haptophyceae; Isochrysidales

Die Anzucht erfolgte in einem Medium nach Schlösser (1994).

2.1.6 Cryptophyta***Guillardia theta***

(Taxonomy ID: 55529)

Linie: Cryptophyta; Cryptomonadaceae; Guillardia

Die genannten Arten stammten zum größten Teil aus der Algensammlung des Pflanzenphysiologischen Instituts in Göttingen. *H. carterae* wurde uns freundlicherweise von Prof. Rose Ann Catholico (Seattle) überlassen, *E. siliculosus* von Herrn Prof. Müller aus Konstanz und *C. paradoxa* von Prof. Schenk aus Freiburg. Die Alge *G. theta* wird in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U.G. Maier aus Marburg kultiviert, der uns freundlicherweise die DNA für unsere Untersuchungen zur Verfügung gestellt hat.

Die Anzucht aller Algen erfolgte unter 12stündigem Wechsel von Licht und Dunkelheit bei 20 °C und 3000 lux.

Die einzelligen Vertreter unter den verwendeten Arten (außer *A. acetabulum*) wurden 10 min bei 2500-3000 xg pelletiert und je nach Aufarbeitung entsprechend weiterbehandelt. Die Ernte der übrigen Algen erfolgte durch Abgießen durch ein engmaschiges Sieb, kurzes Waschen und Abtrocknen auf Filterpapier.

MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN

2.2 Isolierung von DNA

2.2.1 Klassische Methode

Die geernteten Algen wurden 10-30 min unter flüssigem Stickstoff gemörsert. Das auf diese Weise erhaltene Algenpulver wurde in 50 mM Tris-EDTA aufgenommen, mit SDS versetzt (Endkonzentration 1%) und für 1 h bei 60 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine zweimalige Phenol/Chloroform-Extraktion. Zur Trennung der wässrigen von der organischen Phase wurde jeweils 30-60 min bei 10 000 xg und 4 °C zentrifugiert. Die in der wässrigen Phase gelösten Nukleinsäuren wurden durch Zugabe von 2 Volumen Ethanol/NaAc (abs. Ethanol mit 1/20 VT 3 M Natriumacetat) gefällt, durch eine 20 minütige Zentrifugation (10 000 xg, 4 °C) pelletiert, mit 70%igem (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem geringen Volumen TE, pH 8,0 gelöst. Zur Entfernung der RNA wurde die DNA 30 min bei 60 °C mit RNase A (20 µg/ml) aus Rinderpankreas behandelt.

2.2.2 Genomic-Tip™ 100 G von QIAGEN

Bei Algen mit einem größeren Anteil an Polysacchariden und Polyphosphaten (z.B. *A. acetabulum*, *E. siliculosus*) war der auf Anionenaustauschchromatographie basierende Kit der Firma Qiagen sehr hilfreich. Auf flüssigem Stickstoff gemörserte Algen wurden mit 9,5 ml Puffer G2 (mit 200 µg/ml RNase A) und 0,5 ml Proteinase K-Lösung (20 mg/ml in H₂O bidest) versetzt und nach vorsichtigem Mischen für 2-3 h bei 50 °C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt (5000 xg, 15 min, 4°C) wurde der klare Überstand vorsichtig abgenommen und auf die mit 4 ml Puffer QBT äquilibrierte Qiagen-Säule gegeben. Nach 3 maligem Waschen mit 7,5 ml Puffer QC wurde die DNA mit 5 ml auf 50 °C vorgewärmtem Puffer QF von der Säule eluiert. Die Fällung der DNA erfolgte mit 3,5 ml Isopropanol, die Präzipitation bei 10 000 rpm für 45 min. Nach dem Waschen mit 70%igem (v/v) Ethanol wurde die DNA für 10 min getrocknet und in 0,1-1 ml TE-Puffer resuspendiert.

2.2.3 CTAB-Methode

P. aeruginosa weist einen besonders großen Anteil von Exo- und Endopolysacchariden auf, die eine DNA-Isolierung nach einer der oben beschriebenen Methoden erschweren. Es wurde daher für *P. aeruginosa* die CTAB-Methode gewählt. Die geernteten Algen wurden in einem 100 mM Tris-EDTA Puffer mit 2% (w/v) CTAB 1 h bei 65 °C lysiert. Nach einer Phenol/Chloroform-Extraktion sowie der Phasentrennung durch Zentrifugieren erfolgte die Fällung der Nukleinsäuren durch Isopropanol in einer Endkonzentration von 70% (v/v). Die pelletierte DNA wurde in TE Puffer, pH 8,0 aufgenommen, mit RNase A versetzt und mit Zeitsparalkohol ein zweites Mal gefällt. Nach dem Zentrifugieren, Waschen und Trocknen wurde die DNA in TE gelöst.

2.3 Caesiumchlorid-Dichtegradientenzentrifugation

Zur Aufreinigung der DNA und Fraktionierung in Organellen- und Kern-DNA wurde je nach Art jeweils 10 bis 20 µg Gesamt-DNA in Polallomer-Zentrifugenbechern mit 5-8 ml Caesiumchlorid in aqua bidest (1 g/ml) und 100 µl Hoechst-Farbstoff Nr. 33258 zusammengegeben. Die Auftrennung erfolgte in 48-62 Stunden bei 40 000 rpm und 18 °C in einer Beckmann-Ultrazentrifuge mit dem Rotor 70 Ti.

Unter UV-Licht wurden die fluoreszierenden DNA-Banden abgenommen und in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt. Der Farbstoff wurde durch dreimalige Extraktion mit caesiumchloridgesättigtem Isopropanol entfernt. Anschließend wurde die DNA mit 3 VT 80%igem Ethanol präzipitiert, pelletiert, mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in einem geringen Volumen TE, pH 8,0 gelöst.

2.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese auf Agarosegelen diente der Abschätzung von DNA-Konzentrationen sowie der Auftrennung von DNA-Fragmenten aus restriktionsenzymatischen Verdaus (2.6) und Produkten der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, 2.7). Es wurden 0,8 bis 1%ige ethidiumbromidhaltige (0,1-1 ng/ml) Agarosegele in einem TAC-Puffer (pH 8,0) verwendet.

Die Auftrennung erfolgte bei Spannungen von 5 bis 10V/cm Gellänge.

Als Längen- bzw. Konzentrationsstandard dienten der „Lambda DNA/*Eco*130I/*Mlu*I Marker“ bzw. der „GeneRuler™ Ladder Mix“ der Firma MBI Fermentas. Als Auftragspuffer kam der den Standards beigefügte 6 x Auftragspuffer zum Einsatz.

DNA-Fragmente gleicher Größe aber unterschiedlichen GC-Gehaltes konnten mit Hilfe von HA Dyes (HA red oder HA yellow) von der Firma Hansa Analytik (Bremen) voneinander unterschieden werden. Aufgrund spezifischer Anlagerungen der Dyes an die DNA werden AT-reiche (HA yellow) oder GC-reiche (HA red) Fragmente im Gel stärker abgebremst und so eine Auftrennung erreicht. Die Dyes werden in einer Konzentration von 1 µl/ml Gellösung in ein Agarosegel ohne Ethidiumbromid eingesetzt. Nach dem Lauf wurde das Gel unter Schütteln für 1 h in einem Ethidiumbromid-Bad angefärbt, dann 5-10 min unter fließendem Wasser entfärbt und ausgewertet.

2.5 DNA-Extraktion aus Agarosegelen und PCR-Ansätzen

Der Easy-Pure™-Kit der Firma Biozym ermöglicht das Isolieren sehr sauberer DNA aus Agarosegelen und Lösungen. Die Methode basiert auf einer Silicamatrix, die einzel- und doppelsträngige DNA ab einer Größe von 40 bp bindet. Dazu wurden die aus einem Gel ausgeschnittenen Agaroseblöckchen mit dem dreifachen Volumen „SALT“-Lösung bei 55 °C geschmolzen und die DNA an das „BIND“-Reagenz gebunden. Die weitere Aufreinigung erfolgte nach Herstellerangaben, die Inkubationszeiten wurden lediglich von 5 auf 15 min verlängert, um die Ausbeute zu erhöhen.

2.6 Restriktionsenzymatischer Verdau der DNA

Gesamt-, Kern- oder Plastiden-DNA wurde mit Hilfe von basenspezifischen Restriktionsendonucleasen in kleinere Fragmente geschnitten. Auf diese Weise konnten unter anderem in der nachfolgenden PCR bestimmte bereits bekannte Genfragmente als potentielle Amplifikate ausgeschlossen werden. Dazu wurden in einem Gesamtvolumen von 100 µl 500-1000 ng DNA mit 3 µl des entsprechenden Enzyms und 3 U eines passenden Reaktionspuffers versetzt und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Analog wurde DNA aus einer Plasmid-Minipräparation mit 1 U Restriktionsenzym in einem Volumen von 10 µl für 2 h verdaut.

2.7 Polymerase-Ketten-Reaktion

Zur Amplifikation partieller GOGAT-Sequenzen wurde die von Mullis und Faloona beschriebene Polymerase-Ketten-Reaktion eingesetzt (Mullis & Faloona, 1987).

Die verwendeten Primer wurden von den Firmen Genosys Biotechnologies sowie Gibco/BRL bezogen und sind im Anhang aufgelistet. Zur Amplifikation der „üblichen“ GOGAT-Genfragmente wurden die Primer „GOGAT9+“ und „GOGAT15-“ verwendet, bzw. im späteren Verlauf „GOGAT9+n“ und „GOGAT15-n“, die jeweils ein ca. 1,2 kb großes Fragment nahe dem 3' Ende von *gltB*- bzw. *glsF*-Genen einschließen.

Ein Standard PCR Ansatz enthielt 1 x PCR Puffer, 50 µM dNTPs, 2 ng jedes Primers, 2 mM MgCl₂, 100 ng DNA und 1 U Taq DNA Polymerase der Firma Eurogentec. Nach einer initialen Denaturierung von 3 min bei 94 °C wurden 35 Zyklen gefahren (30 s 94 °C; 30 s 52 °C und 2 min 72 °C). Abschließend erfolgte eine finale Elongation von 5-10 min bei 72 °C.

Die PCR-Reaktionen wurden in dem „Master-Cycler“ der Firma Eppendorf durchgeführt.

2.8 Klonieren von PCR-Produkten

Das Klonieren der amplifizierten GOGAT-Genfragmente erfolgte mit Hilfe des PCR TOPOTM Cloning Kits (Invitrogen), des InsT/AcloneTM PCR Product Cloning Kits der Firma MBI Fermentas, des PCR-ScriptTM AmpSk(+) Cloning Kits der Firma Stratagene sowie eines selbst hergestellten, leicht abgewandelten pBluescriptII KSTM-Vektors (pBluescript II KS-TA-Vektor). Alle verwendeten Vektoren sind im Anhang aufgeführt.

2.8.1. PCR TOPOTM Cloning Kit

Durch den Einsatz einer Topoisomerase als ligierendem Enzym ermöglicht der TOPO TA Cloning Kit der Firma Invitrogen eine sehr effiziente und schnelle Ligation von 3'A-PCR-Fragmenten in einen linearisierten und mit einem 3' Desoxythymidin-Überhang versehenen pCR2.1-Vektor (Shuman, 1994).

Das Protokoll erfolgte nach Herstellerangaben.

2.8.2 InsT/Aclone™ PCR Cloning Kit

Dieser Kit arbeitet mit einem Vektor mit 3`Desoxythymidin-Überhang (pTZ57R), jedoch anders als der TOPO-Kit mit einer Ligase als Enzym. Nach der Aufreinigung der PCR Produkte (2.7) erfolgte Ligation und Transformation nach Angaben des Herstellers.

2.8.3 PCR-Script™ AmpSk(+) Cloning Kit

Die Ligation bei diesem Kit der Firma Stratagene erfolgt ebenfalls in einen linearisierten TA-Vektor (pCR Script™ Sk(+)-Vektor). Die Ligationsreaktion wurde nach den Angaben des Herstellers durchgeführt, die Transformation in selbst hergestellte kompetente DH5 α -Zellen wie in 2.11 beschrieben.

2.8.4 Ligation in pBluescript II KS (+)-TA-Vektoren

Die PCR-Produkte wurden wie in 2.5 beschrieben aufgereinigt und in 15 μ l H₂O bidest aufgenommen. Nach Zugabe von 1 μ l TA-Vektor, 2 μ l 10x Ligasepuffer, 1 μ l PEG (50%ig) und 5 U T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) wurde vorsichtig gemischt und 2 h bei 22 °C bzw. über Nacht bei 16 °C inkubiert.

2.9 Herstellen des pBluescript II KS (+)-TA-Vektors

Das Herstellen des pKS-TA-Vektors erfolgte mit Hilfe einer terminalen Deoxynucleotidyl-Transferasereaktion (modifiziert nach Holton und Graham, 1991). Etwa 50 μ g des pBluescript II KS-Vektors wurden mit dem Restriktionsenzym *ECO RV* linearisiert und der Verdau auf einem 1%igen Agarosegel überprüft. Der geschnittene Vektor wurde anschließend mit Phenol/Chloroform aufgereinigt, mit Ethanol/NaAc (s.o.) gefällt und in 53 μ l H₂O aufgenommen.

Nach Zugabe von 15 μ l Terminaler Transferase-Puffer, 2 μ l 5 mM ddTTP sowie 5 μ l Terminaler Transferase (20 U/ μ l) erfolgte eine zweistündige Inkubation bei 37 °C. An die

Reaktion schloss sich eine Aufreinigung mit Phenol/Chloroform an. Die Konzentration des Vektors wurde auf 25 ng/μl eingestellt und in Aliquoten bei –20°C aufbewahrt.

2.10 Herstellen von kompetenten Zellen

Das angewandte Verfahren zur Herstellung kompetenter Zellen basiert auf einer Methode von Chung et al., (1989). Hierbei werden die Zellwände durch DMSO und PEG perforiert und die negativen Ladungen des Polyphosphations DNA durch Mg²⁺-Ionen abgeschirmt.

Zunächst wurde eine Vorkultur von DH5α-Zellen in 20 ml DYT-Medium bei 37 °C und 200 rpm über Nacht im Schüttler inkubiert. 1 ml dieser Vorkultur wurde in 100 ml DYT bis zu einer Zelldichte von 0,5 OD_{600nm} angezogen, bei 3500 rpm und 4 °C für 10 min abzentrifugiert und das Zellpellet in 10 ml eiskaltem TSS vorsichtig resuspendiert.

Die in TSS aufgenommenen Zellen wurden sofort in Aliquoten von 200 μl bei –70 °C gelagert.

2.11 Transformation in *E.coli* DH5α-Zellen

Bakterien sind unter Einwirkung eines Hitzeschocks in der Lage, Plasmide aufzunehmen. Ein Aliquot kompetenter DH5α-Zellen (200 μl) wurde auf Eis aufgetaut, unter vorsichtigem Mischen mit dem Plasmid versetzt, und anschließend 30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde zwei min einem Hitzeschock von 42 °C ausgesetzt, für 5 min auf Eis gestellt und mit 450 μl DYT-Medium 30 min bei 37 °C inkubiert.

Die Bakterien wurden anschließend auf DYT/AMP-Agarplatten mit X-Gal ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.12.1 Plasmidminipräparation mit Hilfe von „QIAprep Spin Plasmid“

Die Präparation der Plasmide erfolgte zumeist mit Hilfe des „QIAprep Spin Plasmid“ Kits der Firma Qiagen. Das Prinzip beruht auf der modifizierten Methode der alkalischen Lyse (Birnboim und Doly, 1979) und der Adsorption von DNA an Silica unter hohen Salzkonzentrationen.

Die Präparation wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

Alternativ zu der Originalanleitung wurde die alkalische Lyse mit Hilfe des Qiagen Puffer-Systems mit einer Fällungsreaktion kombiniert. Das Bakterienpellet wurde dazu in 100 µl Puffer P1 resuspendiert und mit 100 µl Puffer P2 unter vorsichtigem Schütteln lysiert. Nach Zugabe von 200 µl Puffer N3 wurden die ausgefallenen Proteine zusammen mit Zelltrümmern und der hochmolekularen Bakterien-DNA bei 13 000 rpm für 10 min pelletiert. Die im Überstand vorliegende Plasmid-DNA wurde mit 500 µl Isopropanol gefällt, mit 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in 120 µl TE-Puffer gelöst. 5 µl der isolierten Plasmid-DNA wurde für einen Testverdau eingesetzt.

2.12.2 Präparation der Plasmide mit dem Kit der Sequenzierfirma SeqLab

Für das Einschicken von Plasmiden zum Sequenzieren (siehe 2.14) wurden diese zum Teil mit dem Plasmid Miniprep Kit (100) der Firma SeqLab isoliert. Auch hier erfolgt die Präparation mit Hilfe der alkalischen Lyse, die DNA wurde anschließend mittels Ethanol-fällung präzipitiert. Es wurde nach Angaben des Herstellers gearbeitet.

2.13 DNA-Sequenzierungen

Zur Ermittlung von Nucleotidsequenzen klonierter GOGAT Genfragmente wurden zwei verschiedene Methoden verwandt, die jedoch beide auf der Termination von Polymerase-Reaktionen durch Nucleotidanalogs beruhen.

2.13.1 T7-Sequencing

Es wurde der T7-SequencingTM-Kit der Firma Pharmacia verwendet und mit ³⁵S-dATP nach Angaben des Herstellers gearbeitet (Dideoxy-Kettenabbruch-Methode nach Sanger et al., 1977; Smith, 1980). Als Primer dienten der M13 forward, der M13 reverse und genspezifische Primer, die im Anhang aufgelistet sind.

Die Auftrennung der resultierenden, radioaktiv markierten Fragmente erfolgte durch vertikale Elektrophorese auf 4 mm dicken, 5,7%igen Polyacrylamidgelen unter einer Leistung von ca.

1W/cm Gellänge. Als Puffersystem dienten 0,5 x TBE im oberen Puffertank und 1 x TBE + ½ VT 3 M NaAc im unteren Tank (modifiziert nach Brummet, 1991).

Die Autoradiographie erfolgte ü.N. durch Exposition der getrockneten Gele gegen einen Röntgenfilm der Marke Hyperfilm-MP (Amersham).

2.13.2 TAQ-Cycle-Sequencing

Diese für den ABI 373TM-Sequencer eingesetzte Methode basiert auf der Sequenzierung von ds-DNA-Molekülen mit Hilfe der Taq-Polymerase und spezifischen „Dye-Terminatoren“.

Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben (Perkin Elmer) durchgeführt.

2.13.3 Auftragssequenzierungen

Im fortgeschrittenen Verlauf der Arbeit wurden ansequenzierte GOGAT-Genfragmente von der Firma SeqLab in Göttingen durchsequenziert. Die Plasmide wurden mit dem Kit der Firma SeqLab isoliert (2.13.2).

2.14 Verwendete Computerprogramme zum Auswerten von DNA-Sequenzen

Zur Auswertung von DNA- und Proteinsequenzen dienten die Computerprogramme KRÖGER-MENÜ (Kröger und Kröger-Block, 1984), DNASIS und PROSIS (Hitachi Software, Yokohama, Japan). GOGAT-Sequenzen aus anderen Organismen konnten einer Datenbank (EMBL) entnommen werden.

Alignments abgeleiteter Aminosäuresequenzen wurden unter Verwendung von Clustal W (Higgins et al., 1992) erstellt.

Die Erstellung phylogenetischer Stammbäume erfolgte mit Hilfe von TREECON for windows, Version 1.3b (Van de Peer und Wachter, 1993).

2.15 Isolieren von Gesamt-RNA

In Abhängigkeit von der jeweils untersuchten Alge wurde die RNA-Isolation mit RNA-Clean™ der Firma AGS bzw. dem RNA/DNA Isolationskit (Genomic Tip 100) der Firma QIAGEN durchgeführt.

2.15.1 Gesamt-RNA-Isolation mit RNA-Clean

Bei der Isolierung von Gesamt-RNA mit RNA-Clean wird die Anwendung von Guanidiniumthiocyanat und LiCl mit einer Phenol/Chloroform-Extraktion kombiniert. Unter flüssigem Stickstoff gemörserte Algen wurden mit 5 ml RNA-Clean versetzt, gut gemischt und für 10 min bei RT stehen gelassen. Nach Zugabe von 1,5 ml Chloroform wurde für gut 30s gevortext und für 30-60 min auf Eis inkubiert. Die Phasentrennung erfolgte bei 12 000 rpm und 4 °C für 30 min. Die obere wässrige Phase wurde in einen neuen Corexbecher überführt und die RNA mit 1 VT Isopropanol bei –20 °C über Nacht gefällt. Nach dem Pelletieren der RNA bei 12 000 rpm für 30 min wurde der Überstand verworfen und das Pellet mit 70% Ethanol/DEPC gewaschen. Nach dem Trocknen der RNA unter der Cleanbench wurde sie in TE/DEPC pH 7,0 aufgenommen.

Zur Isolation kleinerer Mengen RNA konnte die Methode auch in Eppendorf-Reaktionsgefäßen mit entsprechend kleineren Volumina der eingesetzten Lösungen durchgeführt werden.

RNA-Clean-Extension

Bei einigen Arten wurde das Isolieren von reiner Gesamt-RNA durch einen hohen Gehalt an Polysacchariden erschwert. Diese Polysaccharidverunreinigungen konnten mit der Extension-Lösung der Firma AGS in den meisten Fällen ausreichend beseitigt werden. Die Anwendung erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.15.2 Qiagen RNA/DNA Kit

Alternativ dazu wurde der auf Anionenaustauschchromatographie basierende Kit der Firma Qiagen (Genomic Tip 100G) entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

2.16 Fällern von Gesamt-RNA mit LiCl

Durch den hohen Polysaccharidanteil vieler Algen kann es bei der Isolation von Gesamt-RNA leicht zu Kontaminationen mit DNA kommen. Diese konnten mittels LiCl-Fällung einfach entfernt werden. Dazu wurde die RNA mit LiCl in einer Endkonzentration von 2 M über Nacht bei 4 °C gefällt, bei 13 000 rpm in der Tischzentrifuge pelletiert, zweimal mit 70% Ethanol/DEPC gewaschen, getrocknet und anschließend in DEPC behandeltem H₂O aufgenommen.

2.17 Gewinnung von Poly(A)+ mRNA mit Dynabeads

Die Poly(A)+ mRNA wurde mit Hilfe von magnetischen Beads, an die Oligo(dT)25-Primer gekoppelt waren aus Gesamt-RNA isoliert (Dynabeads mRNA Kit von DYNAL, Hamburg).

Dazu wurden 75 µg Gesamt-RNA mit DEPC-behandeltem H₂O bidest auf ein Volumen von 100 µl gebracht. Nach Zusatz von 1 VT Binding Puffer wurde 2 min bei 65 °C denaturiert. 200 µl (1 mg) resuspendierter Dynabeads wurden im Magnetständer pelletiert und mit Binding Puffer gewaschen. Nach Zugabe von 100 µl Binding Puffer wurden die Dynabeads mit der Gesamt-RNA gemischt und der Ansatz 3-5 min bei RT inkubiert. Die gebundene mRNA wurde zwei Mal mit 200 µl Washing Puffer gewaschen und anschließend mit 10-20 µl Tris-HCl bei 65 °C 2 min eluiert.

Das Präzipitieren der Dynabeads erfolgte jeweils im Magnetständer (für 30 s). Nach dem Abnehmen des Überstandes wurden die Beads aus dem Ständer herausgenommen bevor sie in dem nächsten Puffer resuspendiert wurden.

2.18 RNA-Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung von RNA entspricht der DNA-Gelelektrophorese mit einigen Modifikationen:

- Verwenden von 1,5-2%igen Agarosegelen
- Einsetzen von DEPC-haltigem H₂O
- Denaturieren der RNA für 5-10 min bei 70 °C vor dem Auftragen auf das Gel

2.19 Reverse Transkription mit anschließender PCR (RT-PCR)

Die RT-PCR wurde als Alternative zu der PCR aus genomischer DNA zum Amplifizieren neuer GOGAT Genfragmente angewandt und darüber hinaus zum Bestimmen der Transkriptionsmenge spezifischer Gene unter verschiedenen Bedingungen (Semiquantitative RT-PCR). In Abhängigkeit von der Anwendung wurde mit universell einsetzbaren (z.B. 9+/15-) oder spezifischen Primern gearbeitet. Alle Primer sind im Anhang aufgelistet.

2.19.1 cDNA Erststrangsynthese

Die Erststrangsynthese erfolgte mit der MMLV Reversen Transkriptase (Promega) nach Herstellerangaben. Es wurden ca. 0,2 bis 2 µg Gesamt-RNA eingesetzt. Als Primer dienen ein oligo-dt-, sowie der random-Primer der Firma Gibco BRL.

Nach der abgeschlossenen Synthese wurde der Ansatz mit H₂O bidest 5fach verdünnt und in Aliquoten bei –80 °C gelagert. Für die anschließende PCR wurden 5 bis 10 µl der Erststrang-cDNA eingesetzt.

2.19.2 Semiquantitative RT-PCR

Die semiquantitative RT-PCR wurde mit allgemeinen GOGAT-Primern (9+/15-) sowie mit verschiedenen Gen-spezifischen Primern durchgeführt. Zur Kontrolle dienen außerdem auch PCR-Reaktionen mit 18S-, CAB- und Centrin-spezifischen Primern.

Die Bedingungen der PCR und insbesondere die Annealing-Temperatur und die Zyklenzahl wurden entsprechend angepasst.

10 µl eines PCR-Ansatzes wurden auf analytischen Agarose-Gelen aufgetrennt.

PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN

2.20 Probenvorbereitung

Die geernteten Algen wurden in Homogenisationspuffer durch Mörsern bzw. Ultraschall aufgeschlossen und durch Zentrifugieren (20 min, 10 000 rpm, 4 °C) geklärt. Die gewonnenen Extrakte wurden quantifiziert und anschließend bei –60 °C eingefroren (Fd-GOGAT-Messung) bzw. direkt für die Messung eingesetzt (N-GOGAT-Aktivitätstests).

2.21 Proteinquantifizierung

Das Bestimmen der löslichen Proteine erfolgte mit der Methode von ESEN (1978) photometrisch (PMQ3-Zeiss Spektralphotometer). Der Farbstoff Coomassie brilliant blue bindet spezifisch Proteine und besitzt ein Absorptionsmaximum bei 599 nm. Die gemessene Absorption verhält sich proportional zur Proteinmenge.

2.22 Bestimmung der Ferredoxin-abhängigen Glutamat-Synthase (Fd-GOGAT)

Die Bestimmung der Fd-GOGAT Aktivität beruht auf der Bildung von Glutamat aus Glutamin und 2-Oxoglutarat. Da Glutamat bereits im Rohenzymextrakt in größeren Mengen vorliegt, muss parallel zum Assay jeweils eine Kontrolle ohne das Substrat 2-Oxoglutarat gefahren werden. Als synthetischer Elektronendonator für das Ferredoxin dient Methylviologen, das mit Natriumdithionit in den reduzierten Zustand überführt wird. Die Bestimmung der Glutamatmenge, die pro Zeiteinheit gebildet wird, erfolgt mittels eines speziell dafür konzipierten HPLC-Laufs. Es handelt sich um eine verkürzte Analyse der freien Aminosäuren mittels HPLC (Varian Vista 5500). Sie beruht auf Methoden von Moore und Stein (1963) und erfolgt mit der Reverse-Phase-Technik und Vorsäulenderivatisierung mit Fluorenylmethyloxycarbonylchlorid (FMOC). Die Derivate werden auf der Säule (Varian RP-Säule MINO-TAGTM ODS-80) chromatographisch aufgetrennt und mit Hilfe eines Fluoreszenzdetektors (Shimadzu Fluoreszenz HPLC Monitor RF-535) gemessen. Die Messung

erfolgte mit einer Exzitationswellenlänge von 260 nm und bei einer Emissionswellenlänge von 310 nm. Ein interner Standard dient als Referenz für die Peakflächen der einzelnen Aminosäuren. Diese werden mit Hilfe von Aminosäurestandards anhand der Retentionszeiten identifiziert. Mit Hilfe gespeicherter Eichreihen, die jeweils durch fünf verschiedene Konzentrationen erstellt wurden, erfolgt die Quantifizierung.

Jeweils 200-500 ng Gesamtprotein wurden mit Assaypuffer auf ein Endvolumen von 3 ml aufgefüllt, kurz gevortext und für 1 h bei 20 °C inkubiert. Der Assay wurde gestoppt, indem 200 µl des Ansatzes entnommen, zum Fällern der Proteine mit 4,2 ml 4%iger Sulfosalicylsäure versetzt und für 1 h auf Eis gestellt wurden. Nach 10 min Zentrifugation in der Tischzentrifuge (3500 rpm) wurden zu 200 µl des Überstandes 4,4 ml 0,1 M Boratpuffer (pH 8,5) gegeben. Die Verdünnung mit Boratpuffer dient dem Einstellen des pH-Wertes bei dem die Derivatisierung der Aminosäuren mit acetonischer FMOC/CL-Lösung (9-Fluorenylmethyl-Chlorformiatlösung in Aceton) optimal ablaufen kann. Der Ansatz wurde durch ein 0,45 µm Filter filtriert und 30 µl der Lösung in ein Microinsert pipettiert. Nach dem Einsetzen der Inserts in die Racks des Autosamplers wurden alle folgenden Schritte automatisch durchgeführt (Varian Autosampler 9095). Zur Derivatisierung wurden die 30 µl Probelösung mit jeweils 30 µl FMOC-Lösung versetzt. Nach einer Reaktionszeit von 4 min erfolgte eine Flüssig-Flüssig-Extraktion mit jeweils 90 µl Pentanethylacetat zur Reduktion von FMOC-Nebenprodukten, die im Chromatogramm stören würden. Anschließend wurden 10 µl der Probelösung über die Säule aufgetrennt. Bei einer Gesamtlaufzeit von 33 min und einer Durchflussrate von 1,4 ml/min wurden die Puffer A und B (siehe Anhang) und Acetonitril zum Eluieren in folgender Weise gemischt (Tabelle 2.1).

Zeit [min]	Puffer A [%]	Puffer B [%]	Acetonitril [%]
0	75	0	25
13	61	0	39
14,5	60	0	40
15	31	30	39
16	0	62	38
19,5	0	62	38
27	0	30	70
29	0	25	75
31	0	25	75
33	75	0	25

Tabelle 1: Zusammensetzung des Eluats

Als interner Standard diene β -Thienylalanin in einer Endkonzentration von 12,35 pmol/10 μ l. Die Differenz des gebildeten Glutamats in Mess- und Kontrollansatz wurde, unter Berücksichtigung des Verdünnungsfaktors, in die Aktivitätseinheiten nmol pro mg Protein und min sowie in nkatal/mg Protein umgerechnet.

2.23 Messung der N-GOGAT-Aktivität

Die Messung der N-GOGAT-Aktivität erfolgte als optischer Test modifiziert nach Lea et al., 1990, in dem die spezifische Abnahme von NADH gemessen wird. Die Algen wurden wie in 2.1 beschrieben geerntet, im Extraktionspuffer für photosynthetisch aktives Gewebe (Lea et al., 1990) aufgeschlossen (2.22) und der Überstand direkt für die Messung eingesetzt. Die photometrische Bestimmung erfolgte in 0,1 mM NADH, 10 mM Glutamin, 10 mM 2-Oxoglutarat und 100 mM $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-KOH}$ (pH7,5) bei 366 nm für 10 bis 20 Minuten (RT). Da eine Abnahme von NADH auch unspezifisch erfolgen kann, wurden Kontrollen ohne Proteinextrakt, mit denaturiertem Protein sowie ohne das Substrat Glutamin parallel zu dem eigentlichen Messansatz analysiert.

2.24 Isolation von Plastiden

Wie in 2.1 beschrieben geerntete Zellen wurden in 5 ml Chloroplastenisolierungsmedium (CIM) gewaschen und erneut abzentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml CIM aufgenommen, eine kleine Probe abgenommen, abzentrifugiert und in 50-100 μ l Proteinpuffer mit 0,5% SDS resuspendiert.

Der restliche Ansatz wurde in einem Potter innerhalb von 1 h alle 10 min 10x aufgeschlossen. Das Aufbrechen der Zellen wurde unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach sanftem Abzentrifugieren (3 min, 3000 Upm, 4 °C) wurde der Überstand als cytoplasmatisch lösliches Protein aufbewahrt, das Plastidenpellet in CIM gewaschen und bei 5000 Upm 5 min abzentrifugiert. Das Plastidenpellet wurde in 100-200 μ l Proteinpuffer aufgenommen und auf 0,5% SDS eingestellt.

Die verschiedenen Fraktionen wurden direkt für die Messung eingesetzt oder bei -70 °C aufbewahrt.

2.25 Lösungen und Puffer

Puffer G2:	800 mM GuHCl, 30 mM EDTA, 30 mM Tris/Hcl, 5% (v/v) Triton X-100: pH 8,0
Puffer QBT:	750 mM NaCl, 50 mM MOPS, 15% (v/v) Ethanol; pH 7,0
Puffer QC:	1 M NaCl, 50mM MOPS, 15% (v/v) Ethanol; pH7,0
Puffer QF:	1,25 M NaCl, 50mM Tris/HCl, 15% (v/v) Ethanol; pH 8,5
Sequenzgel-Stammlösung:	375 ml 10M Harnstoff; 75 ml 38%/2% Acrylamid/Bisacrylamid; 50 ml 10xTBE
10xTBE:	108 g/l Tris, 55 g/l H ₃ BO ₄ ; 9,3 g/l Na ₂ -EDTA, aqua dest a.d. 1l
DYT-Medium:	16 g Trypton/Pepton, 10 g Hefeextrakt, 10 g NaCl a.d. 1l mit aqua dest.; pH 7,0, autoklaviert
DYT/Amp.-Platten:	1 l DYT-Medium, 15 g Agar-Agar, autoklaviert, 0,05g Ampicillin
50x TAC-Elektrophoresepuffer:	2 mM Tris-Acetat, 50 mM EDTA,; pH 8,0, autoklaviert
TE:	10 mM Tris/Hcl; ph 7,5, 1 mM EDTA
Homogenisationspuffer I (GOGAT-Test)	50 mM KH ₂ PO ₄ -KOH (pH 7,5), 100 mM Kcl, 5 mM (Fd-EDTA, 12,5 mM β-Mercaptoethanol, 1 mM PMSF, 2 mM 2-Oxoglutarat, 20% (v/v) Ethylenglycol, 0,05% (v/v) Triton X-100
Homogenisationspuffer II (N-GOGAT-Test)	50 mM Tris/HCl (pH 7,8), 0,1% Triton, 0,1% DTT, 1 Spatelspitze Polyclar AT
Färbelösung für Esen:	25% (v/v) Isopropanol, 10% (v/v) Essigsäure, 0,1% <i>Coomassie Brilliant Blue</i>
Sörensenpuffer:	80,8% 0,067 M KH ₂ PO ₄ -Lsg., 19,2% 0,067 M Na ₂ HPO ₄ -Lsg.; pH 7,4
Acetonische FMOC/Cl-Lsg.:	25,9 mg [9-Fluorenylmethyl]-chlorformiat a.d. 25 ml mit Aceton
Pentanethylacetat:	80 ml Pentan, 20 ml Ethylacetat
Eluent A:	0,015 M Natriumacetat, 0,01 M Tetramethylamoniumchlorid; pH 3,85 (Phosphorsäure), filtriert
Eluent B:	900 ml Eluent A (pH 4,5), 100 ml Methanol, filtriert
CIM:	0,33 M Sorbitol, 1 mM MgCl ₂ , 50 mM Hepes, 0,1%β-Mercaptoethanol

3. Ergebnisse

NACHWEIS VON GOGAT ENZYMEN UND DEREN GENEN IN VERSCHIEDENEN ALGENGRUPPEN

3.1 Nachweis von spezifischen GOGAT-Enzymaktivitäten in Algen mit primären und Algen mit sekundären Plastiden

Über die Präsenz aktiver GOGAT Enzyme und ihrer Coenzympezifität in den verschiedenen Gruppen von Algen ist bisher wenig bekannt. Zunächst sollte daher geklärt werden, ob hier, wie bei höheren Pflanzen, sowohl Fd- als auch NADH-abhängige GOGAT-Enzymaktivitäten nachweisbar sind. Dabei sollten sowohl Vertreter mit primären als auch solche mit komplexen Plastiden untersucht werden. Im Vordergrund standen dabei Algen der „roten Linie“, das heißt Vertreter der Rhodophyta sowie der Heterokontophyta, deren Plastiden sich von Rotalgen ableiten sollen. Aufgrund der großen phylogenetischen Distanzen innerhalb der Rhodophyta erschien es sinnvoll, zumindest aus dieser Gruppe unterschiedliche Arten für die Untersuchungen heranzuziehen. Innerhalb der Rotalgen wurden daher die primitive einzellige Alge *Porphyridium aeruginum* und die höher entwickelte thallöse Alge *Antithamnionella spirographidis* für die Messungen der Aktivität verwendet. Als Vertreter der Heterokontophyta kam *Heterosigma carterae* zum Einsatz, als Chlorophyte *Acetabularia acetabulum*.

Die Messungen der Aktivität beider Isoformen wurden wie in 2.22 und 2.23 beschrieben durchgeführt. Der typische Verlauf der mittels HPLC erstellten Aminosäureanalyse zur Bestimmung der Ferredoxin-abhängigen GOGAT Aktivität ist in Abbildung 9a und b am Beispiel von *H. carterae* dargestellt. Die photometrisch ermittelte Abnahme von NAD(P)H durch N-GOGAT Enzyme, gemessen ebenfalls in *H. carterae* Enzymextrakt, lässt sich exemplarisch in Abbildung 10 verfolgen.

Alle Messungen wurden mit Gesamtenzymextrakt aus Zellen die sich in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase befanden durchgeführt. Die Ernte erfolgte in der Mitte der Lichtphase. Die für die verschiedenen Isoenzyme gemessenen Aktivitäten in nkat/mg Protein mit den jeweils eingesetzten Coenzymen sind in Tabelle 2 aufgelistet.

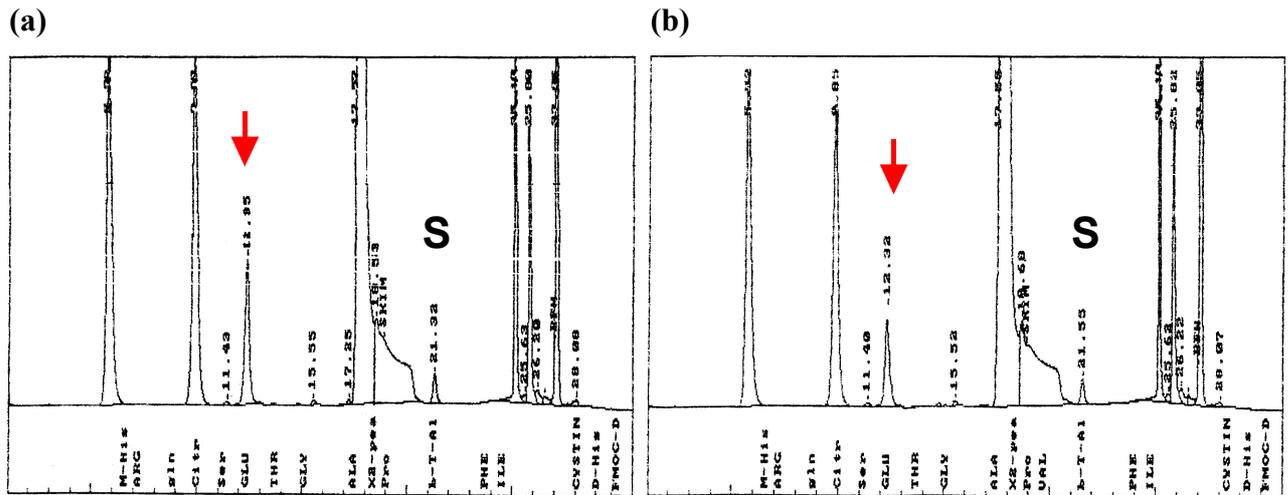
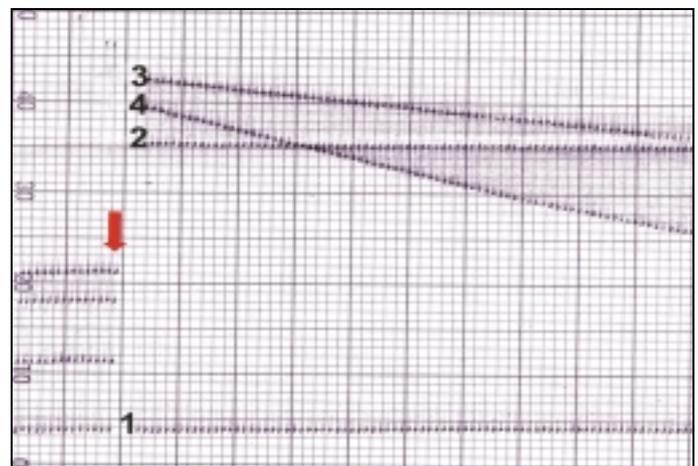


Abbildung 9a und b: Nachweis der Fd-GOGAT Aktivität in *H. carterae*. Der Nachweis der Fd-GOGAT Aktivität erfolgte über die Synthese von Glutamat aus Glutamin und 2-Oxoglutarat. Das gebildete Glutamat wurde mit FMOc derivatisiert und mit Hilfe der HPLC quantifiziert.

- a) Probenansatz mit dem Substrat 2-Oxoglutarat
 b) Negativkontrolle ohne das Substrat 2-Oxoglutarat
 S= interner Standard (β -tAlanin)
 → der Peak, den das eluierte Glutamat erzeugte.

Abbildung 10: Typischer Kurvenverlauf der Bestimmung von N-GOGAT Aktivitäten in der Alge *H. carterae*. Die Aktivität dieses Isoenzym wird über die Abnahme von NAD(P)H photometrisch verfolgt. Um sicherzustellen, dass nur die durch die GOGAT erzeugte Extinktionsabnahme in der Berechnung berücksichtigt wurde, wurden verschiedene Kontrollen durchgeführt:

- 1) nur Puffer
 - 2) Kontrolle mit denaturiertem Enzymextrakt
 - 3) Kontrolle ohne das Substrat Glutamin
 - 4) Messprobe: Rohenzymextrakt mit den Substraten Glutamin und 2-Oxoglutarat (1 mM)
- Zugabe von NAD(P)H



Innerhalb einer Art variiert die Höhe der Enzymaktivitäten stark in Abhängigkeit von externen Faktoren bzw. dem Entwicklungszustand der jeweiligen Algen. Aus diesem Grund wurde an dieser Stelle auf das Errechnen der Standardabweichung verzichtet. Die angegebenen Werte stellen die maximal in der jeweiligen Art gemessenen Enzymaktivitäten dar.

Art	Isoenzym	Reduktionsäquivalent	Aktivität [nkat/mg Protein]
Rhodophyta			
<i>P. aeruginum</i>	Fd-GOGAT	Methylviologen	0,04
<i>P. aeruginum</i>	N-GOGAT	NADH	keine Aktivität
<i>P. aeruginum</i>	N-GOGAT	NADPH	0,16
<i>A. spirographidis</i>	Fd-GOGAT	Methylviologen	0,08
<i>A. spirographidis</i>	N-GOGAT	NADH	keine Aktivität
<i>A. spirographidis</i>	N-GOGAT	NADPH	0,11
Heterokontophyta			
<i>H. carterae</i>	Fd-GOGAT	Methylviologen	0,25
<i>H. carterae</i>	N-GOGAT	NADH	0,76
<i>H. carterae</i>	N-GOGAT	NADPH	keine Aktivität
Chlorophyta			
<i>A. acetabulum</i>	Fd-GOGAT	Methylviologen	0,03
<i>A. acetabulum</i>	N-GOGAT	NADH	0,08
<i>A. acetabulum</i>	N-GOGAT	NADPH	keine Aktivität

Tabelle 2: Spezifische GOGAT Enzymaktivitäten in Vertretern der Rhodophyta, der Heterokontophyta und der Chlorophyta. Die Aktivitäten sind nach Coenzymspezifität getrennt in nkat/mg Protein aufgeführt.

3.1.1 Spezifische GOGAT-Enzymaktivitäten in Rhodophyten

Die Bestimmung der Fd-GOGAT Aktivität erfolgte wie in 2.22 beschrieben. Sowohl bei *P. aeruginum* als auch bei *A. spirographidis* war eine spezifische Zunahme an Glutamat in dem HPLC-Lauf mit Substrat gegenüber dem Kontrolllauf ohne Substrat zu messen. Diese betrug bei *P. aeruginum* 2,4 ng Glutamat/mg Protein, was einer spezifischen Enzymaktivität von 0,04 nkat/mg Protein entspricht. Mit *A. spirographidis*-Enzymextrakt lag die Methylviologen-abhängige Zunahme von Glutamat bei 4,8 nmol/mg Protein, die Aktivität betrug 0,08 nkat/mg Protein.

In höheren Pflanzen liegen die Werte gemessener Fd-GOGAT Aktivitäten zwischen 0,055 nkat/mg Protein in *Phaseolus vulgaris* (Chen und Cullimore, 1988) und 3,3 nkat/mg Protein in den Blättern von *Hordeum vulgare* (Pajuelo et al., 1997).

Die Messung der N-GOGAT Aktivitäten wurden entsprechend Lea, 1990 mit NADH als Coenzym durchgeführt. Weder in *P. aeruginum* noch in *A. spirographidis* war so eine N-GOGAT Aktivität nachweisbar. Erst nachdem anstelle von NADH NADPH als Reduktionsäquivalent eingesetzt wurde, konnte in beiden Algen eine spezifische Abnahme

der Extinktion bei 366 nm gemessen werden. Es wurde 9,6 (*P. aeruginum*) bzw. 6,7 ng (*A. spirographidis*) NADPH pro min und mg Protein umgesetzt. Daraus ergab sich für *P. aeruginum* eine NADPH-abhängige Aktivität von 0,16 nkat/mg Protein, für *A. spirographidis* von 0,11 nkat/mg Protein.

Die in Landpflanzen bisher nachgewiesenen N-GOGAT Aktivitäten lagen zwischen 0,024 nkat/mg Protein (*Arabidopsis thaliana*, Blätter; Suzuki und Rothstein, 1997) und 0,23 nkat/mg Protein (*Pisum sativum*, Wurzeln; Miflin und Lea, 1975).

3.1.2 GOGAT-Aktivitäten in der heterokonten Alge *H. carterae*

In der Heterokontophyte *H. carterae* konnte bereits zu einem früheren Zeitpunkt eine Ferredoxin-abhängige GOGAT Aktivität nachgewiesen werden (Röttgers, unveröffentlicht). Die Messungen dieses Isoenzym in der Alge dienten daher zur Überprüfung der Regulation von GOGAT Aktivitäten. Daneben sollte auf ein aktives NAD(P)H-abhängiges Enzym hin untersucht werden. Das war umso interessanter, als in den untersuchten Rhodophyten lediglich eine NADPH-abhängige GOGAT-Aktivität nachgewiesen wurde, bei *O. danica* (Lenz, pers. Mitteilung) aber eine N-GOGAT Aktivität mit NADH als Coenzym gemessen werden konnte.

Die spezifische Synthese von Glutamat durch die Fd-GOGAT betrug in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase 15,1 ng pro min und mg Protein, was einer Enzymaktivität von 0,25 nkat/mg Protein entspricht. Eine N-GOGAT Aktivität war in *H. carterae* nur mit NADH als Coenzym messbar. Das Enzym setzte 45,6 ng NADH pro min und mg Protein um, die gemessene spezifische Aktivität lag bei 0,76 nkat/mg Protein.

3.1.3 Nachweis von GOGAT Aktivitäten in der chlorophytischen Alge *A. acetabulum*

Um festzustellen, welche GOGAT-Typen in der einzelligen chlorophytischen Alge *A. acetabulum* präsent sind, wurden GOGAT Enzymaktivitäten in Proteinextrakten der Alge mit Ferredoxin, NADH und NADPH als Elektronendonator bestimmt. Sowohl eine Ferredoxin-abhängige als auch eine NADH-abhängige GOGAT konnte in dieser Grünalge nachgewiesen werden. Eine signifikante NADPH-abhängige Enzymaktivität konnte nicht gemessen werden.

Mit Methylviologen als Coenzym wurden 1,8 ng Glutamat pro min und mg Protein gebildet, das entspricht einer Aktivität von 0,03 nkat/mg Protein für die Fd-GOGAT. Der spezifische Umsatz von NADH lag bei 4,8 ng/min und mg Protein. Daraus lässt sich eine N-GOGAT Aktivität von 0,08 nkat/mg Protein ermitteln.

3.2 Kontrolle der N-GOGAT Messungen mit dem spezifischen Hemmstoff Azaserin

Azaserin kann als spezifischer Hemmstoff der Glutamat-Synthase eingesetzt werden. Seine Wirkung beruht auf der Verdrängung von Glutamin als Substrat der GOGAT. In einer Endkonzentration von 1 mM kann die Synthese von Glutamat damit vollständig verhindert werden (Wallsgrave et al., 1982; Oaks et al., 1988).

Alle in den aufgeführten Species gemessenen GOGAT-Aktivitäten sollten durch den Einsatz von Azaserin kontrolliert werden. Dazu wurden sowohl der Messprobe als auch der normalen Kontrolle 1 mM Azaserin zugesetzt. Daraufhin waren keine messbaren Unterschiede zwischen der Probe und dem eigentlichen Kontrollansatz mehr zu erkennen. Bei der Messung der Ferredoxin-abhängigen GOGAT-Aktivität konnte mit der HPLC keine spezifische Zunahme an Glutamat in der Probe gegenüber der Kontrolle gemessen werden (ohne Abbildung). Im Falle der NAD(P)H-abhängigen Enzymaktivität verlief die Abnahme von NAD(P)H in beiden Ansätzen gleich, beide nahmen außerdem in gleicher Weise ab wie die Kontrolle (-Glutamin) aus dem Messansatz ohne Azaserin (Abbildung 11).

Damit konnte gezeigt werden, dass die in 3.1 gemessenen Enzymaktivitäten tatsächlich spezifische Fd- bzw. NAD(P)H-abhängige GOGAT-Aktivitäten darstellen.

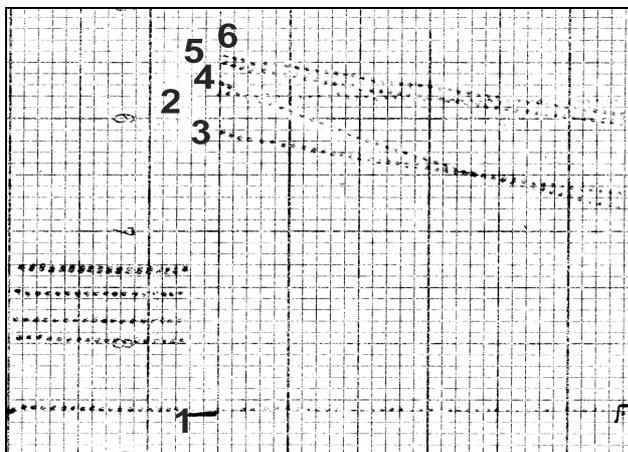


Abbildung 11: Messung der N-GOGAT Aktivität mit dem Hemmstoff Azaserin. Die Bestimmung der N-GOGAT-Aktivität wurde wie in 2.22 beschrieben durchgeführt. Zusätzlich zu den üblichen Ansätzen wurden in 2 Küvetten die Messprobe (Ansatz 6) sowie der Kontrollansatz (Ansatz 5) mit 1 mM Azaserin versetzt.

- 1) Kontrolle mit Puffer
- 2) Kontrolle mit denaturiertem Protein
- 3) Kontrolle ohne das Substrat Glutamin
- 4) Messprobe
- 5) Kontrolle ohne Glutamin + 1 mM Azaserin
- 6) Messprobe + 1 mM Azaserin

3.3 Vorgehensweise bei der Klonierung von GOGAT-Teilsequenzen

Nachdem die GOGAT Aktivitätstests gezeigt hatten, dass in den Gruppen der Rhodo-, der Heterokontophyta und der chlorophytischen Algen sowohl Fd- als auch N-GOGAT Enzyme vorkommen, sollten die für sie kodierenden Gene nachgewiesen werden. Diese Untersuchungen wurden neben den in den Aktivitätstests bearbeiteten Algenklassen auch auf weitere phylogenetisch interessante Gruppen ausgeweitet (Cryptophyta, Haptophyta und Glaucocystophyta).

Aus allen Arten sollten mittels PCR Fragmente von GOGAT Genen amplifiziert werden mit dem Ziel, zumindest aus einzelnen Arten einen kompletter Satz an verschiedenen GOGAT Genen (Fd-, N- und α -GOGAT) zu erhalten. Dazu wurde zunächst aus allen Algen Gesamt-DNA isoliert, diese über Cäsiumchlorid-Dichtegradienten aufgetrennt und gereinigt und die verschiedenen DNA-Fraktionen für eine PCR-Reaktion mit GOGAT-Primern (9+/15-; vgl. Abbildung 12) eingesetzt.

3.4 Amplifikation von GOGAT-Genfragmenten

Aminosäurealignments bekannter GOGAT-Sequenzen ergeben 15 konservierte Bereiche, die sich zur Auswahl von PCR-Primern eignen. Das Primerpaar 9+/15- erwies sich als besonders erfolgreich (Röttgers, unveröffentlicht) und wurde von K. Valentin für die Arbeit zur Verfügung gestellt. Die Sequenzen sind im Anhang aufgelistet.

In allen bekannten GOGAT Genen schließen diese beiden Primer eine Sequenz von ca. 1,2 kb ein (9+/15- GOGAT Fragment). Die Lage dieses Fragmentes auf dem Gesamtgen ist in Abbildung 12 dargestellt.

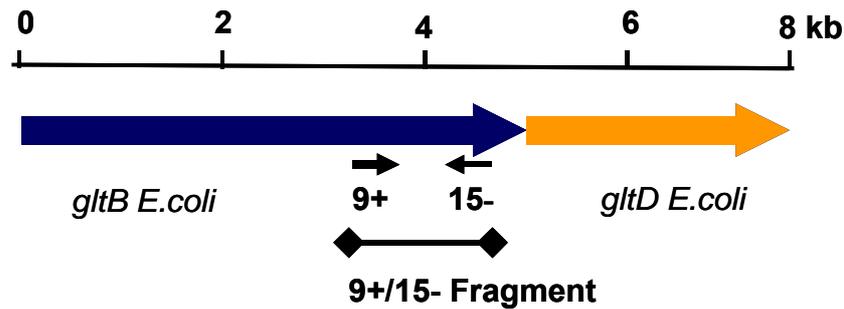


Abbildung 12: Lage des 9+/15- Genfragmentes am Beispiel des GOGAT-Gens aus *E. coli*. Das Fragment liegt nahe dem 3'Ende von *gltB*.

Der Grad der Konservierung innerhalb dieses Bereichs liegt bei ca. 50% zwischen unterschiedlichen Isoenzymen und meist 60-70, bis hin zu weit über 90% bei Enzymen einer Isoform (Röttgers, unveröffentlicht; Lenz, pers. Mitteilung). Dabei findet sich die größte Übereinstimmung am 5'Ende des 9+/15- Fragmentes, hier wird offensichtlich eine FMN Bindungsstelle kodiert. Bei *M. sativa* liegt diese 57 Aminosäure lange Region nur etwa 70 Aminosäuren von der Sequenz entfernt, an der der 9+ Primer bindet (Gregerson et al., 1993). Ähnlich verhält es sich bei den anderen bekannten GOGAT Sequenzen.

In fast allen Fällen ließen sich mit den oben genannten Primern aus aufgereinigter DNA ein bis zwei Fragmente von GOGAT Genen pro untersuchter Art isolieren, die kloniert und charakterisiert werden konnten.

Da sich verschiedene Gene aus einem Genom oft sehr unterschiedlich gut amplifizieren ließen, resultierten aber aus wiederholten PCRs stets identische Fragmente. Es wurden verschiedene Verfahren gewählt, um die Vielfalt an GOGAT Genen aus einer Art zu erhöhen.

1. Spezifischer restriktionsenzymatischer Verdau der DNA

Mit Hilfe einer Kartierung bereits vorhandener GOGAT-Klone (Daten nicht gezeigt) bzw. dem Programm DNASIS konnten spezifische Schnittstellen für Restriktionsenzyme in den bekannten Sequenzen ermittelt werden. Die für die PCR eingesetzte DNA konnte vorher mit dem jeweiligen Enzym wie in 2.6 beschrieben verdaut und das entsprechende Fragment so als mögliches PCR-Produkt ausgeschlossen werden.

Abbildung 13 a zeigt den restriktionsenzymatischen Verdau von Gesamt-DNA aus der heterokonten Alge *H. carterae*. Die bereits zu Beginn dieser Arbeit vorliegenden GOGAT-Klone aus *H. carterae* ließen sich mit *Bam*HI (*HcartA1*) bzw. *Eco*RV (*HcartA2*) schneiden

(Röttgers, unveröffentlicht). Entsprechend wurde die DNA 1x nur mit *Bam*HI, 1x mit *Eco*RV und 1x mit *Bam*HI und *Eco*RV verdaut. Anschließend wurden aus allen Ansätzen gleiche Mengen DNA in der PCR eingesetzt. Zur Kontrolle wurde auch unverdaute DNA verwendet. In Abbildung 13 b sind die daraus resultierenden PCR-Produkte gezeigt. Offensichtlich sind durch den Verdau bestimmte Gen-Fragmente als Amplifikate ausgeschlossen worden. Die Menge an PCR-Produkt aus DNA, die mit einem Restriktionsenzym verdaut (Spur 3 und 4) wurde, ist bereits verringert gegenüber dem aus unverdauter DNA. Bei der DNA, die mit beiden Enzymen geschnitten wurde, nimmt die Menge an Amplifikat noch einmal deutlich ab.

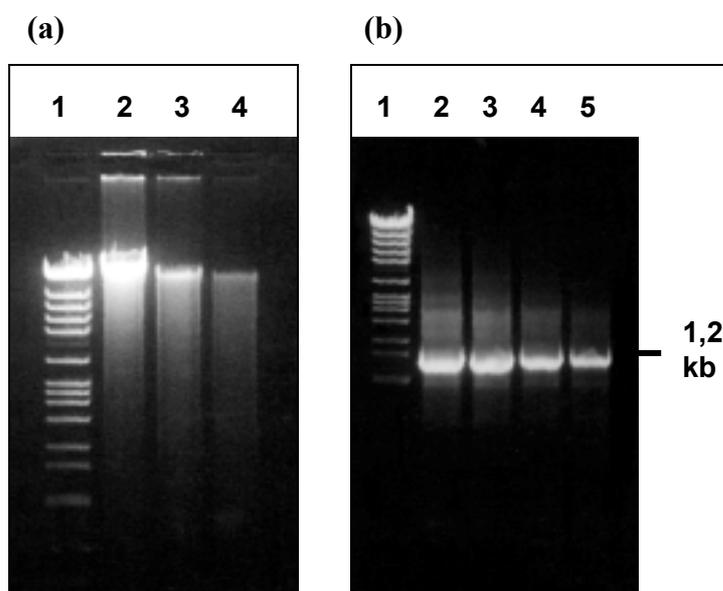


Abbildung 13 a und b: Spezifischer restriktionsenzymatischer Verdau von *H. carterae* Gesamt-DNA mit anschließender PCR.

13 a) jeweils 100 ng Gesamt DNA wurden mit den Restriktionsenzymen *Bam*HI (Spur2), *Eco*RV (Spur3) sowie *Bam*HI und *Eco*RV verdaut und auf einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt.

13 b) in die nachfolgende PCR wurden unverdaute DNA aus *H. carterae* (Spur2), *Bam*HI-verdaute (Spur3), *Eco*RV-verdaute (Spur4) sowie mit beiden Enzymen verdaute (Spur 5) eingesetzt.

Spur 1 auf beiden Gelen: Lambda DNA *Eco*1301/*Mlu*I Marker

2. Anwendung der RT-PCR

Möglicherweise lassen sich einige Gene schlechter amplifizieren, weil sie ein Intron enthalten. Um diese trotzdem isolieren zu können, wurde in einigen Fällen die in 2.19 beschriebene RT-PCR zur Vervielfältigung von partiellen GOGAT Genen gewählt. In dem Fall der Alge *Cyanophora paradoxa* ließ sich nur auf diese Weise überhaupt ein Genfragment klonieren.

3. Synthese neuer universeller GOGAT Primer (9+n, 15-n und 8+)

Im Verlauf der Arbeit konnten aus der Datenbank GENBANK weitere Sequenzen für GOGAT Gene und deren Aminosäuresequenzen entnommen werden. Erneute Alignments ermöglichten die Synthese der Primer 9+n und 15-n. Diese binden an den selben

Sequenzabschnitten wie die Primer 9+ und 15-, unterscheiden sich von diesen aber durch stärkere Degenerierung (Anhang).

Der Primer 8+ dagegen bindet außerhalb des 9+/15- Fragmentes, etwa 40 Aminosäuren vor dem 9+ Primer.

4. Einsatz von HA-dyes

Mit Hilfe der HA-dyes yellow konnte schnell überprüft werden, ob Fragmente aus verschiedenen GOGAT Genen amplifiziert wurden, falls diese sich in ihrem GC-Gehalt voneinander unterschieden. So konnten z.B. durch den Einsatz unterschiedlicher Primerkombinationen (vgl. 3) neu auftretende PCR-Produkte erkannt und diese spezifisch kloniert werden.

Abbildung 14 zeigt eine Auftrennung der Amplifikate aus *H. carterae* unter Verwendung der HA-dyes yellow. Zur Kontrolle wurden die ursprünglich verwendeten Primer 9+ und 15- eingesetzt. Daneben die Primerkombinationen 9+/15-n, 9+n/15- und 9+n/15-n. Die Kombination 9+/15-n zeigte die besten Ergebnisse. Hier war nach der Auftrennung im 1%igen HA-dye-haltigen Gel eine zusätzliche Bande zu erkennen, die daraufhin ausgeschnitten, aufgereinigt und kloniert werden konnte.

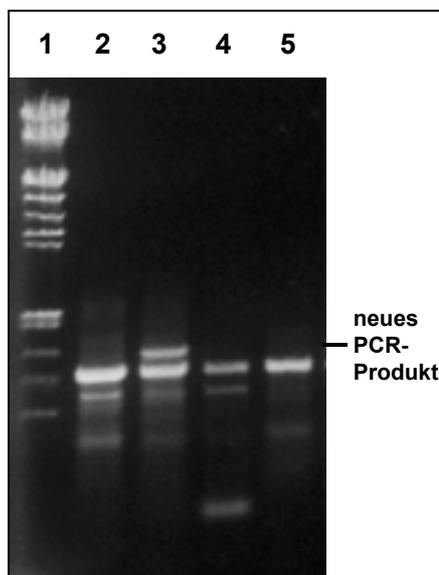


Abbildung 14: Auftrennung von *H. carterae* PCR-Produkten in einem HA-dye yellow haltigen 1%igen Agarosegel. Die Auftrennung erfolgt aufgrund des unterschiedlichen GC-Gehaltes verschiedener Amplifikate. Zur Kontrolle diente die Primerkombination 9+/15-.

Spur 1: Lambda DNA *Eco1301/MluI* Marker

Spur 2: *H. carterae* PCR Produkte, 9+/15- Primer

Spur 3: *H. carterae* PCR Produkte, 9+/15-n

Spur 4: *H. caretrae* PCR Produkte, 9+n/15-

Spur 5: *H. carterae* PCR Produkte, 9+n/15-n

3.4.1 GOGAT Gene in Rhodophyta

In Rotalgen waren bisher drei Gene für Ferredoxin-abhängige GOGAT Enzyme (*glsF*; Reith und Munholland, 1993; Valentin et al., 1993; Röttgers, unveröffentlicht; Glöckner et al., 2000) nachgewiesen worden sowie ein Genfragment für eine α -GOGAT aus *A. spirographidis* (Valentin, pers. Mitteilung). Es sollten aus verschiedenen Arten weitere Gene isoliert werden. In *A. spirographidis* sollte insbesondere ein Gen für eine N-GOGAT nachgewiesen werden. In *C. caldarium* fehlte der Nachweis für eine α -GOGAT, sowie für eine N-GOGAT. Aus *P. aeruginosum* war noch für keines der Isoenzyme ein zugehöriges Gen isoliert worden.

Mit Hilfe der in 3.4 beschriebenen Methoden gelang es aus *C. caldarium* Kern-DNA drei weitere Genfragmente zu amplifizieren, *CcalN1*, *CcalN2* und *CcalA*. Die Abkürzungen „N“ und „A“ stehen dabei für N-GOGAT bzw. α -GOGAT. Die DNA- sowie die Aminosäuresequenzen sind im Anhang dargestellt. Die Analyse mittels Alignment und phylogenetischem Baum (siehe 3.6) zeigte, dass *CcalN1* und *CcalN2* den N-GOGATs zuzuordnen sind. Das Gen *CcalN1* zeigt innerhalb des 1180 bp großen klonierten Fragments die größte Übereinstimmung zu der N-GOGAT aus *E. siliculosus* (72,4%), während die Ähnlichkeiten zu anderen Isoenzymen bei 50,5% (Fd-GOGAT aus *C. reinhardtii*) bzw. 49,0% (α -GOGAT aus *Zymomonas*) liegen. *CcalN2* weist ebenfalls die größte Ähnlichkeit zu der N-GOGAT aus *E. siliculosus* auf (65,5%). Die Ähnlichkeit zu der Fd-GOGAT II aus *A. thaliana* betrug 50,0%, die zu den α -GOGAT Enzymen maximal 50,7% (*A. brasilense*).

Die ermittelte Aminosäuresequenz für das Gen *CcalA* dagegen clustert im phylogenetischen Baum mit den α -GOGAT Enzymen. Die größte Übereinstimmung zeigt es zu dem entsprechenden Isoenzym A1 aus *A. spirographidis* (98,7%), die Homologiewerte für die Fd- und die N-GOGAT liegen bei 52,2% (Fd-GOGAT aus *Synechocystis*) bzw. 52,1% (N-GOGAT aus *O. danica*; *OdanN1*).

Aus *P. aeruginosum* DNA konnten zwei Genfragmente gewonnen werden. Die DNA- und Aminosäuresequenz sind im Anhang dargestellt. Die phylogenetische Analyse der mittels PCR-ScriptTM AmpSK(+) Cloning kits klonierten Gene zeigte, dass das Genprodukt von *PaerFd* dem Ferredoxin-abhängigen Isoenzym zuzuordnen ist, während die aus *PaerN* resultierende Aminosäuresequenz eindeutig zu den N-GOGATs gehört. Die Übereinstimmung der Fd-GOGAT zu anderen bereits bekannten Sequenzen beträgt 71,3% (Fd-GOGAT aus *P. purpurea*), 53,5% (N-GOGAT aus *Xylella fastidiosa*) sowie 52,2% (α -GOGAT aus *Azospirillum brasilense*). Das Genprodukt von *PaerN* ähnelt mit einem Wert

von 64,5% am meisten der N-GOGAT aus *Plectonema boryanum*, ihre Ähnlichkeit zu Fd-abhängigen Enzymen liegt bei 51,2% (aus *P. purpurea*), der zu α -GOGAT Enzymen bei 50,8% (aus *A. brasilense*).

Aus *A. spirographidis* Kern-DNA konnten vier zusätzliche Fragmente von GOGAT Genen isoliert werden. Die DNA- und Aminosäure-Sequenzen sind im Anhang abgebildet. Zwei der Sequenzen clustern im phylogenetischen Baum mit den Sequenzen der eukaryotischen N-GOGATs, davon zeigt *AspirN1* die größte Ähnlichkeit zu der N-GOGAT aus *E. siliculosus* (73,1%), die Übereinstimmung zu den anderen Isoformen liegt bei 50,0% (Fd-GOGAT, *P. purpurea*) bzw. 49,5% (α -GOGAT, *A. brasilense*). *AspirN2* ist mit 68,5% Übereinstimmung ebenfalls der N-GOGAT aus *E. siliculosus* am ähnlichsten, die Ähnlichkeitswerte zu anderen GOGAT Isoformen betragen 50,0% (*C. caldarium*, Fd-GOGAT) sowie 50,7% (α -GOGAT, *A. brasilense*).

Die anderen beiden Sequenzen (*AspirA2* und *AspirA3*) lassen sich mit 95,9% (*H. carterae* A1) bzw. 88,5% (α -GOGAT, *Rhodobacter sphaeroides*) Übereinstimmung in die Gruppe der α -GOGAT Enzyme einordnen. Zu den anderen Isoformen verhielten sie sich deutlich weniger ähnlich (52,5% und 53,9% zur Fd-GOGAT Enzymen aus *Synechocystis*, 53,5% und 53,1% zu der N-GOGAT aus *O. sativa* bzw. *O. danica* N1).

3.4.2 GOGAT Gene in heterokonten Algen

Aus der Gruppe der Heterokontophyta wurden *H. carterae* und *Ectocarpus siliculosus* für die Analyse der GOGAT Gene eingesetzt. Aus beiden Arten waren bereits vor Beginn der Arbeit Fragmente aus GOGAT Genen kloniert worden. Es waren in *H. carterae* allerdings lediglich zwei Gene für α -GOGATs nachgewiesen worden, in *E. siliculosus* ein Gen für eine N-GOGAT.

Mit Hilfe der in 3.4 beschriebenen Methoden gelang es aus *H. carterae* DNA zwei weitere Genfragmente zu amplifizieren. Die DNA- sowie die Aminosäuresequenzen der in den pksT-Vektor ligierten ca. 1,2 kb großen Fragmente sind im Anhang dargestellt. Die Analyse mittels Alignment und phylogenetischem Baum (siehe Abbildung 18) ergab, dass *HcartN* die größte Ähnlichkeit zu den bereits bekannten Genen für N-GOGAT Enzyme aufweist (66,4% zu der N-GOGAT aus *E. siliculosus*). Die Homologie zu der Fd-GOGAT (II) aus *A. thaliana* betrug

50,7%, die zu den α -GOGAT Enzymen 50,8% (*A. brasilense*). Dagegen erwies sich *HcartA3* als eine weitere Form der α -GOGAT Enzyme mit der größten Übereinstimmung zu dem entsprechenden Isoenzym aus *R. sphaeroides* (92,2 %). Damit konnte aus *H. carterae* das dritte für eine α -GOGAT kodierende Gen nachgewiesen werden.

Aus *E. siliculosus* Kern-DNA konnten zwei weitere Genfragmente gewonnen werden. Die Analyse der mittels TOPO™ cloning kits klonierten Genfragmente ergab für beide auf Aminosäureebene die größte Übereinstimmung zu den α -GOGAT Enzymen. Die Übereinstimmung zu diesen betrug 95,9% für *EsilA1*, bzw. 96,2% für *EsilA2* (α -GOGAT A1 aus *H. carterae*). Die Aminosäuresequenz von *EsilA1* zeigte eine Ähnlichkeit von 52,3% zu den Ferredoxin-abhängigen Enzymen (*Synechocystis*) und von 53,1% zu N-GOGAT Enzymen, z.B. aus *O. sativa*. Für den Klon *EsilA2* verhielten sich die Werte ähnlich, sie betragen 52,6% (Fd-GOGAT aus *Synechocystis*) bzw. 53,6% (N-GOGAT z.B. aus *O. sativa*). Die Sequenzen der Genfragmente und die daraus resultierende Aminosäuresequenzen, die mit Hilfe des Programms DNASIS ermittelt wurden, sind im Anhang dargestellt.

3.4.3 GOGAT Gene in Cryptophyta

Das Hauptinteresse bei weiteren Algen mit komplexen Plastiden lag auf dem Nachweis von *gltA*-Genen auch in diesen Klassen. Aus der Cryptophyte *Guillardia theta* konnten zwei GOGAT Genfragmente isoliert werden. Die ermittelten DNA- sowie Aminosäuresequenzen sind im Anhang dargestellt. Ihre Analyse ergab, dass beide Gene (*GtheA1* und *GtheA2*) für eine α -GOGAT kodieren.

Dabei weist einer der beiden Klone (*GtheA1*) die größte Übereinstimmung auf Aminosäureebene zu der α -GOGAT aus *A. spirographidis* auf (73,4%), während die Ähnlichkeit zu Ferredoxin-abhängigen Isoenzymen bei 53,8% (*Synechocystis*), die zu N-GOGATs bei 51,4% (*Bacillus subtilis*) liegt.

Die zweite Sequenz (*GtheA2*) besitzt die größte Übereinstimmung zu der α -GOGAT aus *H. carterae* (A1; 98,2%), weniger hoch sind die zu den anderen Isoenzymen (53,0% zu der Fd-GOGAT aus *Synechocystis* und 52,7% zu der N-GOGAT aus *O. sativa*).

3.4.4 GOGAT Gene in Haptophyten

Aus der DNA der Haptophyte *Cricosphaera carterae* konnten zwei verschiedene ca. 1,2 kb große Genfragmente gewonnen und in DH5alpha-Zellen kloniert werden. Die Sequenzanalyse der beiden Klone zeigte, dass die Aminosäuresequenzen beider Klone im phylogenetischen Baum mit den α -GOGAT Enzymen clustern (vgl. Abbildung 17).

Die größte Ähnlichkeit weist das *CcarA1* Genprodukt zu der α -GOGAT aus *H. carterae* auf (96,2%; *HcartA1*), der Wert für die Fd-GOGAT aus *Synechocystis* liegt bei 52,8%, der für die N-GOGAT aus *O. sativa* bei 53,6%.

Die zweite α -GOGAT zeigt die größte Homologie zu dem entsprechenden Enzym aus *A. brasilense* (75,4%), weniger ähnlich ist sie den Ferredoxin-abhängigen Enzymen (52,8% zur Fd-GOGAT aus *Synechocystis*) bzw. den N-GOGATs (52,7% zu der N-GOGAT aus *N. crassa*).

Die Sequenzen der Gene und die daraus resultierenden Aminosäuresequenzen sind im Anhang abgebildet.

3.4.5 GOGAT Gene in chlorophytischen Algen

In der Chlorophyte *A. acetabulum* kommen wie erwartet sowohl Fd- als auch N-GOGAT Enzyme vor (vgl. 3.1). Die für sie kodierenden Gene sollten amplifiziert und charakterisiert werden.

Aus *A. acetabulum* Kern-DNA konnten zwei unterschiedliche ca. 1,2 kb große Genfragmente gewonnen und mittels des selbst hergestellten pksTA-Vektors in DH5alpha-Zellen kloniert werden. Die Sequenzanalyse der Klone zeigte, dass eine davon (*AaceFd*) auf Aminosäureebene die größte Übereinstimmung zu dem Ferredoxin-abhängigen Enzym aus *Chlamydomonas reinhardtii* (70,3%) besitzt. Die Übereinstimmung zu *glsN*-Genprodukten liegt für die Sequenzen bei 53,4% (*X. fastidiosa*), die zu α -GOGAT Genen bei 49,1% (*A. brasilense*). Das zweite Fragment (*AaceN*) stammt aus einem Gen, das für eine N-GOGAT kodiert, die ermittelte Aminosäuresequenz steht im phylogenetischen Baum in dem entsprechenden Cluster und weist die größte Ähnlichkeit zu der N-GOGAT aus *O. danica* auf (*OdanN2*; 97%). Die Übereinstimmung mit den anderen Isoenzymen liegt bei 52,1% (Fd-GOGAT aus *Synechocystis spec* PCC6803) und 52,2% (α -GOGAT aus *A. brasilense*). Die Sequenzen dieser Genfragmente und die daraus resultierende Aminosäuresequenzen, die mit Hilfe des Programms DNASIS ermittelt wurden, sind im Anhang dargestellt.

3.4.6 GOGAT Gene in Glaucocystophyta

Aus DNA der Glaucocystophyte *Cyanophora paradoxa* ließ sich kein PCR Produkt amplifizieren. Erst über den Umweg der RT-PCR konnte ein 1176 bp großes Fragment eines GOGAT Genes kloniert werden. Die Analyse der Sequenz ergab auf Aminosäureebene die größte Übereinstimmung zu der Ferredoxin-GOGAT aus *Synechocystis* (68,3%), im phylogenetischen Baum war die Sequenz ebenfalls der Gruppe der Fd-GOGATs zugeordnet. Die Ähnlichkeit zu N-GOGATs lag bei 51,2% (aus *Xylella*), die zu α -GOGAT Enzymen bei 50,4% (aus *A. brasilense*).

Die Sequenz des Genfragmentes (*CparFd*) und die daraus resultierende Aminosäuresequenz sind im Anhang abgebildet.

Die Glaucocystophyte *C. paradoxa* wurde zur weiteren Analyse an Elke Stahlheber weitergegeben. Im Rahmen ihrer Arbeit konnte ein weiteres Genfragment aus *C. paradoxa* cDNA isoliert werden (*CparFd2*), das *CparFd1* sehr ähnlich ist (Stahlheber, pers. Mitteilung). Beide ermittelten Sequenzen unterscheiden sich lediglich durch wenige Basenaustausche, wobei in jedem Fall ein Cytosin der *CparFd1*-GOGAT-Sequenz gegen ein Thymin der *CparFd2*-GOGAT-Sequenz ausgetauscht ist. Da beide Fragmente aus cDNA gewonnen wurden, könnte es sich um zwei unterschiedlich editierte Produkte ein und desselben Gens handeln.

PHYLOGENETISCHE ANALYSEN DER GOGAT GENE UND ENZYME

Phylogenetische Analysen dienen zum einen der Einordnung neuer GOGAT-Teilsequenzen in eine Gruppe von Isoenzymen. Zum anderen sollten sie Aufschluss über die Evolution bekannter GOGAT Enzyme geben. Darüber hinaus erlauben phylogenetische Bäume plastidärer Enzyme unter Umständen Rückschlüsse auf die Verwandtschaft der verschiedenen in den untersuchten Algen vorkommenden Plastiden. Die ermittelten partiellen GOGAT-Sequenzen aus den untersuchten Algen sowie 42 weitere entsprechende Teilsequenzen aus anderen Organismen, die aus der Datenbank GENBANK stammten, wurden einer phylogenetischen Analyse unterzogen. Mit Hilfe des Programms CLUSTAL W wurde ein Alignment erstellt. Anschließend wurden mit TREECON (Version 1.3b) mehrere Stammbäume mit unterschiedlichen Parametern errechnet und untereinander auf die Signifikanz einzelner Cluster hin verglichen.

3.5 Alignments der Aminosäuresequenzen

Es wurde zunächst ein Alignment aller GOGAT Aminosäuresequenzen im Bereich zwischen den Primern 9+ und 15- erstellt. Es ist im Anhang dargestellt. Mit einem Sternchen versehen sind darin die Bereiche mit in allen Sequenzen identischen Aminosäuren, konservative Austausche sind durch einen Punkt gekennzeichnet. Dabei kommt der hohe Grad der Konservierung eubakterieller und eukaryotischer GOGAT Enzyme gerade im 5'-Bereich des Fragmentes allerdings nicht voll zur Geltung. Das liegt daran, dass das Alignment eine Sequenz eines Archaeobakteriums (*Sulfolobus solfataricus*) enthält. Der für eine FMN-Bindedomäne kodierende Bereich ist rot dargestellt.

3.6 Phylogenetische Bäume und Ähnlichkeitstabellen

Es wurde zunächst ein phylogenetischer Baum mit Sequenzen aus allen untersuchten Algen zusammen mit den entsprechenden Sequenzabschnitten aller anderer bekannter GOGAT Aminosäuresequenzen errechnet.

Dieser ist in Abbildung 15 schematisch wiedergegeben. Die darin gezeigten großen Cluster sind getrennt von einander in weiteren Bäumen analysiert (Abbildung 16, 17, und 18). Alle gezeigten Bäume wurden nach dem Neighbor-joining Verfahren aus Aminosäuresequenzen von ca. 390 AS Länge erstellt. Die Länge der horizontalen Verzweigungen gibt den phylogenetischen Abstand zwischen zwei Sequenzen wieder. Die Abstandsleiste kennzeichnet einen Sequenzunterschied von 10%. Die angegebenen Bootstrap-Werte erlauben Aussagen über die Wahrscheinlichkeit einer Verzweigung an der jeweiligen Stelle. Es wurden nur Bootstrap-Werte über 60% aufgelistet. Ab einem Wert von 80% gilt eine Verzweigung als wahrscheinlich. Alle Bootstrap-Werte wurden durch 1000 Replikationen ermittelt.

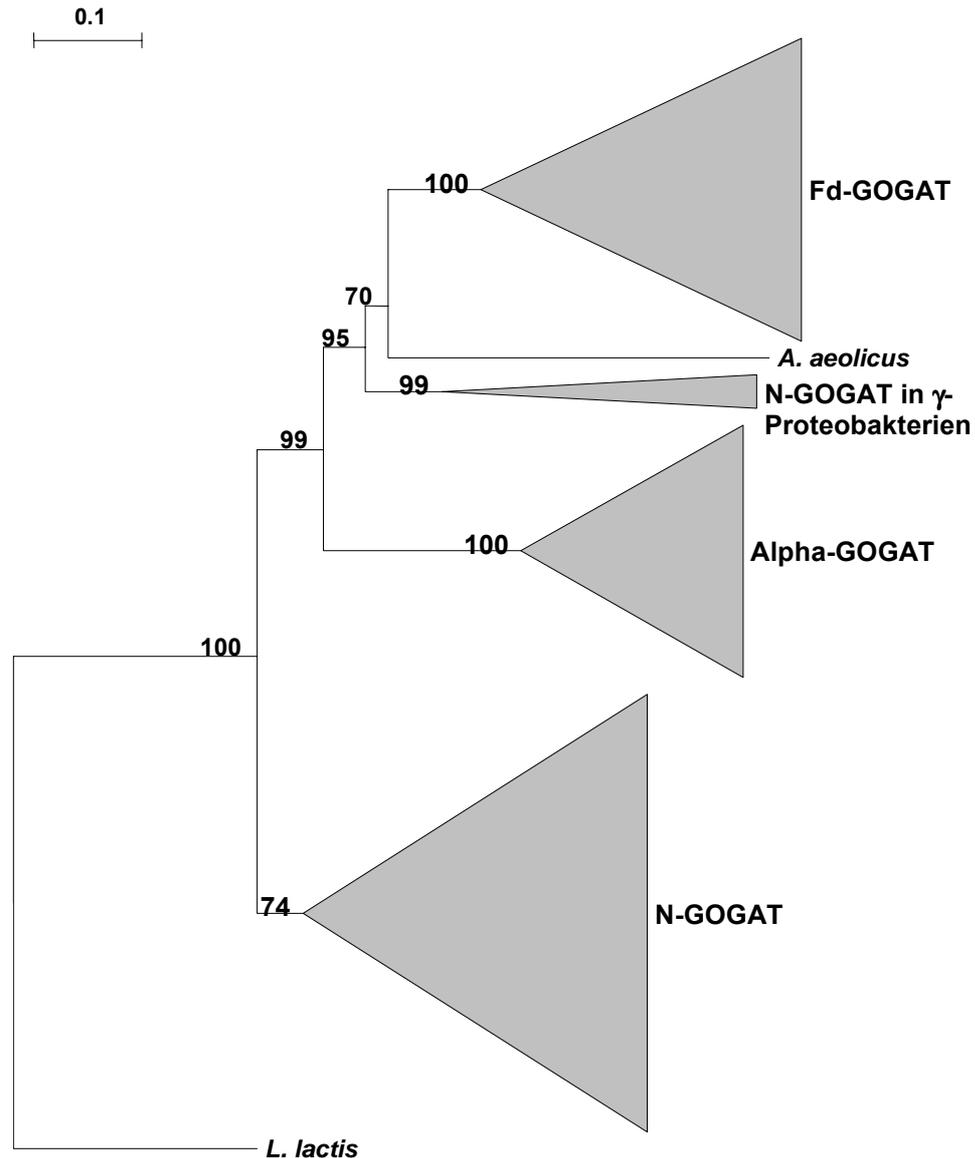


Abbildung 15: Phylogenetischer Baum verschiedener GOGAT Isoformen erstellt aus Aminosäuresequenzen von ca. 390 AS Länge. Zur Erstellung diente das Programm TREECON (Version 1.3b), das mit dem Neighbor-joining Verfahren arbeitet. Als Root diente die Sequenz aus *L. lactis*. Gaps wurden nicht berücksichtigt. Die Ziffern an den Verzweigungen stellen die Bootstrap-Werte dar (1000 Wiederholungen). Nur Bootstrap-Werte von mindestens 60% sind aufgelistet.

A. aeolicus = *Aquifex aeolicus* ; *L. lactis* = *Lactococcus lactis*.

Dieser Gesamt-GOGAT Baum wurde zunächst mit der Sequenz aus einem Archaeobakterium (*S. solfataricus*) gerootet (ohne Abbildung). Nach diesem Archaeobakterium stand die Sequenz aus *Lactococcus lactis* an der Basis aller anderen Sequenzen. Aus diesem Grund wurde der abgebildete Baum mit der Sequenz aus diesem gram+ Eubakterium gerootet.

Der Gesamtbaum aller GOGAT-Sequenzen enthält vier durch signifikante Bootstrapwerte voneinander getrennte Cluster. Im ersten Cluster erscheinen Ferredoxin-abhängige GOGAT

Enzyme, im zweiten NADPH-abhängige Enzyme aus Proteobakterien, im dritten α -GOGAT Enzyme aus Algen und Proteobakterien der α -Subdivision und im letzten N-GOGAT Enzyme aus verschiedenen Pro- und Eukaryoten.

Zwischen den Fd-GOGATs und den N-GOGAT Enzymen aus Proteobakterien (Cluster 2) steht die Sequenz aus *Aquifex aeolicus*, einem hyperthermophilen Bakterium. Bei diesem Enzym soll es sich um eine Fd-GOGAT handeln (Deckert et al., 1998).

Mit den Sequenzen aus den drei großen Clustern (Fd-, α - und N-GOGAT) im Gesamtbaum wurden jeweils getrennt voneinander Dendrogramme und Ähnlichkeitstabellen (Clustal W) sowie phylogenetische Bäume erstellt.

Die Ähnlichkeitstabellen für die Fd-, α - und N-GOGAT sind in den Tabellen 3, 4 und 5 dargestellt. Die Zahlen geben jeweils den Grad der Übereinstimmung (in Prozent) zwischen zwei Sequenzen wieder.

Ähnlichkeitstabelle Ferredoxin-GOGAT

	N.t	G.m	P.s	Z.m	S.o	A.t.1	A.t.2	A.a	C.r	C.p	C.c	A.s	P.a	P.p	O.d	Sy	No	An
G.m	90,0																	
P.s	86,7	87,0																
Z.m	87,0	86,2	84,4															
S.o	87,8	86,7	84,2	84,4														
A.t.1	86,7	86,4	85,2	84,7	88,5													
A.t.2	85,9	85,6	85,4	84,9	86,2	84,9												
A.a	67,8	67,4	66,8	67,0	67,0	67,4	68,2											
C.r	67,4	59,0	68,4	68,1	67,4	69,0	68,1	70,2										
C.p	66,0	65,6	66,2	67,3	66,5	67,2	66,9	63,8	62,6									
C.c	58,1	59,0	57,6	68,1	67,6	59,3	59,5	55,7	57,2	57,8								
A.s	60,1	61,8	61,6	59,8	61,6	61,5	61,2	58,7	60,5	61,6	62,2							
P.a	61,6	63,0	62,6	61,9	61,9	64,1	62,3	58,1	61,0	62,4	63,0	68,3						
P.p	62,9	64,8	65,0	65,0	64,2	65,4	64,4	59,4	61,5	63,0	62,8	68,1	71,3					
O.d	58,4	57,5	58,9	57,7	58,2	59,3	59,1	53,7	56,5	56,4	55,0	57,7	57,7	57,4				
Sy	65,7	64,6	65,5	65,2	65,2	66,1	65,6	63,7	61,4	68,1	62,3	66,6	69,7	69,2	63,3			
No	64,9	63,3	63,7	63,2	64,9	64,3	64,6	59,8	59,8	65,0	63,3	66,6	66,8	66,3	62,2	86,5		
An	64,9	63,3	63,6	64,1	64,9	64,4	64,5	59,7	59,9	64,9	60,6	66,8	67,0	66,1	62,4	76,5	100	
Aq	52,9	53,0	52,9	53,4	52,6	54,3	54,1	49,9	52,4	53,1	52,3	54,0	56,5	55,0	51,2	58,7	57,1	57,0

Tabelle 3: Ähnlichkeitstabelle für Ferredoxin-abhängige GOGAT Enzyme. Die Zahlen geben die Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen in Prozent an. Sie wurden einem Dendrogramm entnommen, das mit Hilfe von Clustal V erstellt wurde. N.t = *Nicotiana tabacum*; G.m = *Glycine max*; P.s = *Pinus silvestris*; Z.m = *Zea mays*; S.o = *Spinacia oleracea*; A.t.1 = *Arabidopsis thaliana* 1; A.t.2 = *Arabidopsis thaliana* 2; A.a = *Acetabularia acetabulum*; C.r = *Chlamydomonas reinhardtii*; C.p = *Cyanophora paradoxa*; C.c = *Cyanidium caldarium*; A.s = *Antithamnionella spirographidis*; P.a = *Porphyridium aerugineum*; P.p = *Porphyra purpurea*; O.d = *Ochromonas danica*; Sy = *Synnechocystis sp.*; No = *Nostoc sp.*; An = *Anabaena sp.*; Aq = *Aquifex aeolicus*.

Bei den Ferredoxin-abhängigen GOGAT Enzymen sind die größten Übereinstimmungen auf Aminosäureebene unter den höheren Pflanzen zu verzeichnen, sie liegen deutlich über 80%.

Das entspricht der phylogenetischen Nähe ihrer Plastiden zueinander. Die anderen Sequenzen zeigen eine Übereinstimmung von 60-70%. Die Aminosäuresequenzen der Enzyme aus *A. acetabulum* und *C. reinhardtii* stimmen zu 70% überein. Die GOGAT aus *O. danica* und das Enzym aus *A. aeolicus* stehen mit 50-60% Ähnlichkeit zu den anderen Fd-GOGATs etwas abseits.

Deutlich höher als bei den Ferredoxin-abhängigen Enzymen ist die Ähnlichkeit zumindest einzelner α -GOGATs zueinander (Tabelle 4). Die Werte der weniger ähnlichen Enzyme liegen bereits bei 67-80% Übereinstimmung. Für einige, offensichtlich äußerst konservierte GOGAT Enzyme, ließen sich auf Aminosäureebene Übereinstimmungen von deutlich über 90% ermitteln. So stimmen die Sequenzen von *G. theta* A2 und *H. carterae* A2 zu 98,2% überein.

Ähnlichkeitstabelle Alpha-GOGAT

	G.t.2	H.c.2	A.s.2	G.t.1	Rho	C.c	A.s.1	A.br	Zym	H.c.1	E.s.1	C.a.2	E.s.2	A.s.3
H.c.2	98,2													
A.s.2	89,5	88,5												
G.t.1	91,0	90,5	91,3											
Rh	88,7	88,2	88,5	89,0										
C.c	73,7	73,5	71,7	74,2	72,5									
A.s.1	72,8	73,7	70,8	63,4	71,6	98,7								
A.br	73,5	72,8	73,6	74,6	74,1	71,2	70,3							
Zym	68,1	67,1	67,7	67,9	67,7	69,4	68,5	75,4						
H.c.1	67,4	66,6	66,6	67,9	67,9	69,2	68,2	76,4	77,7					
E.s.1	68,9	68,1	68,5	69,7	70,0	69,1	69,0	77,9	80,1	96,2				
C.a.2	68,9	68,1	68,5	69,7	70,0	69,7	68,7	77,9	79,8	96,2	99,5			
E.s.2	68,4	67,6	67,9	69,2	70,0	69,4	68,5	77,7	79,5	95,9	99,2	99,2		
A.s.3	68,3	67,6	67,9	69,2	74,1	69,3	68,5	77,6	79,5	95,9	99,2	99,2	99,5	
C.a.1	69,2	68,1	68,5	70,2	70,0	70,2	69,3	75,4	70,8	70,5	72,3	72,1	71,8	71,7

Tabelle 4: Tabelle der Sequenzähnlichkeiten von α -GOGAT Enzymen aus verschiedenen Algen und Alpha-Purpurbakterien. G.t.2 = *Guillardia theta* 2; H.c.2 = *Heterosigma carterae* 2; A.s.2 = *Antithamionella spirographidis* 2; G.t.1 = *G. theta* 1; Rho = *Rhodobacter sphaeroides*; C.c = *Cyanidium caldarium*; A.s.1 = *A. spirographidis* 1; A.br = *Azospirillum brasilense*; Zym = *Zymomonas mobilis*; H.c.1 = *H. carterae* 1; E.s.1 = *Ectocarpus siliculosus* 1; C.a.2 = *Cricosphaera carterae* 2; E.s.2 = *E. siliculosus* 2; C.a.1 = *C. carterae* 1

Für die N-GOGAT Enzyme liegen die Werte für die Übereinstimmungen niedriger. Die Sequenzen besitzen in dieser Gruppe Ähnlichkeiten in ihrer Aminosäuresequenz in der Größenordnung von 50-70% (vgl. Tabelle 5). Lediglich einige wenige Sequenzen scheinen zueinander eine größere Ähnlichkeit zu besitzen. So z.B. die beiden N-GOGAT Enzyme aus den Rotalgen *A. spirographidis* und *C. caldarium*, die in ihrer Aminosäuresequenz zu 92,9% übereinstimmen.

Ähnlichkeitstabelle N-GOGAT

	A.a	O.d2	B.s	B.h	P.b	Sy	C.b	C.l	P.a	V.c	Co	My	St	C.e	O.d1	N.c	S.p	S.c	O.s	A.t	M.s	De	C.c2	H.c	R.e	E.s	A.s2	C.c1		
O.d2	90,0																													
B.s	82,3	82,5																												
B.h	67,8	68,3	69,7																											
P.b	67,7	68,2	70,1	67,3																										
Sy	70,5	61,3	69,3	69,8	83,4																									
C.b	57,3	57,3	59,0	55,5	59,8	58,4																								
C.l	59,6	60,2	61,5	61,1	62,6	61,1	60,4																							
P.a	61,1	61,9	63,3	58,9	64,5	63,1	55,4	57,1																						
V.c	55,9	57,0	56,0	56,5	63,6	62,7	53,5	55,2	65,3																					
Co	59,7	60,2	59,3	60,6	61,5	61,4	53,6	55,2	55,5	57,1																				
My	61,3	61,8	62,2	59,0	65,1	64,2	56,1	56,4	59,1	60,1	69,4																			
St	61,3	62,1	60,6	61,6	65,6	65,7	54,4	54,8	57,7	59,5	68,7	74,7																		
C.e	57,8	57,8	55,3	54,5	54,6	55,3	51,9	50,1	53,7	52,1	50,8	54,0	52,1																	
O.d1	58,3	58,5	57,9	58,9	59,5	57,9	55,8	54,8	56,0	58,0	56,3	59,8	59,5	57,9																
N.c	56,0	56,2	57,4	58,4	59,8	61,2	54,8	57,3	59,9	60,9	56,6	58,9	58,2	58,3	63,0															
S.p	57,8	58,2	58,2	59,2	61,1	60,9	55,2	56,4	60,1	60,4	55,1	57,1	57,4	59,6	63,6	80,8														
S.c	52,7	53,2	53,4	54,6	54,3	56,1	50,9	53,5	52,2	55,6	56,5	51,8	55,4	51,8	56,0	72,4	70,6													
O.s	58,2	58,8	58,4	58,8	64,1	63,8	55,3	56,5	60,2	60,5	57,6	61,4	60,6	57,0	63,9	69,2	67,5	61,2												
A.t	60,3	60,6	59,6	60,1	65,9	64,0	55,0	56,8	60,9	60,0	55,6	61,9	61,1	57,3	64,6	66,7	65,7	59,7	87,6											
M.s	58,9	59,5	59,5	61,3	66,3	65,6	55,2	57,3	62,4	60,0	55,7	61,8	61,6	58,1	63,3	68,6	68,0	59,6	87,1	89,8										
De	57,7	58,2	60,4	59,6	62,6	59,4	54,7	55,6	58,0	56,1	59,8	63,2	62,9	55,6	62,5	61,1	59,4	55,8	60,1	61,1	61,5									
C.c2	59,1	59,6	59,5	58,9	60,9	60,0	54,8	54,1	57,0	56,2	57,9	63,1	62,5	53,1	60,3	60,7	60,0	56,0	63,1	63,0	62,4	65,0								
H.c	58,5	59,1	58,3	59,3	60,5	60,9	54,7	54,8	56,9	56,9	58,1	63,2	61,8	52,5	60,7	61,9	60,0	55,7	61,3	62,4	62,1	64,6	90,5							
R.e	54,5	54,7	54,0	54,4	54,5	53,6	52,6	50,9	56,2	51,8	54,0	57,5	55,7	57,0	57,7	56,1	50,5	55,6	54,8	55,2	61,7	62,6	63,0							
E.s	55,7	56,0	55,8	56,5	57,4	54,7	53,9	51,9	55,4	53,3	55,2	58,6	59,3	55,0	59,4	56,5	57,3	50,4	58,5	58,2	58,1	66,9	65,5	66,4	65,8					
A.s2	57,2	57,6	58,6	59,8	64,2	61,6	53,6	53,4	59,5	58,9	55,9	60,5	62,3	55,0	59,5	62,2	60,1	54,3	60,3	60,8	60,6	66,2	67,5	67,8	66,3	73,1				
C.c1	56,0	56,5	57,7	58,7	63,0	60,3	53,5	53,1	59,4	58,1	56,2	59,3	62,1	54,6	58,4	60,7	58,4	53,6	59,9	59,9	60,1	65,0	67,3	66,8	65,1	72,4	92,9			
A.s1	57,3	57,6	57,9	60,2	60,4	57,9	52,7	53,4	58,6	58,6	55,9	60,0	59,6	53,1	59,5	61,8	59,0	53,4	59,1	59,9	59,8	63,7	67,1	68,3	64,4	68,5	76,2	74,7		

Tabelle 5: Ähnlichkeitstabelle für die Aminosäuresequenzen von N-GOGAT Enzymen aus Bakterien, Algen, höheren Pflanzen, Pilzen und Tieren.

A.a = *Acetabularia acetabulum*; O.d2 = *Ochromonas danica* 2; B.s = *Bacillus subtilis*; B.h = *Bacillus halodurans*; P.b = *Plectonema boryanum*; Sy = *Synechocystis* sp.; C.b = *Campylobacter jejuni*; C.l = *Clostridium acetobutylicum*; P.a = *Porphyridium aeruginum*; V.c = *Vibrio cholerae*; Co = *Corynebacterium glutamicum*; My = *Mycobacterium tuberculosis*; St = *Streptomyces coelicor*; C.e = *Caenorhabdis elegans*; O.d1 = *O. danica* 1; N.c = *Neurospora crassa*; S.p = *Schizosacheromyces pombe*; S.c = *Saccheromyces cerevisiae*; O.s = *Oryza sativa*; A.t = *Arabidopsis thaliana*; M.s = *Medicago sativa*; De = *Deinococcus radiodurans*; C.c2 = *Cyanidium caldarium* 2; H.c = *Heterosigma carterae*; R.e = *Rhizobium etli*; E.s = *Ectocarpus siliculosus*; A.s2 = *Antithamnionella spirographidis* 2; C.c1 = *C. caldarium* 1; A.s1 = *A. spirographidis* 1.

3.6.1 Phylogenetischer Baum der Fd-GOGAT

Das Cluster der Ferredoxin-abhängigen GOGAT Enzyme ist in Abbildung 16 als eigener Baum, gerootet mit der GOGAT aus *A. aeolicus* dargestellt. Diese Gruppe enthält neben plastidären Fd-GOGATs aus höheren Pflanzen und Algen die Aminosäuresequenzen von GOGAT Enzymen aus den Cyanobakterien *Synechocystis spec PCC6803*, *Anabaena spec PCC7120* und *Nostoc spec.* Die eukaryotischen Enzyme sind unterteilt in die Sequenzen aus grünen Pflanzen und denen aus Algen der roten Linie. Sequenzen, die im Rahmen der vorliegenden Arbeit entstanden sind, sind unterstrichen.

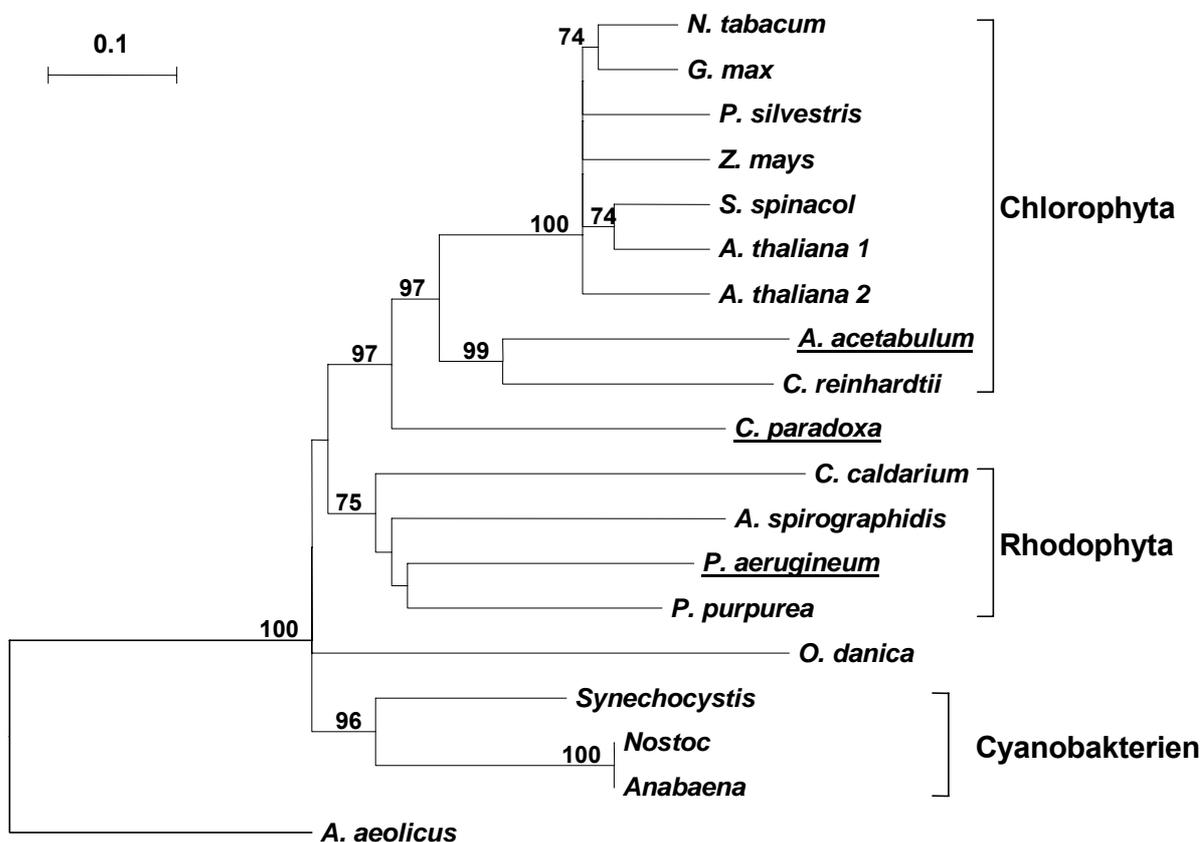


Abbildung 16: Phylogenetischer Baum der Ferredoxin-abhängigen GOGAT Enzyme. Die ermittelten Aminosäuresequenzen von Fd-GOGAT Genen wurden separat einer phylogenetischen Analyse mit den Programmen Clustal V und TREECON unterzogen. Als Root wurde die Sequenz aus *A. aeolicus* gewählt. Die angegebenen Bootstrapwerte wurden durch 1000 Replikationen ermittelt. Sequenzen, die im Verlaufe der vorliegenden Arbeit entstanden sind, sind unterstrichen. *N. tabacum* = *Nicotiana tabacum*; *G. max* = *Glycine max*; *P. silvestris* = *Pinus silvestris*; *Z. mays* = *Zea mays*; *S. oleracea* = *Spinacia oleracea*; *A. thaliana* = *Arabidopsis thaliana*; *A. acetabulum* = *Acetabularia acetabulum*; *C. reinhardtii* = *Chlamydomonas reinhardtii*; *C. paradoxa* = *Cyanophora paradoxa*; *C. caldarium* = *Cyanidium caldarium*; *A. spirographidis* = *Antithamnionella spirographidis*; *P. aerugineum* = *Porphyridium aerugineum*; *P. purpurea* = *Porphyra purpurea*; *O. danica* = *Ochromonas danica*; *Synechocystis* = *Synechocystis spec PCC6803*; *Nostoc* = *Nostoc spec*; *Anabaena* = *Anabaena spec PCC7120*; *A. aeolicus* = *Aquifex aeolicus*

An der Basis des Clusters mit grünen Pflanzen stehen, durch signifikante Bootstrapwerte abgetrennt, zum einen die Sequenzen aus den chlorophytischen Algen *C. reinhardtii* und *A. acetabulum* und zum anderen interessanterweise die Aminosäuresequenz der Fd-GOGAT aus *C. paradoxa*. Eine ähnliche Anordnung findet man auch für die große Untereinheit der Rubisco (Valentin, pers. Mitteilung).

In dem anderen großen Cluster stehen Ferredoxin-abhängige GOGAT Enzyme aus den Rotalgen *C. caldarium*, *A. spirographidis*, *P. aerugineum* und *P. purpurea*.

Etwas abseits von allen anderen eukaryotischen Sequenzen steht die Fd-GOGAT aus *O. danica*.

Ein eigenes gut abgetrenntes Cluster bilden die Sequenzen der Fd-GOGAT Enzyme aus Cyanobakterien. Die Stellung dieser Gruppe variiert jedoch in Abhängigkeit von der jeweils gewählten Root. Mit der N-GOGAT aus *E. coli* gerootet verschiebt sie sich mehr in Richtung der grünen Pflanzen, mit der N-GOGAT aus *M. sativa* oder *S. sulfataricus* scheinen die cyanobakteriellen Sequenzen eher bei den rhodophytischen zu stehen (Daten nicht gezeigt).

3.6.2 Phylogenetischer Baum der α -GOGAT

Das Cluster der α -GOGAT Enzyme (Abbildung 17) enthält Aminosäuresequenzen aus Algen und aus den α -Proteobakterien *R. sphaeroides*, *A. brasilense* und *Zymomonas mobilis*.

Auffällig an diesem Baum ist, dass aus fast jeder der hier vertretenden Alge zumindest 2 α -GOGAT Sequenzen in diesem Cluster zu finden sind. So enthält er aus den Heterokontophyten *H. carterae* und *E. siliculosus*, der Cryptophyte *G. theta* und der Haptophyte *C. carterae* jeweils zwei Genfragmente eines solchen *gltA*-Gens, aus der Rhodophyte *A. spirographidis* sogar 3 verschiedene.

Es fällt auf, dass die unterschiedlichen Sequenzen aus einer Art im phylogenetischen Baum nicht beieinander stehen, sondern jeweils eine größere Ähnlichkeit zu Enzymen aus anderen Arten besitzen. Es gibt auch keine klare Trennung zwischen den Sequenzen aus Rhodophyten und denen aus anderen Algengruppen. Vielmehr stehen die rhodophytischen Sequenzen oft mit denen der übrigen Algen zusammen. So steht die Sequenz *AspiA3* in einem Cluster mit *HcarA1*, *EsilA1* und *A2* sowie *CcarA2*.

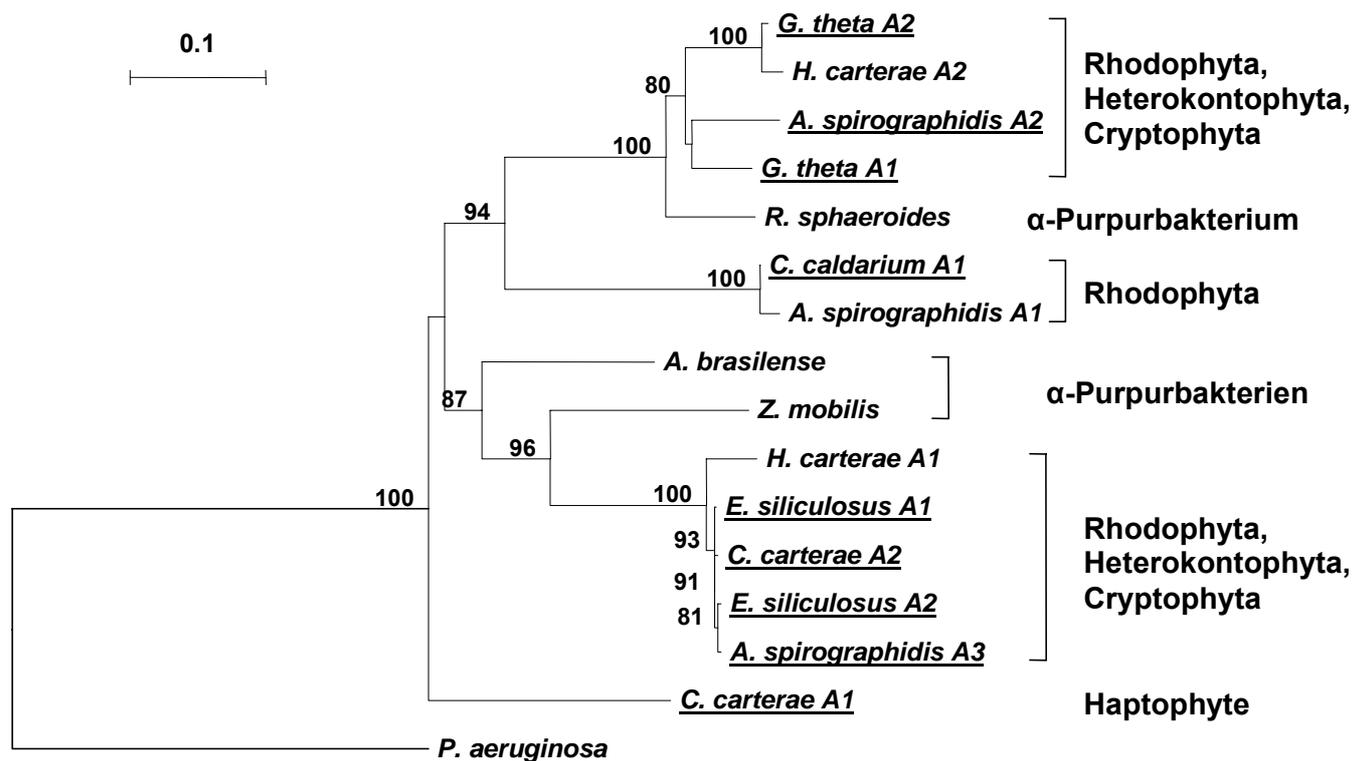


Abbildung 17: Phylogenetischer Baum der α -GOGATs aus Algen und Alpha-Purpurbakterien. Gerootet wurde dieser Baum mit der N-GOGAT aus einem Eubakterium. Die Zahlen geben die Bootstrapwerte in Prozent an und wurden durch 1000 Replikationen ermittelt. Die unterstrichenen Sequenzen sind in der vorliegenden Arbeit entstanden. *G. theta* = *Guillardia theta*; *H. carterae* = *Heterosigma carterae*; *A. spirographidis* = *Antithamnionella spirographidis*; *R. sphaeroides* = *Rhodobacter sphaeroides*; *C. caldarium* = *Cyanidium caldarium*; *A. brasilense* = *Azospirillum brasilense*; *Z. mobilis* = *Zymomonas mobilis*; *E. siliculosus* = *Ectocarpus siliculosus*; *C. carterae* = *Cricosphaera carterae*; *P. aeruginosa* = *Pseudomonas aeruginosa*.

Zusätzlich stechen die ausnahmslos hohen Bootstrap-Werte innerhalb des α -GOGAT Clusters ins Auge. Sie liegen überwiegend bei mindestens 80%. Es scheint sich bei dieser Isoform der GOGAT um ein äußerst konserviertes Enzym zu handeln.

Die Sequenzen aus den α -Purpurbakterien stehen nicht an der Basis aller eukaryotischen α -GOGATs, wohl aber an der Basis einzelner Untercluster.

Gerootet wurde dieser Baum mit der N-GOGAT aus dem γ -Proteobakterium *P. aeruginosa*, mit anderen Sequenzen als Wurzel ergeben sich vergleichbare phylogenetische Bäume (Daten nicht gezeigt).

3.6.3 Phylogenetischer Baum der N-GOGAT

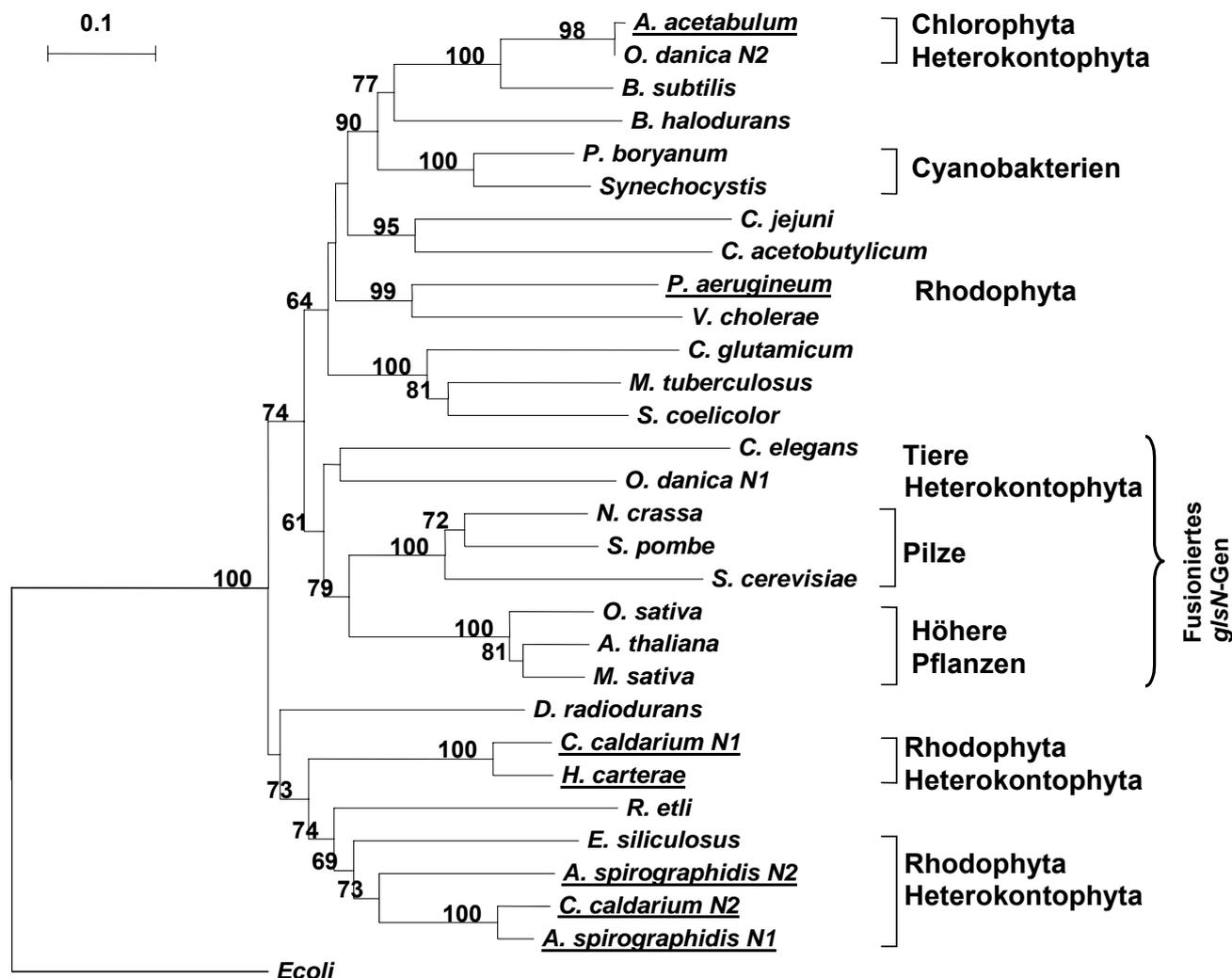


Abbildung 18: Phylogenetischer Baum der N-GOGAT Enzyme aus Pro- und Eukaryoten. Der mittels Clustal V und TREECON erstellte Baum wurde mit der N-GOGAT aus *E. coli* gerootet, die eindeutig nicht innerhalb dieses Clusters liegt. Die Bootstrapwerte wurden durch 1000 Replikationen ermittelt. Die unterstrichenen Sequenzen wurden im Laufe der vorliegenden Arbeit gewonnen. *A. acetabulum* = *Acetabularia acetabulum*; *O. danica* = *Ochromonas danica*; *B. subtilis* = *Bacillus subtilis*; *B. halodurans* = *Bacillus halodurans*; *P. boryanum* = *Plectonema boryanum*; *Synechocystis* = *Synechocystis spec PCC 6803*; *C. jejuni* = *Campylobacter jejuni*; *C. acetobutylicum* = *Clostridium acetobutylicum*; *P. aeruginoseum* = *Porphyridium aeruginoseum*; *V. cholerae* = *Vibrio cholerae*; *C. glutamicum* = *Corynebacterium glutamicum*; *M. tuberculosis* = *Mycobacterium tuberculosis*; *S. coelicolor* = *Streptomyces coelicolor*; *C. elegans* = *Caenorhabditis elegans*; *N. crassa* = *Neurospora crassa*; *S. pombe* = *Schizosaccharomyces pombe*; *S. cerevisiae* = *Saccharomyces cerevisiae*; *O. sativa* = *Oryza sativa*; *A. thaliana* = *Arabidopsis thaliana*; *M. sativa* = *Medicago sativa*; *D. radiodurans* = *Deinococcus radiodurans*; *C. caldarium* = *Cyanidium caldarium*; *H. carterae* = *Heterosigma carterae*; *R. etli* = *Rhizobium etli*; *E. siliculosus* = *Ectocarpus siliculosus*; *A. spirographidis* = *Antithamnionella spirographidis*; *E. coli* = *Escherichia coli*.

Der dritte Baum enthält Aminosäuresequenzen von N-GOGAT Enzymen aus verschiedenen Pro- und Eukaryoten. Dabei lassen sich drei Cluster voneinander trennen. Im ersten befinden sich überwiegend unterschiedliche prokaryotische GOGAT Enzyme, überraschenderweise zusammen mit den Sequenzen aus einigen Algen (*A. acetabulum*, *O. danica*, *P. aerugineum*). Im zweiten stehen die Sequenzen aus höheren Pflanzen, Pilzen und dem Wurm *Caenorhabditis elegans* jeweils voneinander getrennt angeordnet. Auch die Sequenz von *O. danica* (N1) clustert innerhalb dieser Gruppe von Enzymen.

Im dritten Cluster sind vor allem N-GOGAT Enzyme aus den Rotalgen *C. caldarium* und *A. spirographidis* sowie den Heterokontophyten *H. carterae* und *E. siliculosus* angesiedelt. Innerhalb dieses Unterclusters befinden sich allerdings außerdem die Aminosäuresequenzen aus dem symbiotischen Bakterium *Rhizobium etli* und aus *Deinococcus radiodurans*.

Sequenzen von N-GOGAT Enzymen aus Algen finden sich in allen drei Clustern wieder. So stehen rhodophytische N-GOGAT Enzyme im ersten und dritten Untercluster, wobei im dritten Cluster möglicherweise zwei verschiedene Linien repräsentiert sind.

N-GOGAT Enzyme aus heterokonten Algen dagegen kommen im ersten (*O. danica* N2), im zweiten (*O. danica* N1), sowie im dritten Untercluster (*H. carterae* und *E. siliculosus*). Davon clustern die Sequenzen aus *H. carterae* und *E. siliculosus* mit rhodophytischen N-GOGAT Enzymen.

REGULATION VERSCHIEDENER GOGAT ISOFORMEN

3.7 Vergleichende Untersuchungen zur Regulation spezifischer GOGAT-Enzymaktivitäten in verschiedenen Algen durch den externen Faktor Licht

Über die Regulation verschiedener Isoenzyme der Glutamat-Synthase in Algen ist bisher wenig bekannt. Vergleichende Untersuchungen zur Lichtregulation von Fd- und N-GOGAT sind bisher lediglich in der Heterokontophyte *O. danica* (Lenz, pers. Mitteilung) durchgeführt worden. Für eine vergleichende Untersuchung nicht nur unterschiedlicher Isoenzyme in einer Art, sondern auch innerhalb der verschiedenen Algengruppen wurden aus der Gruppe der Rhodophyta *P. aeruginosum* und *A. spirographidis*, als weiterer Vertreter der Heterokontophyta *H. carterae* sowie die Grünalge *A. acetabulum* herangezogen.

Algenkulturen, die an einen regelmäßigen Wechsel (12 h/12 h) von Licht und Dunkelheit adaptiert waren, wurden sowohl in der Mitte der Licht- als auch in der Mitte der Dunkelphase geerntet und wie beschrieben (2.22 und 2.23) für die Messung der spezifischen GOGAT-Enzymaktivitäten eingesetzt. Für die Ermittlung der Werte wurden jeweils 2 Messungen aus 4 (N-GOGAT) bzw. 2 (Fd-GOGAT) parallel angezogenen Kulturen durchgeführt, aus allen Ergebnissen der Mittelwert und für diesen die Standardabweichung errechnet. Mittelwert (in nkat/mgProtein) und Standardabweichung sind jeweils in Abbildung 19 a und b in Form eines Säulendiagrammes dargestellt. Der Mittelwert erscheint außerdem als Zahlenwert unter den Säulen. Die Werte, die in der Mitte der Lichtphase gemessen wurden, sind dabei mit L6, die in der Mitte der Dunkelphase mit D6 bezeichnet. Die Diagramme sind unterteilt in die Coenzympezifität der gemessenen Enzyme (Ferredoxin in Abbildung 19 a sowie NADH bzw. NADPH in Abbildung 19 b). Die Ergebnisse der Messungen in den unterschiedlichen Algen, die eingesetzt wurden, sind jeweils in einer Graphik zusammengefasst.

Bei allen untersuchten Algen ist ein signifikanter Unterschied in der Aktivität zwischen „Tag“ und „Nacht“ nur bei der Methylviologen-abhängigen GOGAT-Aktivität (Fd-GOGAT) zu erkennen. Bei den Rotalgen war diese Aktivität am Tag drei- (*P. aeruginosum*) bzw. vierfach (*A. spirographidis*) gegenüber der in der Nacht gemessenen erhöht. Bei *H. carterae* wurde ein zehnfacher Anstieg der Glutamat-Synthase nachgewiesen und in *A. acetabulum*-Enzymextrakten war die Fd-GOGAT in der Lichtphase drei bis vier mal so aktiv wie in der Dunkelphase.

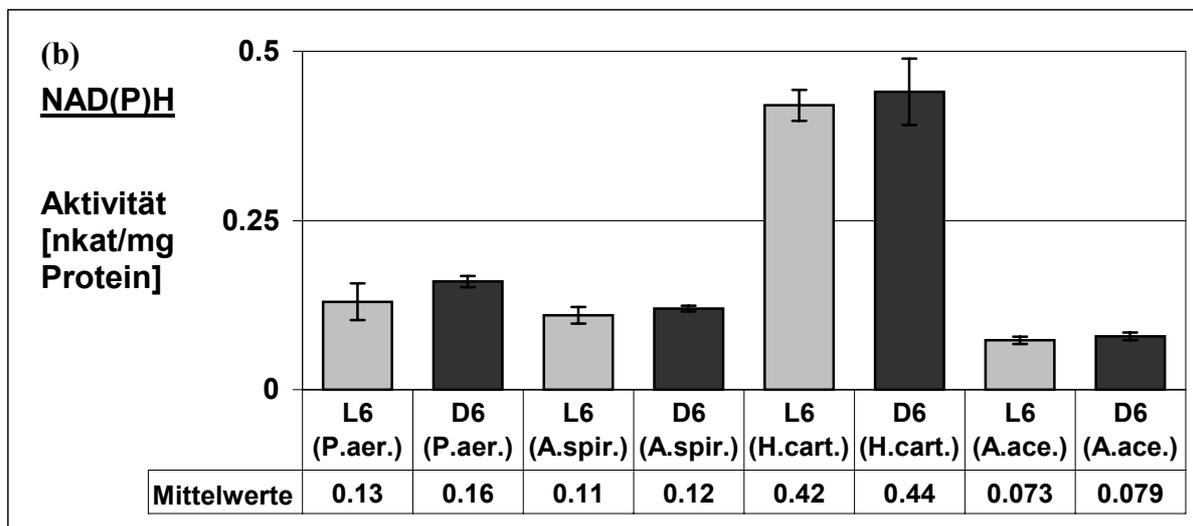
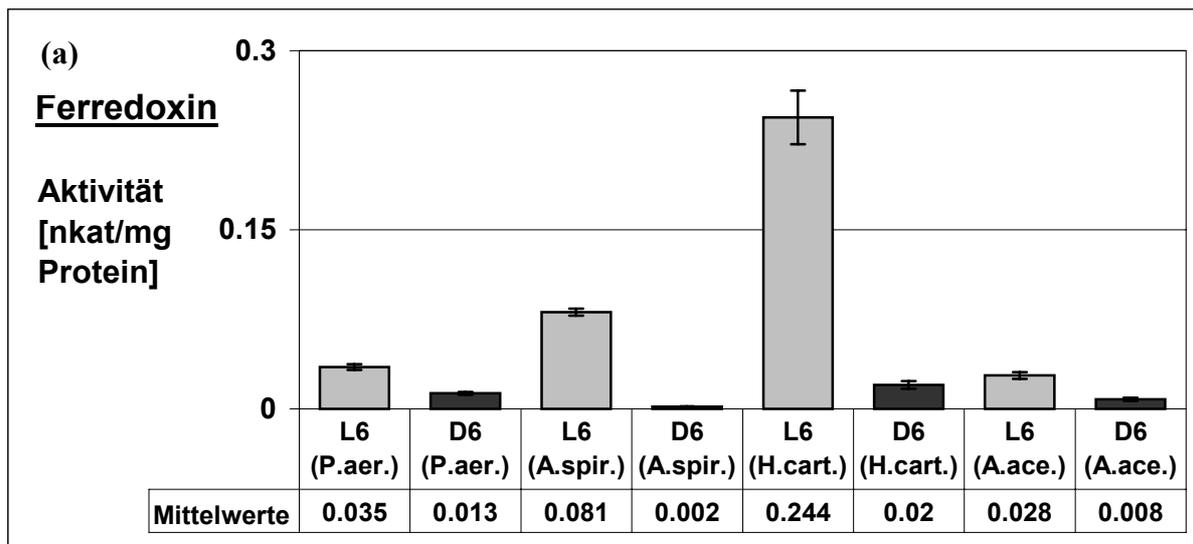


Abbildung 19 a und b: Messung von lichtabhängigen GOGAT-Aktivitäten in den Rhodophyten *P. aeruginosum* und *A. spirographidis*, der Heterokontophyten *H. carterae* und der chlorophytischen Alge *A. acetabulum*. Algenkulturen, die an einen 12 stündigen Wechsel von Licht und Dunkelheit adaptiert waren, wurden jeweils in der Mitte der Licht- (L6) sowie in der Mitte der Dunkelphase (D6) geerntet und die gewonnenen Extrakte löslichen Proteins für die Messung der spezifischen GOGAT-Enzymaktivitäten eingesetzt. Die mit Methylviologen als Elektronendonator gemessene Aktivität der Ferredoxin-GOGAT (Abbildung 19 a) zeigte bei allen Algen in der Lichtphase eine gegenüber der Dunkelphase deutlich erhöhte Synthese von Glutamat. Die spezifische Abnahme von NAD(P)H (Abbildung 19 b) war jedoch am „Tag“ und in der „Nacht“ vergleichbar.

Die NAD(P)H-abhängige GOGAT-Aktivität verhielt sich einer Regulation durch Licht gegenüber in allen Fällen konstitutiv. Zumindest unter Berücksichtigung der Standardabweichung war in keinem Fall ein signifikanter Unterschied zwischen den Messungen bei unterschiedlichen Lichtverhältnissen nachzuweisen.

3.8 Untersuchungen zur circadianen Regulation der Fd-GOGAT in *H. carterae*

Nachdem zumindest in den untersuchten Algenklassen offensichtlich eine Regulation von Ferredoxin-abhängigen GOGAT Enzymen durch Licht erfolgt, sollte exemplarisch am Fall der heterokonten Alge *H. carterae* untersucht werden, ob es sich dabei um eine direkte Abhängigkeit vom Licht handelt oder die Regulation circadian gesteuert wird.

H. carterae Kulturen, die an einen Wechsel von Licht und Dunkelheit adaptiert waren, wurden dem Einfluss von Dauerlicht ausgesetzt und zu vier verschiedenen Zeitpunkten an zwei aufeinanderfolgenden Tagen Fd-GOGAT-Aktivitätsmessungen durchgeführt (L6-Tag1; D6-Nacht1; L6-Tag2; D6-Nacht2). Dabei fand die erste Messung nach 24 h Dauerlicht statt. Als Kontrolle dienten Kulturen, die weiterhin einem regelmäßigen Wechsel von Licht- und Dunkelphase ausgesetzt waren.

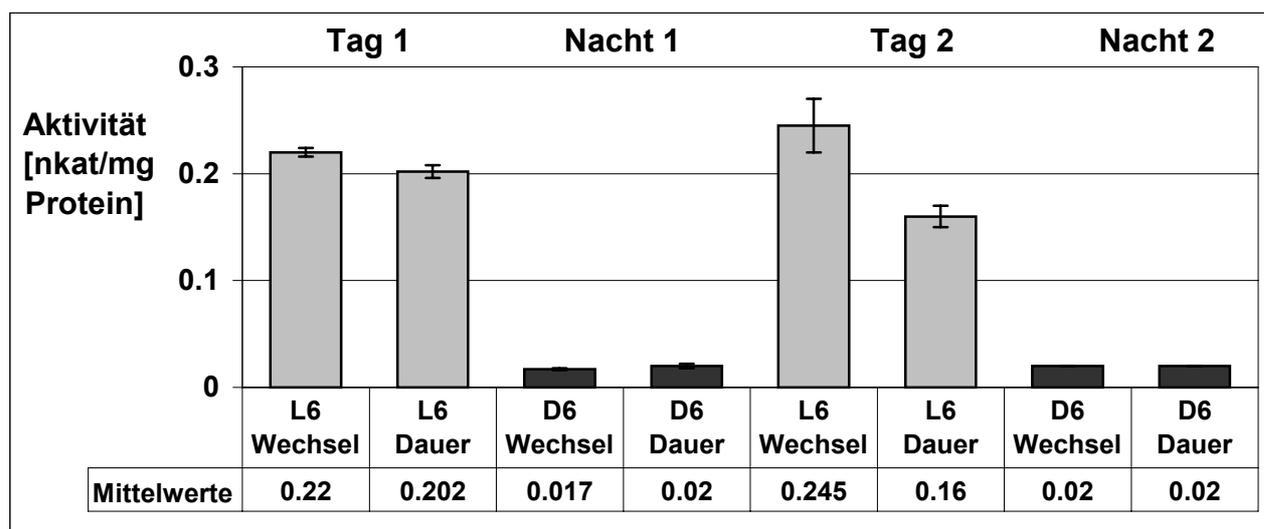


Abbildung 20: Circadiane Rhythmik der Fd-GOGAT-Aktivität in *H. carterae*.

An den regelmäßigen Wechsel von Licht- und Dunkelheit adaptierte Kulturen der heterokonten Alge *H. carterae* wurden dem Dauerlicht ausgesetzt und die methylviologen-abhängige GOGAT Enzymaktivität nach 24 h (T1), nach 36 h (N1), nach 48 h (T2) sowie nach 50 h (N2), jeweils in der Mitte der Licht- bzw. der Dunkelphase gemessen. Zur Kontrolle erfolgten die Messungen ebenfalls an Kulturen, die weiterhin an einen Wechsel von Licht- und Dunkelheit (12h/12h) angepasst waren.

L6: Zellen in der Mitte der Lichtphase

D6: Zellen in der Mitte der Dunkelphase

Wechsel: Kulturen, die dem regelmäßigen Wechsel von Licht und Dunkelheit ausgesetzt waren (Kontrolle)

Dauer: Kulturen, die 24 h vor Beginn der Messung an Dauerlicht adaptiert wurden.

Sowohl in den Kontroll- als auch in den Dauerlichtkulturen war ein Anstieg der Ferredoxin-abhängigen Glutamat-Synthese in den Kulturen zu verzeichnen, die in der Mitte der eigentlichen Lichtphase geerntet wurden (vgl. Abbildung 20).

3.9 Regulation von GOGAT Enzymaktivitäten durch das Angebot an Stickstoff

Zur Analyse von GOGAT Enzymaktivitäten unter dem Einfluss unterschiedlichen Stickstoffangebots wurden die Rhodophyte *P. aeruginum* sowie die heterokonte Alge *H. carterae* verwendet. Beide Algen bieten den Vorteil, dass sie in vollsynthetischem Medium angezogen werden, in dem der Gehalt an Stickstoff leicht variiert werden kann. Da die original Anzuchtmedien bereits einen Überschuss an Stickstoff enthalten, sollte demgegenüber der Einfluss von Stickstoffmangel auf die Aktivität von GOGAT Enzymen untersucht werden. Dazu sollten die verwendeten Medien so eingestellt werden, dass ein Wachstum der Algen zwar noch möglich war, dieses jedoch deutlich reduziert war gegenüber dem Wachstum in Normalmedium.

Zunächst wurde ein Profil des Wachstums von *P. aeruginum*- sowie *H. carterae*-Kulturen in Vollmedium aufgenommen. Als Maß für die Wachstumsgeschwindigkeit diente die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 1000 nm (OD_{1000}). In den in Abb. 21 a und b dargestellten Wachstumskurven wurde die OD_{1000} graphisch gegen die Zeit aufgetragen. Die Profile geben das Bild einer typischen Wachstumskurve annähernd wieder.

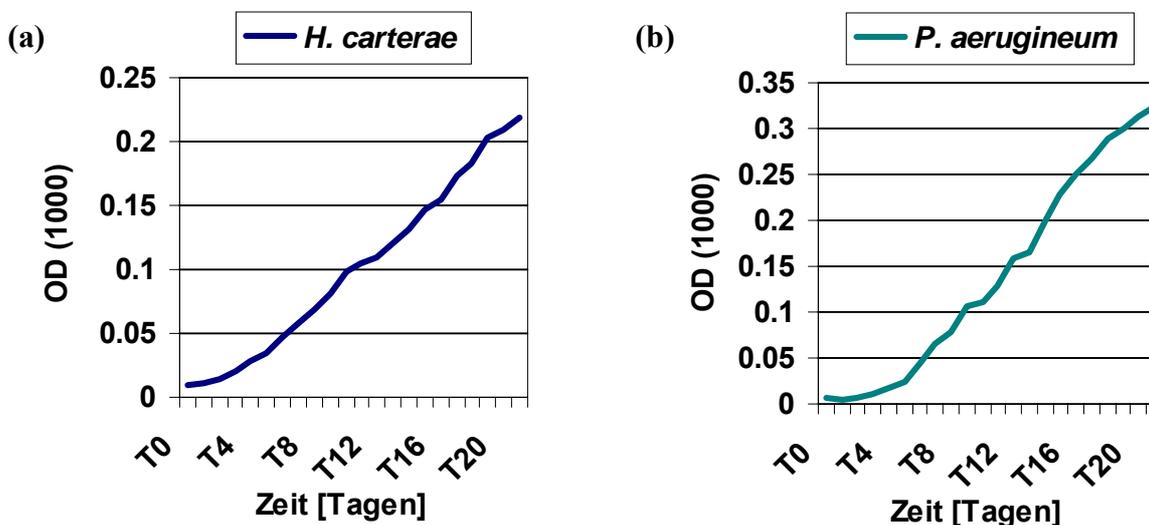


Abb. 21 a und b: Wachstumskurven für Kulturen von *H. carterae* (21 a) und *P. aeruginum* (21 b). Die Wachstumsgeschwindigkeit der Zellen wurde anhand der optischen Dichte (OD) bei 1000 nm bestimmt und gegen die Zeit graphisch dargestellt.

Parallel zu der Wachstumskurve wurde die Entwicklung der N-GOGAT Aktivität gemessen. Diese nahm in den ersten Tagen nach dem Animpfen der Kulturen, also in der Hauptwachstumsphase deutlich zu, erreichte ihren Höhepunkt mit bis zu 0,16 nkat/mg Protein

(*P. aeruginosa*) bzw. 0,74 nkat/mg Protein (*H. carterae*) zwischen den Tagen sieben und elf und fiel anschließend wieder ab, bis sie am Tag einundzwanzig nahezu fast wieder auf den Ausgangswert zurückgegangen war (ohne Abbildung). Eine entsprechende Entwicklung konnte bei verschiedenen Algen (*P. aeruginosa*, *H. carterae* und *A. acetabulum*) auch für die Fd-GOGAT gezeigt werden. Stets war die Aktivität dieser Isoform der GOGAT in der logarithmischen Wachstumsphase deutlich erhöht gegenüber der stationären Phase.

Anschließend wurden Kulturen in Medien mit reduziertem Stickstoffgehalt angezogen und deren Wachstum bestimmt. Dazu wurde zunächst für das *H. carterae* O3-Medium die unten aufgeführten Verdünnungsreihe angesetzt, wobei sich die angegebenen prozentualen Werte jeweils auf die Menge an Stickstoff im Originalmedium beziehen (100%):

ohne Stickstoff - mit 5% Stickstoff - mit 10% Stickstoff - mit 15% Stickstoff - mit 20% Stickstoff - mit 25% Stickstoff - mit 30% Stickstoff - mit 35% Stickstoff - mit 100% Stickstoff

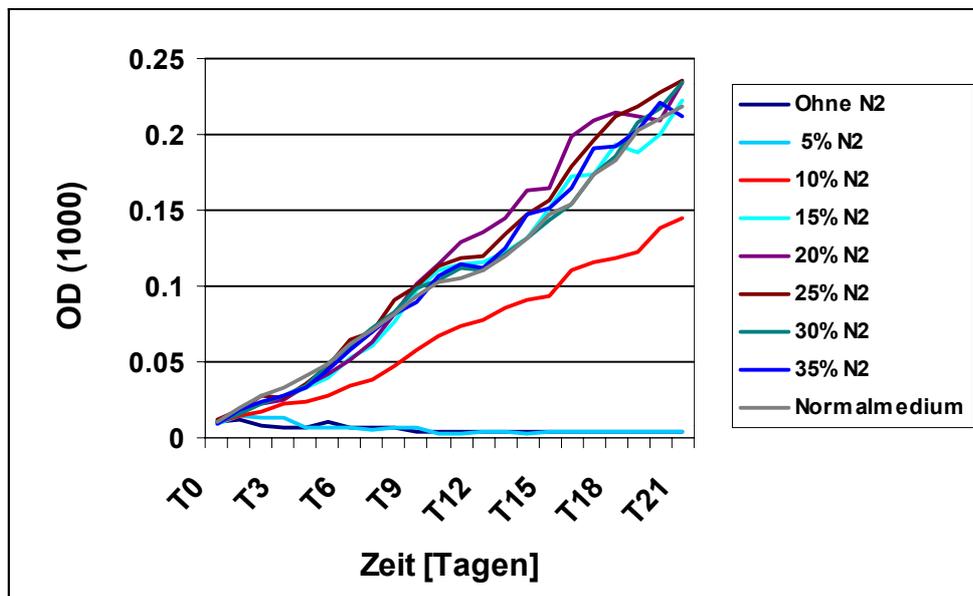


Abbildung 22: Wachstumskurve von *H. carterae* Kulturen in Medien mit variiertem Stickstoffgehalt. Als Maß für das Wachstum diente die optische Dichte bei 1000 nm. Diese wurde gegen die Zeit [Tagen] aufgetragen. Die verschiedenen Kurven stellen das Wachstum von *H. carterae* Kulturen in unterschiedlichen Medien dar. In der Legende ist der jeweilige Anteil an Stickstoff bezogen auf das Original-O3-Medium angegeben.

Dabei stellte sich heraus, dass die Algen in den Medien, die gar keinen oder nur 5% Stickstoff enthielten, nicht mehr in der Lage zu einem Wachstum waren. Bei 15% Stickstoff und mehr

war das Wachstum mit dem der Kontrollkultur in Normalmedium (100% Stickstoff) vergleichbar.

Lediglich die Kulturen mit 10% Stickstoff unterschieden sich in ihrem Wachstum deutlich von der Kontrollgruppe, waren aber dennoch zu einem Wachstum fähig. Die entsprechenden Wachstumskurven sind in Abbildung 22 dargestellt.

Für die vergleichenden Messungen von GOGAT-Enzymaktivitäten unter dem Einfluss von Stickstoffmangel gegenüber dem Normalmedium wurde die Alge *H. carterae* demzufolge in Medium mit lediglich 10% der angegebenen Menge an NO_3 angezogen. Im Vergleich zu Kulturen in Originalmedium zeigten die Zellen unter dem Einfluss von Stickstoffmangel neben einem geringeren Wachstum auch eine deutlich reduzierte Pigmentierung (Abbildung 23).

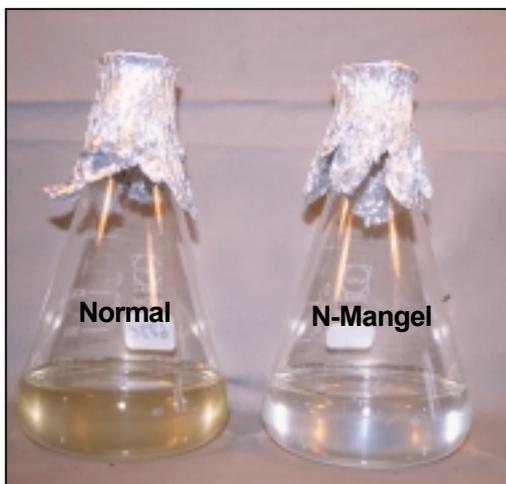


Abbildung 23: *H. carterae* Kulturen in Normal- und Stickstoffmangelmedium. Die Kultur in Medium mit lediglich 10% Stickstoff bezogen auf das Originalmedium zeigte neben einem reduziertem Wachstum eine deutlich schwächere Pigmentierung.

Da bei *H. carterae* bereits zu einem früheren Zeitpunkt ein Einfluss von Stickstoffmangel auf die Aktivität der Fd-GOGAT untersucht wurde (Röttgers, unveröffentlicht), sollte in der vorliegenden Arbeit die N-GOGAT diesbezüglich analysiert werden. Die Bestimmung der spezifischen GOGAT-Aktivität erfolgte parallel aus Kulturen in Standardmedium und Stickstoffmangelmedium. Die Messungen wurden jeweils am Tag des Animpfens (T0) und ab dem dritten Tag alle zwei Tage (T3; T5; T7; T9; T11; und T13) durchgeführt. Parallel zu den Messungen der Aktivität wurde zur Kontrolle wiederum das Wachstum der Algen bestimmt (ohne Abbildung).

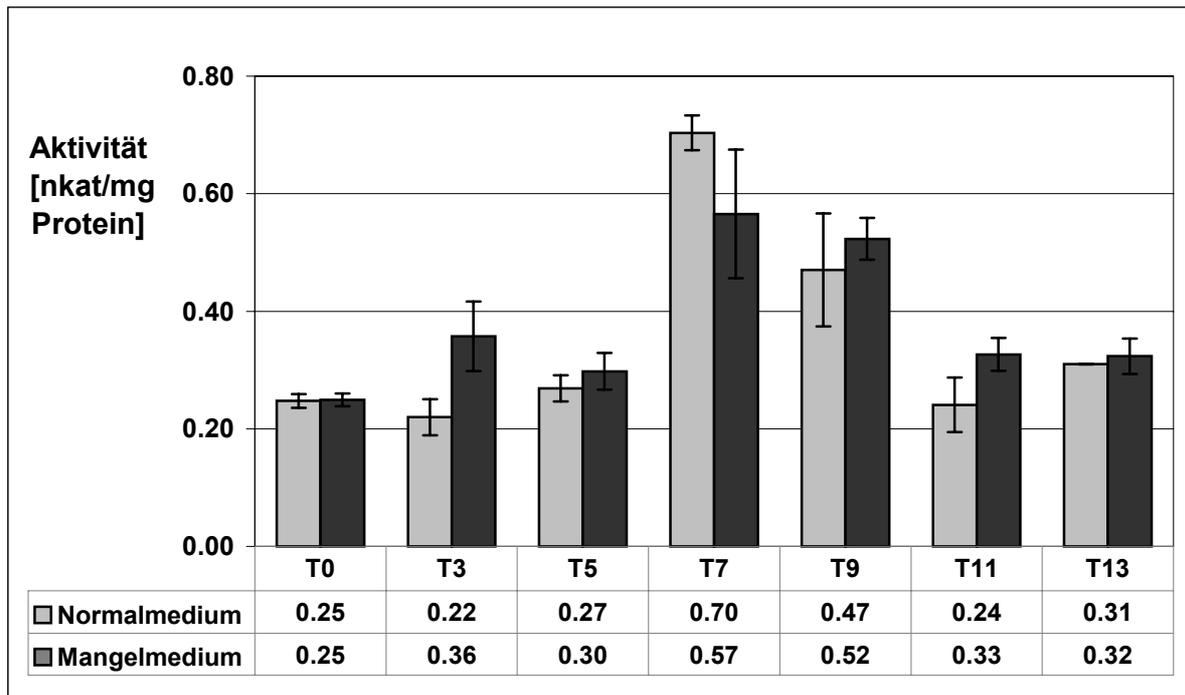


Abbildung 24: Bestimmung der N-GOGAT Aktivität in *H. carterae* Kulturen in Normal- und Mangelmedium. Rohenzymextrakte aus der Alge *H. carterae* wurden in Normalmedium und Stickstoffmangelmedium angezogen. Die NADH-abhängige GOGAT Aktivität wurde am Tag 0 (Tag des Animpfens) und ab dem Tag drei alle zwei Tage bis zum Tag 13 gemessen. Die hellen Balken stellen die N-GOGAT Aktivitäten von Algen in Normalmedium, die dunklen die der Algen in Mangelmedium dar.

Die Ergebnisse der GOGAT Aktivitätstests sind in Abbildung 24 dargestellt. Bei *H. carterae* konnte kein Einfluss des Stickstoffmangels auf die Aktivität der N-GOGAT beobachtet werden. Sowohl in der Kontrollkultur als auch in der Stickstoffmangelkultur war ein entwicklungsbedingter Anstieg der Aktivität in den ersten Tagen der Anzucht zu erkennen, in beiden Kulturen erreichte die Aktivität ihr Maximum am siebten Tag nach dem Animpfen und fiel dann ab. Zwar variierten die absoluten Werte der gemessenen N-GOGAT Aktivität in der Stickstoffmangelkultur zum Teil etwas von denen der Kontrollkultur, jedoch war unter Berücksichtigung der Standardabweichung kein signifikanter Unterschied festzustellen.

Aufgrund des reduzierten Wachstums war die Menge an isoliertem Protein in den Stickstoffmangelkulturen gerade in den ersten Tagen der Messung sehr gering. Damit konnten zum Teil nicht die üblichen Mengen an Rohenzym in den Aktivitätstest eingesetzt werden. Zur Kontrolle, ob die Konzentration des verwendeten Enzymextraktes einen Einfluss auf die Aktivität pro mg eingesetzten Proteins hat, wurden Verdünnungen des Rohenzymextraktes der Kontrollkulturen bis zu einer Konzentration des Gesamtproteins von 0,15 mg/ml angefertigt und diese in die Enzymaktivitätstests eingesetzt. Die Aktivität bezogen auf die Proteinmenge

war dabei in allen Fällen gleich groß (Daten nicht gezeigt). Damit konnte eine Abhängigkeit von der absoluten Proteinmenge eindeutig ausgeschlossen werden.

In der Rhodophyte *P. aeruginum* sollten sowohl Fd- als auch N-GOGAT auf ihre Regulation durch ein reduziertes Angebot an Stickstoff hin untersucht werden. Auch für diese Alge stellte sich ein Stickstoffgehalt von 10% bezogen auf das Originalmedium als günstig für Untersuchungen unter Stickstoffmangelbedingungen heraus. In Abbildung 25 a sind die Wachstumskurven von *P. aeruginum*-Kulturen in Normal- und Stickstoffmangelmedium dargestellt. Abbildung 25 b zeigt den deutlichen Unterschied in der Pigmentierung der Algen, die unter Stickstoffmangelbedingungen angezogen wurden gegenüber denen in Normalmedium (Chlorose).

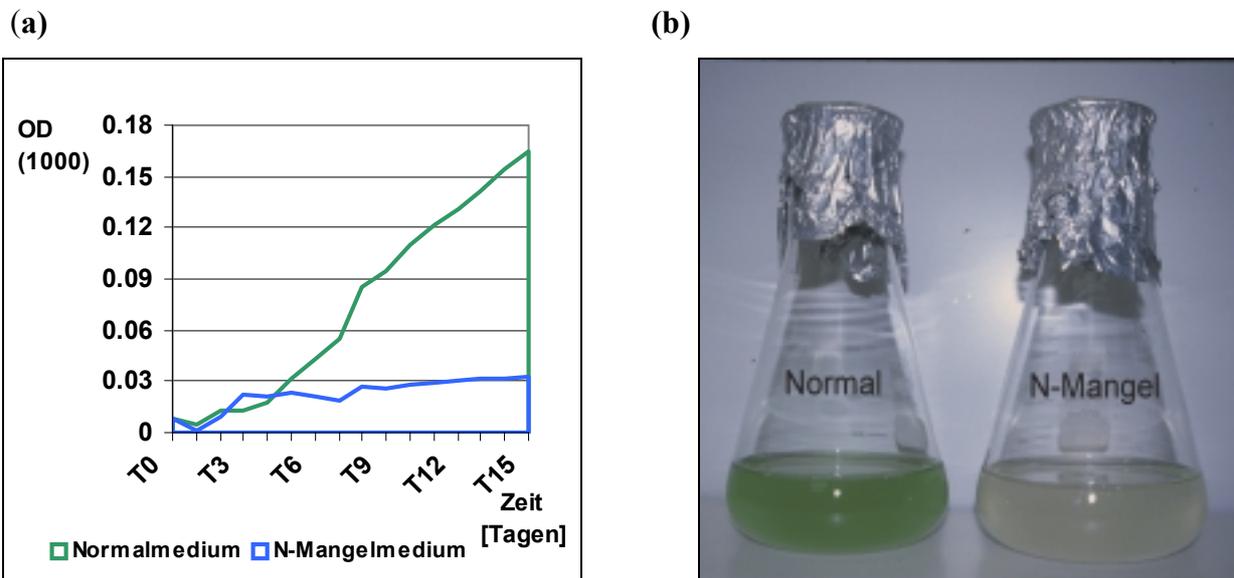


Abbildung 25: *P. aeruginum*-Kulturen in Normal- und Stickstoffmangelmedium. In Abbildung 25 a sind die Wachstumskurven beider Kulturen nebeneinander dargestellt. Grün ist Kurve der Algen in Normalmedium und blau die der in Mangelmedium markiert. Abbildung 25 b zeigt die Pigmentierung beider Kulturen im Vergleich.

Normal: *P. aeruginum*-Kultur in Standardmedium

N-Mangel: *P. aeruginum* in Medium mit lediglich 10% Stickstoff

Bei *P. aeruginum* verhielten sich Fd- und N-GOGAT hinsichtlich ihrer Regulation durch Stickstoffmangel unterschiedlich. Während die N-GOGAT keinen Unterschied in der Höhe ihrer Aktivität zwischen Normal- und Stickstoffmangelkultur zeigte (Abbildung 26 b), scheint die Enzymaktivität der Ferredoxin-abhängigen Isoform durch den Mangel an Stickstoff induziert zu werden. Es war in den Enzymextrakten der Stickstoffmangelkulturen eine gegenüber denen aus den Kontrollkulturen dreifach erhöhte Synthese von Glutamat zu messen (Abbildung 26 a).

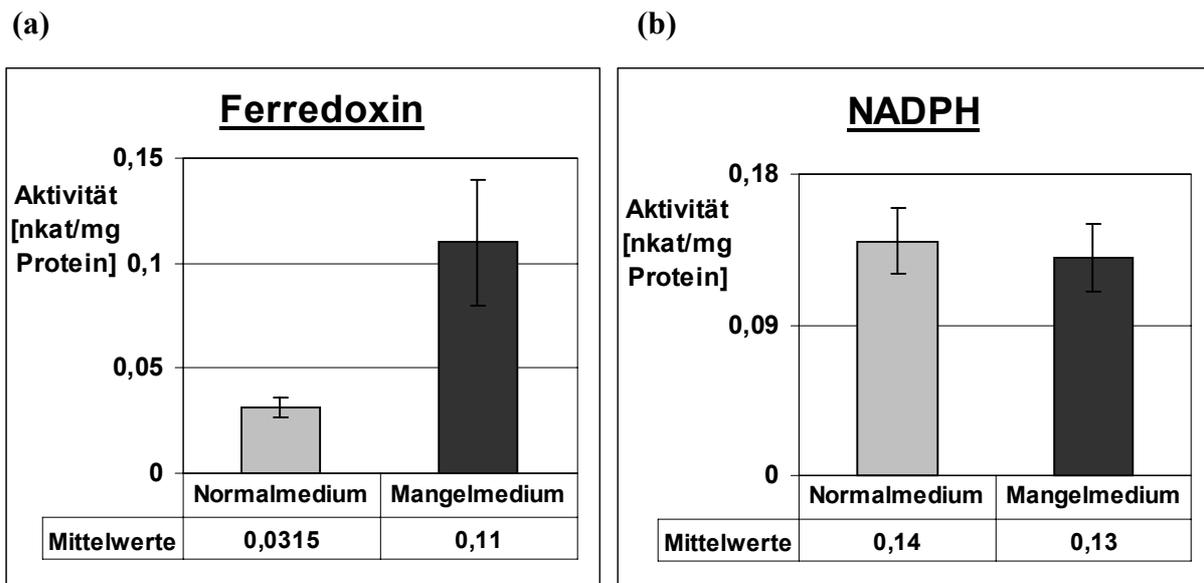


Abbildung 26 a und b: Stickstoffabhängige GOGAT Aktivitäten in *P. aeruginosa*.

Kulturen der Rhodophyte *P. aeruginosa*, die in Stickstoffmangelmedium (dunkle Balken; 10% Stickstoff) angezogen wurden, wurden in der Mitte der Lichtphase geerntet und das daraus gewonnene lösliche Protein für den Nachweis Fd- bzw. NADPH-spezifischer GOGAT Aktivitäten eingesetzt. Zur Kontrolle dienten Algen, die in Standardmedium angezogen worden sind (helle Balken).

3.10 Regulation der GOGAT auf der Ebene der Transkription

Zur Analyse der Expression verschiedener GOGAT-Isoenzyme kam die Reverse-Transkriptase-abhängige Polymerase-Ketten-Reaktion (RT-PCR) zum Einsatz. Der Vorteil dieser Methode ist die extrem hohe Sensitivität der PCR. Selbst geringste Mengen, bis zu wenigen Molekülen der entsprechenden mRNA genügen dabei als Ausgangsmaterial (Leblanc et al., 1999). Daneben können aber gerade bei der Anwendung dieser Methode einige grundsätzliche Probleme auftreten, die das Ergebnis erheblich beeinflussen.

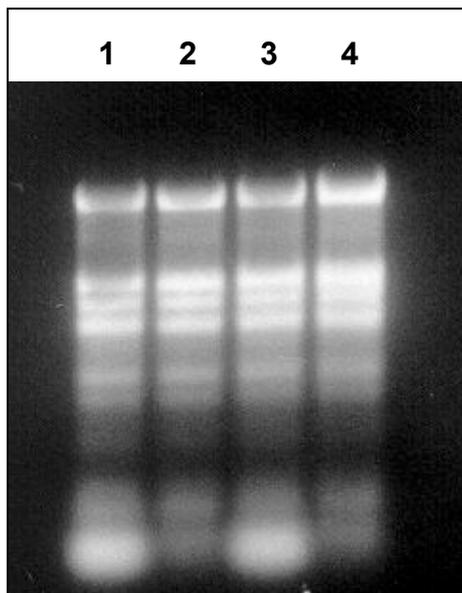
So sind an der Reaktion zwei aufeinanderfolgende enzymatische Reaktionen mit jeweils unterschiedlichen Eigenschaften beteiligt. Die PCR-Reaktion stellt davon aufgrund der exponentiellen Amplifikation ihrer Produkte das größere Problem dar (Clontech, 1991). Einige andere Faktoren können zudem die Effizienz der PCR beeinflussen, dazu gehören:

Verunreinigung des Templates, die Länge des zu amplifizierenden Fragmentes, die Basenabfolge der Sequenz (auch Sekundärstrukturen) sowie die verwendeten Primer.

Essentiell für die semiquantitative Analyse der Expression ist, dass die PCR-Reaktion noch vor Erreichen der Plateau-Phase beendet wird. Dazu muss zunächst in vergleichbaren Standardansätzen mit ansteigender Konzentration des Templates und unterschiedlicher Zahl

der Zyklen die Plateau-Phase definiert und in den eigentlichen Messansätzen die Zyklenzahl entsprechend angepasst werden. Ein Plateau gilt als erreicht, wenn fünf zusätzliche Zyklen der PCR nicht mindestens eine Verdoppelung der Produktmenge zur Folge haben (Singer-Sam et al., 1990).

Aus *A. spirographidis*, und *A. acetabulum* wurde wie in 2.15 beschrieben Gesamt-RNA isoliert, mit dem Genezapper der Firma Pharmacia quantifiziert und gleichzeitig auf ihre Reinheit hin kontrolliert (A260:A280). Zusätzlich wurde die so bestimmte RNA auf einem 2%igem Agarosegel noch einmal auf ihre Qualität hin kontrolliert. Damit konnte sichergestellt werden, dass annähernd gleiche Mengen der zu vergleichenden RNA in die Reverse Transkription eingesetzt wurden. Ein typisches RNA-Gel mit gleichen Mengen RNA aus *A. spirographidis* vom Zeitpunkt L6 wie vom Zeitpunkt D6 ist in Abbildung 27 dargestellt.



**Abbildung 27: Isolierte Gesamt-RNA aus *A. spirographidis*. Die RNA wurde wie in 2.17 beschrieben isoliert und anschließend mit Hilfe einer LiCl-Fällung aufgereinigt. Die Algen wurden in der Mitte der Licht- (L6) und in der Mitte der Dunkelphase (D6) isoliert.
Spur 1) Gesamt RNA L6
Spur 2) Gesamt RNA L6, LiCl-gefällt
Spur 3) Gesamt RNA D6
Spur 4) Gesamt RNA D6, LiCl-gefällt**

Gleiche Mengen an RNA aus Tags bzw. Nachts geernteten Algen wurden anschließend in die RT-Reaktion eingesetzt. Eine Amplifikation erfolgte zunächst mit allgemeinen GOGAT-Primern (9+/15-). Anschließend erfolgte eine genauere Analyse mit genspezifischen Primern.

Als Kontrollen dienten:

- PCR Ansätze mit RNA zum Ausschluss von DNA-Kontaminationen
- Ansätze aus genomischer DNA
- die Amplifikation von bezüglich der Lichtabhängigkeit konstitutiv exprimierten Genen wie Aktin, Centrin, und HSP70

Abbildung 28 zeigt die RT-PCR mit 9+/15- GOGAT Primern aus der RNA von *A. acetabulum*. Es wurden Gesamt- sowie aufgereinigte m-RNA für die Reaktion eingesetzt. Offensichtlich wird mindestens eines der GOGAT Gene lichtabhängig transkribiert. Sowohl bei der Reaktion aus Gesamt-RNA als auch bei der aus m-RNA ist ein signifikanter Unterschied in der Menge des PCR-Produktes zwischen den Zeitpunkten L6 und D6 zu erkennen. In der Kontroll-PCR mit Centrin- und HSP70 Primern war kein Unterschied zwischen den Produkten von L6 und D6 nachweisbar (Daten nicht gezeigt).

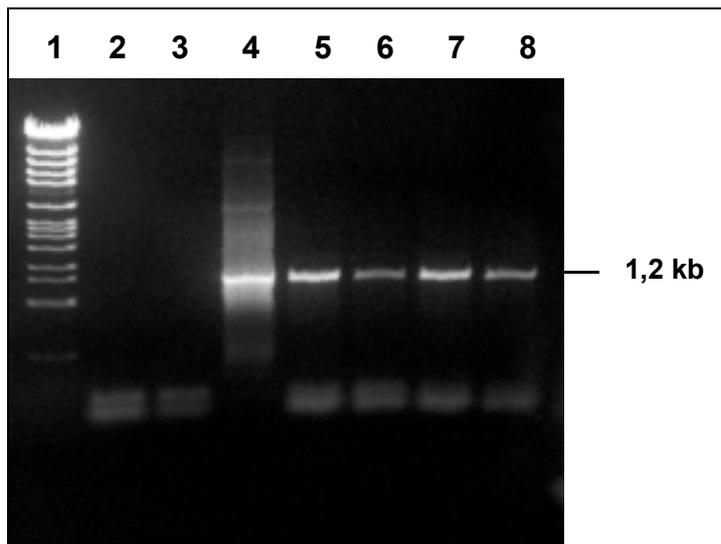


Abbildung 28: RT-Reaktion mit 9+/15- Primern aus *A. acetabulum* Gesamt- und m-RNA
Spur 2: RNA L6 Kontrolle
Spur 3: RNA D6 Kontrolle
Spur 4: DNA-Kontrolle (9+/15-PCR Produkt)
Spur 5: PCR-Ansatz mit c-DNA L6 aus Gesamt-RNA
Spur 6: PCR-Ansatz mit c-DNA D6 aus Gesamt-RNA
Spur 7: PCR-Ansatz mit c-DNA aus isolierter m-RNA, L6
Spur 8: PCR-Ansatz mit c-DNA aus isolierter m-RNA, D6
Spur 1: Lambda DNA Eco1301/MluI Marker

Nachdem mit allgemeinen GOGAT-Primern eine lichtabhängige Regulation mindestens eines GOGAT Enzymes auf Transkriptionsebene festgestellt werden konnte, sollten die spezifischen Expressionsmuster einzelner Gene diesbezüglich untersucht werden. Dazu kamen bei *A. spirographidis* die Primer AspirFd1+, AspirN1+, AspirN2+, AspirA2+ und AspirA3+ und bei *A. acetabulum* die Primer AcetFd1+ und AcetN1+ in Kombination mit dem 15- Primer zum Einsatz. Die Primersequenzen sind im Anhang aufgeführt.

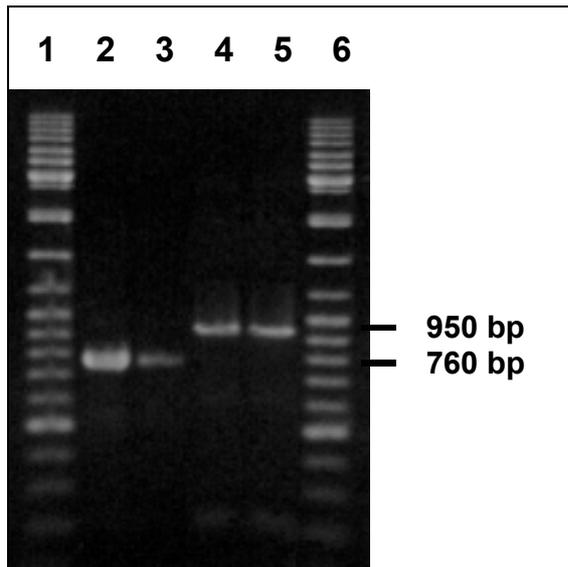


Abbildung 29: Ergebnis der RT-PCR aus Gesamt-RNA der Alge *A. acetabulum*. Gesamt-RNA wurde zum Zeitpunkt L6 und D6 geerntet und gleiche Mengen der daraus synthetisierten cDNA in die nachfolgende PCR-Reaktion mit den genspezifischen Primerkombinationen AcetFd1+/15- sowie AcetN1+/15- eingesetzt.

Spur 2: AcetFd1+/15- Produkt aus L6-cDNA

Spur 3: AcetFd1+/15- Produkt aus D6-cDNA

Spur 4: AcetN1+/15- Produkt aus L6-cDNA

Spur 5: AcetN1+/15- Produkt aus D6-cDNA

Spuren 1 und 6: GeneRuler™ Ladder Mix

In *A. acetabulum* wurden die spezifischen lichtabhängigen Expressionsmuster für die Fd- sowie für die N-GOGAT untersucht. Auf dem in Abbildung 29 gezeigten Agarosegel sind die mit Hilfe der Primerkombination AcetFd1+/15- sowie AcetN1+/15- amplifizierte PCR-Produkte aufgetrennt. Dabei wurden jeweils die zu vergleichenden PCR Produkte eines Gens vom Zeitpunkt L6 bzw. D6 nebeneinander aufgetragen. Ein signifikanter Unterschied zwischen Tag und Nacht ist nur bei dem 760 bp großen Fragment aus Fd-GOGAT m-RNA zu erkennen (Spuren 2 und 3); bei dem Fragment der N-GOGAT dagegen ist keine lichtbedingt erhöhte Transkription nachweisbar (Spuren 4 und 5).

In Abbildung 30 ist die vergleichende RT-PCR für verschiedene GOGAT Gene aus *A. spirographidis* gezeigt. Wie bei *A. acetabulum* ist auch hier nur die Expression der Fd-GOGAT lichtabhängig reguliert. Das in Spur 2 aufgetragene Amplifikat mit AspirFd1+/15- Primern für den Zeitpunkt L6 ist deutlich erhöht gegenüber dem für den Zeitpunkt D6 (Spur 3). Das untersuchte N-GOGAT-Gen sowie die α -GOGAT Gene sind dagegen offensichtlich konstitutiv exprimiert.

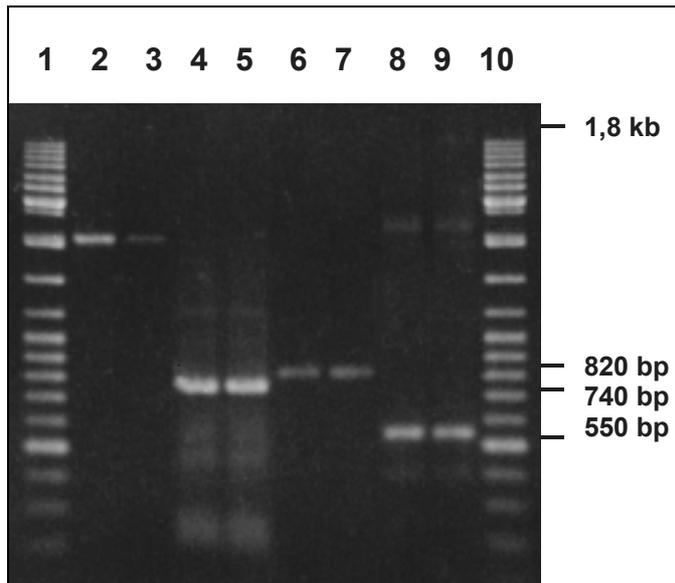


Abbildung 30: Untersuchungen zur differentiellen Expression verschiedener GOGAT Gene in *A. spirographidis*

Gleiche Mengen am Tag bzw. in der Nacht isolierter RNA aus der Rotalge *A. spirographidis* wurde in die RT-PCR unter Verwendung genspezifischer Primer eingesetzt.

Spur 2: AspirFd1+/15-; L6

Spur 3: AspirFd1+/15-; D6

Spur 4: AspirN1+/15-; L6

Spur 5: AspirN1+/15-; D6

Spur 6: AspirA2+/15-; L6

Spur 7: AspirA2+/15-; D6

Spur 8: AspirA3+/15-; L6

Spur 9: AspirA3+/15-; D6

Spuren 1 und 10: GeneRuler™ Ladder Mix

Charakterisierung der N-GOGAT Aktivitäten in *H. carterae*

3.11 Kompartimentierung der N-GOGAT in *H. carterae*

Die für die heterokonte Alge *H. carterae* nachgewiesenen GOGAT Aktivitäten sollten einem Zellkompartiment zugeordnet werden. Dazu wurden mit Hilfe eines Potters Plastiden aus *H. carterae* angereichert. Die Anreicherung von Plastiden lässt sich anhand des Verhältnisses der Absorption von Photosynthesepigmenten zu der Gesamtproteinkonzentration der unterschiedlichen Fraktionen kontrollieren.

Mit Hilfe eines Spektralphotometers wurde ein kontinuierliches Spektrum zwischen 340 und 800 nm erstellt, das die Maxima für die Photosynthesepigmente in *H. carterae* erkennen lässt. Diese lagen in den erwarteten Bereichen und zwar bei 438 bzw. 672 nm (vgl. Abbildung 31).

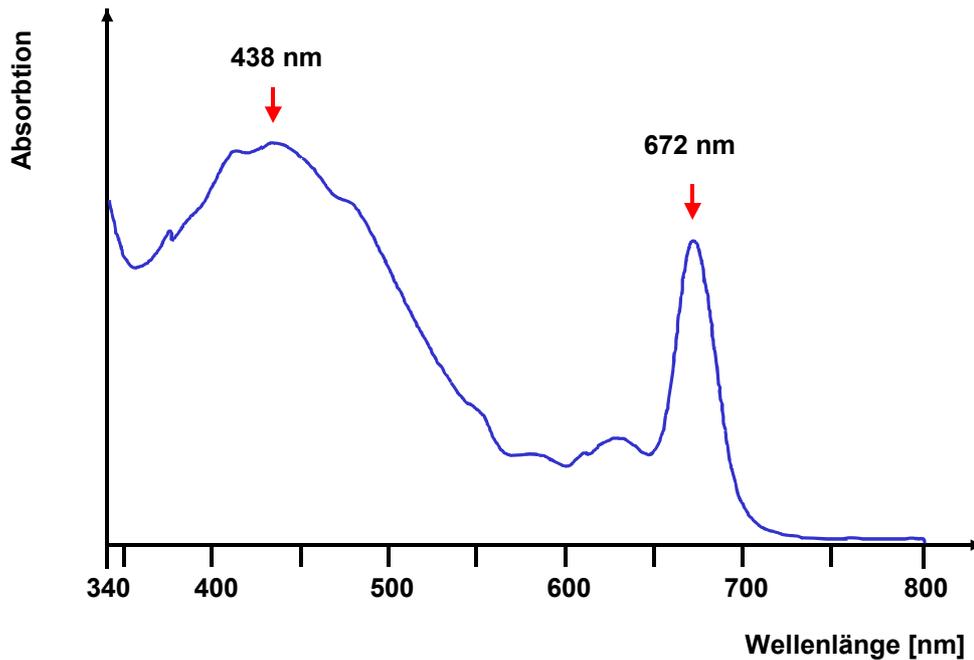


Abbildung 31: Kontinuierliches Spektrum von *H. carterae* Protein. Gesamtprotein wurde aus *H. carterae* isoliert und mit dieser Fraktion ein kontinuierliches Spektrum zwischen 340 und 800 nm gefahren. Die Absorptionsmaxima lagen bei 438 und 672 nm.

Das Verhältnis der relativen Absorption zwischen den verschiedenen Proteinfraktionen ist ein Maß für die Anreicherung der Plastiden. Die Werte sind in Tabelle 6 zusammengefasst.

<u>Faktor der Plastidenanreicherung in <i>H. carterae</i></u>			
Wellenlänge [nm]	Gesamtprotein [rel. Abs./mg Protein]	Plastidenfraktion [rel. Abs./mg Protein]	Cytopl. Protein [rel. Abs./mg Protein]
438	6609	12686	1062
672	4048	10008	787
Plastidenanreicherung (Plastid-Gesamt)	Plastidenanreicherung (Plastid-Cytoplasma)		
1,92	11,95		
2,47	12,71		

Tabelle 6: Anreicherung der Plastiden aus *H. carterae* Gesamtzymextrakt. Die Plastiden wurden mittels Potter angereichert und die Effektivität durch eine Bestimmung der Photopigmente bei 438 und 672 nm pro mg Protein überprüft.

So ergaben sich für das Verhältnis der relativen Absorption von den angereicherten Plastiden zu dem Gesamtprotein ein Faktor von 1,92 (436 nm) bzw. 2,47 (672 nm) und für das Verhältnis von Plastiden- zu cytoplasmatischem Protein ein Faktor von 11,95 bzw. 12,71. Die Mittelwerte liegen bei 2,2 (Plastidäres-/Gesamtprotein) und 12,33 (Plastid/Cytoplasma).

Die einzelnen Fraktionen wurden jeweils für die Bestimmung der GOGAT Aktivitäten eingesetzt. In Abbildung 32 sind die Ergebnisse dieser Messungen dargestellt. Für die Fd-GOGAT konnte die Aktivität in den Plastiden nachgewiesen werden. Sie ist hier um den Faktor 3,6 höher als im Gesamtprotein. Die Hauptaktivität der N-GOGAT scheint bei *H. carterae* dagegen in der cytoplasmatischen Fraktion zu liegen (0,31 nkat/mg Protein), der im Plastiden gemessene Wert ist deutlich niedriger (0,09 nkat/mg Protein). Insgesamt war dabei die Höhe der gemessenen N-GOGAT Aktivität auch im Gesamtprotein deutlich verringert gegenüber Messungen ohne die Prozedur der Plastidenanreicherung. Dafür sind die nicht optimalen Aufschlussbedingungen und die Instabilität der N-GOGAT verantwortlich.

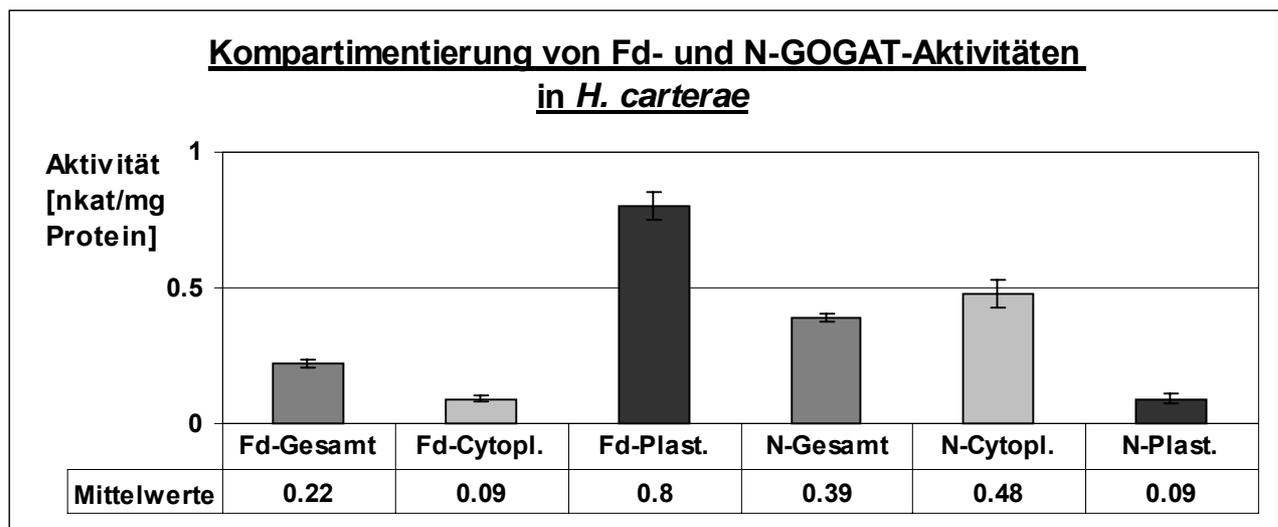


Abbildung 32: Kompartimentierung von Fd- sowie N-GOGAT Enzymaktivitäten in *H. carterae*. Die mit dem Potter gewonnenen Proteinfractionen aus der heterokonten Alge *H. carterae* wurden für die Messung der Enzymaktivitäten wie beschrieben eingesetzt. Die ersten drei Säulen stellen die Methylviologen-abhängigen GOGAT-Aktivitäten in den unterschiedlichen Fraktionen Gesamtprotein (Fd-Gesamt), cytoplasmatisches Protein (Fd-Cytopl.) und angereicherte Plastidenproteine (Fd-Plast.) dar. Entsprechend sind mit N-Gesamt, N-Cytopl. und N-Plast. die jeweils im optischen Test mit NADH als Coenzym gemessenen Aktivitäten bezeichnet (Säulen 4-6).

Interessant schien ebenfalls die Frage nach der Kompartimentierung von GOGAT Enzymaktivitäten in Rhodophyten. Aus *A. spirographidis* und *P. aerugineum* sollten Plastiden isoliert und wie bei *H. carterae* in verschiedenen Fraktionen spezifische Aktivitäten gemessen

werden. Trotz intensiver Bemühungen gelang es leider nicht, aus einer der genannten Arten mit den gängigen Methoden eine hinreichend angereicherte Plastidenfraktion zu isolieren.

3.12 Kontrolle mit veränderter Meßtemperatur

Die Temperatur, bei der die Messung der GOGAT Aktivitäten stattfinden soll, ist in der Originalanleitung mit 30 °C angegeben. Da es sich bei den untersuchten Algen aber um eine marine Organismen handelt, die in ihrem natürlichen Lebensraum niemals so hohen Temperaturen ausgesetzt ist, bestand Grund zu der Annahme, dass die GOGAT Enzyme aus diesen Algen niedrigere Temperaturen bevorzugt. Die GOGAT Aktivitäten wurden daher bei 30 °C, bei 25 °C sowie bei 20 °C (RT) gemessen. Die Aktivität bei 20 °C (z.B. N-GOGAT *H. carterae* 0,75 nkat/mg Protein) lag deutlich über den bei 25 (0,59 nkat/mg Protein) und 30 °C (0,33 nkat/mg Protein) gemessenen Werten.

3.13 Stabilität der N-GOGAT bezüglich Einfrierens

Von der N-GOGAT in höheren Pflanzen ist bekannt, dass sie nicht sehr stabil ist. Insbesondere eine Sensitivität gegenüber Frierkälte wurde in mehreren Fällen beschrieben. Die Kältetoleranz der N-GOGAT Enzymaktivitäten in *H. carterae* sollte aus diesem Grund untersucht werden. Es wurde frisch extrahiertes Enzymextrakt sowie bei -70 °C für wenige Stunden bis mehrere Tage lang weggefrorenes Protein derselben Kultur für die Messungen eingesetzt. Die NADH-abhängige GOGAT Aktivität lag in den kältebehandelten Extrakten bei 0,63 (+/- 0,05) nkat/mg Protein. Bei *H. carterae* trat demnach durch das Einfrieren ein Verlust von ca. 15% der Aktivität gegenüber der in frischen Enzymextrakt (0,74 nkat/mg Protein) auf.

4. Diskussion

4.1 GOGAT Enzyme

Einer der zentralen Stoffwechselwege in Pflanzen ist die Assimilation von Stickstoff. Der GS/GOGAT Weg stellt die Eintrittspforte für anorganischen Stickstoff in den pflanzlichen Metabolismus dar. In höheren Pflanzen ist die GOGAT bereits gut untersucht; zwei verschiedene Isoformen des Enzyms sind bekannt, die sich hinsichtlich ihrer Größe, ihres Aufbaus, ihrer biochemischen Eigenschaften und ihrer Regulation unterscheiden. Ein Isoenzym ist Ferredoxin-, das andere NADH-abhängig (Ireland und Lea, 1999; Lancien et al., 2000).

4.2 Vergleichende Analyse von GOGAT Enzymen und deren Genen in Algen

Grundsätzlich scheinen die beiden aus höheren Pflanzen bekannten Isoformen der GOGAT auch innerhalb der verschiedenen Gruppen von Algen weit verbreitet zu sein. Sowohl in Rhodophyten und Heterokontophyten, als auch in chlorophytischen Algen scheinen beide Isoformen des Enzyms nebeneinander vorzukommen. Zumindest Rhodophyta und Heterokontophyta enthalten mehrere für eine N-GOGAT kodierende Gene.

Lediglich in der Glaucocystophyte *C. paradoxa* könnte eine N-GOGAT ganz fehlen. Hier konnte bisher nur ein *glsF*-homologes Gen nachgewiesen werden (Stahlheber, pers. Mitteilung).

Zusätzlich dazu konnte in Algen, deren Plastiden der „roten Linie“ angehören, eine weitere Isoform der GOGAT nachgewiesen werden, die phylogenetisch den Enzymen aus α -Proteobakterien am nächsten steht. Gene, die für diese α -GOGAT kodieren, kommen in allen untersuchten Vertretern aus den Gruppen der Rhodophyta, Heterokontophyta, Cryptophyta und Haptophyta in der Mehrzahl vor. In Chlorophyta und Glaucocystophyta sowie höheren Pflanzen gibt es bisher keinen Hinweis auf ein entsprechendes Enzym.

Von besonderem Interesse ist unter anderem die Evolution der unterschiedlichen GOGAT Enzyme in Algen. Phylogenetische Bäume können eine Vorstellung davon vermitteln, wie deren Evolution verlaufen sein könnte. Daneben muss auch die Organisation der verschiedenen GOGAT Enzyme und Gene anderer Organismen mit berücksichtigt werden.

4.3 GOGAT in Eubakterien

In verschiedenen Eubakterien wurde eine aus zwei verschiedenen Untereinheiten bestehende NADPH-abhängige GOGAT gefunden (Oliver et al., 1987; Pelanda et al., 1993; Lu et al., 1997; Castillo et al., 2000; Goss et al., 2000). Die große Untereinheit wird von dem *gltB*-, die kleine von dem *gltD*-Gen kodiert. Beide sind bei *E. coli* auf dem *gltB/gltD*-Operon (Oliver et al., 1987), bei *A. brasilense* auf dem *gltD/gltB*-Operon (Pelanda et al., 1993) lokalisiert.

In den photosynthetisch aktiven Cyanobakterien kommen neben diesen N- auch Ferredoxin-abhängige GOGAT Enzyme vor (Marques et al., 1992; Navarro et al., 1995). Diese bilden zusammen mit den Fd-GOGAT Enzymen aus Chloro- und Rhodophyten ein Cluster innerhalb dessen sie je nach Wahl der Root an unterschiedlichen Positionen stehen (vgl 3.6.1).

In einem weiteren Bakterium (*Aquifex aeolicus*) soll eine Fd-GOGAT vorkommen (Deckert et al., 1998), wobei das offensichtlich aufgrund der Sequenzähnlichkeiten angenommen, und nicht durch funktionelle Untersuchungen bestätigt wurde. Aufgrund ihrer Stellung im Gesamtbaum (Abbildung 15) könnte es sich bei diesem Enzym aber auch um eine N-GOGAT handeln. Zudem wurde in dem vollständig sequenzierten Genom dieses Bakteriums auch ein Gen für die kleine Untereinheit einer N-GOGAT gefunden (Deckert et al., 1998). Eine gute phylogenetische Einordnung dieses Bakteriums ist bisher noch nicht gelungen. Aufgrund von 16S-RNA Bäumen ist es an der Basis der Eubakterien angesiedelt (Olsen et al., 1994). Dem widersprechen verschiedene auf Proteinsequenzen basierende Bäume (Deckert et al., 1994).

4.4 Putative GOGAT Gene in Archaeobakterien

Die Analysen einiger Genome von Archaeobakterien haben gezeigt, dass in dieser Gruppe zwei unterschiedliche putative GOGAT Enzyme vorkommen (Bult et al., 1996; Kawarabayasi et al., 1998; Klenk et al., 1997; Smith et al., 1997).

Eine putative für eine Glutamat-Synthase kodierende Region konnte im Genom von *Methanococcus jannaschii* nachgewiesen werden (Bult et al., 1996; Dincturk und Knaff, 2000). Die Übereinstimmung der *M. jannaschii* Glutamat-Synthase zu Bereichen der großen Untereinheit anderer GOGAT Enzyme liegt auf Proteinebene bei 35-42% (Dincturk und Knaff, 2000), wobei offensichtlich funktionelle Bereiche eine größere Ähnlichkeit aufweisen.

Die Glutamat-Synthase eines anderen Archaeobakteriums *Pyrococcus sp. KOD1* zeigt die größte Übereinstimmung (41-49%) zu der kleinen Untereinheit der GOGAT in Eubakterien und zur zweiten Domäne der N-GOGAT in *S. cerevisiae*, *O. sativa* und *M. sativa*.

Sequenzen, die zur großen Untereinheit der eubakteriellen GOGAT homolog sind, wurden ebenfalls in den Archaeobakterien *Archaeoglobus fulgidus* (Klenk et al., 1997) und *Methanobakterium thermoautotrophicum* (Smith et al., 1997) gefunden.

Außerdem wurden in *Pyrococcus horikoshii* (Kawarabayasi et al., 1998) und *Pyrococcus abyssi* (NCBI NIH Datenbank, unveröffentlicht) putative GOGAT Gene identifiziert, die auf Proteinebene ca. 80% Übereinstimmung zu der *Pyrococcus sp. KOD1* GOGAT zeigen. In keinem der Vertreter mit dieser GltD-homologen GOGAT konnte eine Region mit einer signifikanten Homologie zu GltB gefunden werden.

4.5 GOGAT in nicht-photosynthetisch aktiven Eukaryoten

N-GOGAT Gene oder Aktivitäten wurden mittlerweile u.a. in den Pilzen *Neurospora crassa* (Mora et al., 1990), *Schizosaccharomyces pombe* (Perysinakis et al., 1995) und *S. cerevisiae* (Filetici et al., 1996), dem Malariaerreger *Plasmodium falciparum*, sowie den niederen Tieren *Caenorhabditis elegans* (Wilson et al., 1994) und *Bombyx mori* (Hirayama et al., 1998) nachgewiesen. Gemeinsames Merkmal dieser N-GOGAT in allen untersuchten Organismen, wie auch in höheren Pflanzen, ist die Fusion von GltB- und GltD- Untereinheit durch die Fusion der für sie kodierenden Gene zu einem über 7 kb großen *glsN*-Gen. Die so organisierte eukaryotische N-GOGAT bildet innerhalb des N-GOGAT Clusters ein klar von den anderen Sequenzen abgetrenntes Cluster.

4.6 Die ursprüngliche Form der GOGAT

Darüber wie die ursprüngliche GOGAT ausgesehen hat, kann zum momentanen Zeitpunkt nur spekuliert werden. Unter Berücksichtigung der GOGAT Enzyme in Archaeobakterien und Eubakterien gibt es zwei denkbare Formen einer ursprünglichen GOGAT:

- 1) Zum einen könnte es zunächst zwei unterschiedliche GOGATs gegeben haben, so wie es noch immer bei den Archaeobakterien der Fall ist. Die eine GOGAT war homolog zu Teilen der heutigen großen Untereinheit bakterieller GOGAT Enzyme (GltB), die andere zu der heutigen kleinen Untereinheit (GltD). Während das zweite Enzym sicherlich NADPH-abhängig war, ist die Coenzympezifität des ersten bislang noch unklar (Dincturk und Knaff, 2000). In der Entwicklung der Archaeobakterien sind diese beiden Glutamat-synthetisierenden Enzyme nebeneinander erhalten geblieben, wobei jeweils nur eine Isoform in einer Species vorkommt. Bei den Eubakterien ist eine neue Form der GOGAT entstanden, die sich aus den beiden ursprünglich voneinander unabhängigen Enzymen zusammensetzt. Dabei könnte die Coenzympezifität von der kleinen Untereinheit übernommen worden sein. Für die N-GOGAT aus *A. brasilense* konnte gezeigt werden, dass das NADPH an die kleine Untereinheit bindet und die dort aufgenommenen Elektronen über prosthetische Gruppen an das katalytische Zentrum weitergeleitet werden (Vanoni und Curti, 1999).

Für diese Überlegung bezüglich der ursprünglichen Form der GOGAT sprechen die beiden heute in unterschiedlichen Archaeobakterien vorkommenden GOGAT Enzyme, von denen zumindest die GltD-homologe GOGAT aus *Pyrococcus* funktionell ist, ohne dass eine große Untereinheit vorhanden ist (Jonsareejit et al., 1997).

- 2) Die ursprüngliche GOGAT bestand aus zwei Untereinheiten, so wie sie in Eubakterien heute vorliegt. In der Linie der Archaeobakterien könnten sich daraus zwei reduzierte Enzyme entwickelt haben, während die N-GOGAT der Eubakterien in der ursprünglichen Form erhalten blieb. Sollte sich die *M. jannaschii* Glutamat-Synthase als eine Fd-GOGAT entpuppen, hieße das aber, dass die Evolution der Ferredoxin-abhängigen Enzyme möglicherweise zwei Mal unabhängig voneinander stattgefunden hätte. Die GOGAT aus diesem Archaeobakterium enthält eine Teilsequenz, die sonst nur in Ferredoxin-abhängigen Isoenzymen gefunden wird (Dincturk und Knaff, 2000).

4.7 Mögliche Ursprünge von GOGAT Enzymen in Pflanzen

Verschiedene Autoren haben postuliert, dass die in höheren Pflanzen vorkommenden Isoformen der GOGAT (Fd- und N-GOGAT) unterschiedliche phylogenetische Ursprünge haben (Valentin et al., 1993; Temple et al., 1998; Dinkturk und Knaff, 2000).

Nach der Endosymbiontentheorie kommen dabei für Pflanzen mit primären Plastiden grundsätzlich als Ursprung in Frage:

- a) die eukaryotische Wirtszelle
- b) das Mitochondrium
- c) der Plastid.

Für Algen mit komplexen Plastiden könnten als Ursprung für die GOGAT Enzyme zur Verfügung gestanden haben:

- a) die eukaryotische Wirtszelle
- b) das Mitochondrium
- c) der Rotalgen-Endosymbiont und mit ihm sowohl sein Kern- als auch sein Plastidengenom. Möglicherweise ist es dabei zu einem sekundären Gentransfer aus dem Genom des Symbionten in den Kern der Wirtszelle gekommen.

4.8 Modelle zur Evolution von GOGAT Enzymen

In den Abbildungen 33 bis 36 sind Modelle für die Evolution der GOGAT Isoenzyme schematisch wiedergegeben. Unabhängig von der Frage nach der ursprünglichen Form der GOGAT scheinen sämtliche in Eubakterien und Eukaryoten heute vorkommenden GOGAT Enzyme von einer eubakteriellen N-GOGAT abzustammen, die sich aus zwei Untereinheiten (GltB und GltD) zusammensetzt (vgl. Abbildung 33). Dafür spricht die *L. lactis* GOGAT als Root aller anderen Sequenzen. Daraus haben sich in der Evolution der Bakterien zunächst zwei Hauptlinien entwickelt. Eine fast reine proteobakterielle GOGAT-Linie, die sich weiter aufspaltet in die Linie der Enzyme in α -Proteobakterien und die Linie der GOGAT Enzyme in γ -Proteobakterien.

Die andere große Linie, die sich aus der „Eu-GOGAT“ entwickelt hat, ist die von GOGAT Enzymen zum einen aus gram+ Bakterien („high GC“ und „low GC“) und wiederum einigen Proteobakterien. Aus dieser Linie haben sich ebenfalls verschiedene eukaryotische Linien entwickelt (vgl. Abbildung 36).

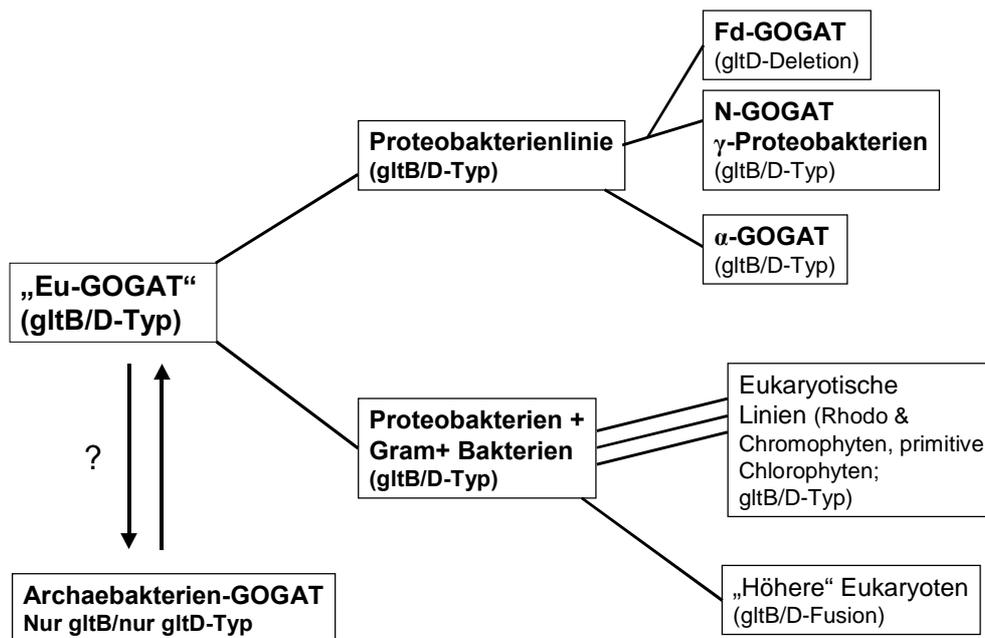


Abbildung 33: Modell für die Evolution der GOGAT innerhalb der Eubakterien.

Die Frage nach der ursprünglichen GOGAT ist bislang ungeklärt. Alle eubakteriellen und eukaryotischen GOGAT Enzyme scheinen aber von einer aus zwei Untereinheiten bestehenden N-GOGAT abzustammen. Daraus haben sich zwei Linien entwickelt, eine Proteobakterien-Linie, von der wiederum verschiedene proteobakterielle GOGAT Enzyme abstammen, und eine Linie von N-GOGATs, die sowohl in gram+ Bakterien als auch in einzelnen Proteobakterien vorkommen.

4.9 Modell für die Evolution der Fd-GOGAT

In Abbildung 34 ist die Evolution der Fd-GOGAT dargestellt. Aufgrund der Stellung des Fd-GOGAT Clusters im Gesamtbaum sieht es danach aus, als habe sich die Fd-GOGAT in Cyanobakterien aus einer frühen N-GOGAT der γ -Proteobakterienlinie entwickelt. Und zwar offensichtlich unter Deletion des Gens für die kleine Untereinheit (Valentin et al., 1993). Sowohl in Cyanobakterien, als auch in verschiedenen Pflanzen wird die Fd-GOGAT lediglich von einem *gltB*-homologen *glsF*-Gen kodiert (Valentin et al., 1993; Temple et al., 1998).

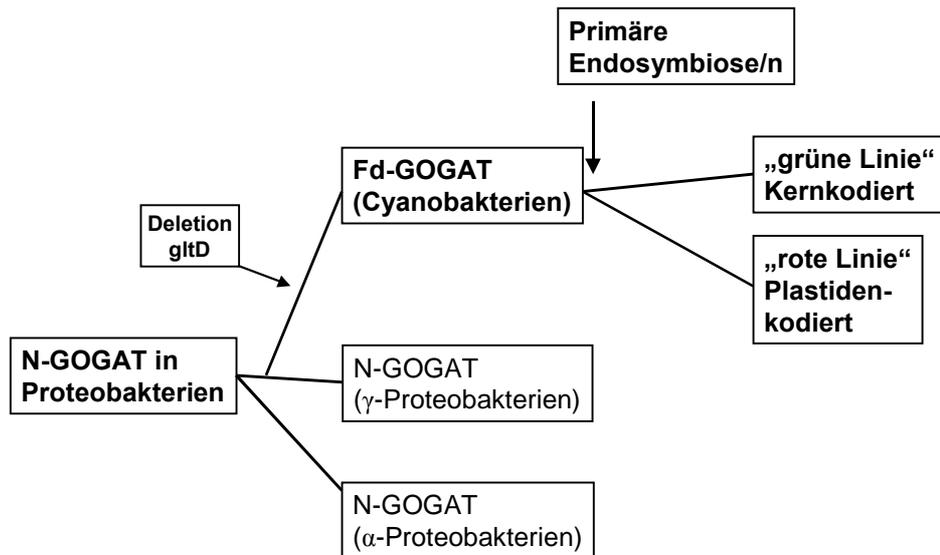


Abbildung 34: Modell für die Evolution der Fd-GOGAT in Bakterien und Pflanzen

Im Zuge der Evolution der Cyanobakterien hat sich, unter Deletion des Gens für die kleine Untereinheit, aus der N-GOGAT in γ -Proteobakterien das Ferredoxin-abhängige Isoenzym entwickelt. Die entsprechenden Enzyme in Chloro- und Rhodophyten lassen sich phylogenetisch von diesem ableiten. Dabei wurde das *glsF*-Gen bei Chlorophyten in den Kern transferriert, während es bei Rotalgen im Plastom verblieben ist.

Im Zuge der primäre Endosymbiose(n) ist die cyanobakterielle Ferredoxin-abhängige GOGAT offensichtlich von der Wirtszelle übernommen worden. Für die Fd-GOGAT, die in Algen mit primären Plastiden und höheren Pflanzen vorkommt, konnte ein cyanobakterieller Ursprung inzwischen nachgewiesen werden (Röttgers, unveröffentlicht; Temple et al., 1998). Dafür spricht sowohl ihre Stellung im phylogenetischen Baum in einem Cluster mit den cyanobakteriellen Sequenzen als auch die Tatsache, dass das *glsF*-Gen bei Rhodophyten im Plastidengenom lokalisiert ist (Reith und Munholland, 1993; Valentin et al., 1993; Glöckner et al., 2000).

Während in einigen Chlorophyten zwei unterschiedliche *glsF*-Gene nebeneinander vorkommen, konnte zumindest auf dem Plastom von *P. purpurea* (Reith und Munholland, 1993) und *C. caldarium* (Glöckner et al., 2000) kein weiteres für eine Fd-GOGAT kodierendes Gen nachgewiesen werden. Zumindest für diese Algen kann ein zweites *glsF*-Gen auf dem Plastidengenom ausgeschlossen werden. Falls ein weiteres *glsF*-Gen vorhanden wäre, müsste sich dieses im Kern der Rhodophyten befinden. Bisher konnte aber in keiner der untersuchten Arten ein solches für eine Fd-GOGAT kodierendes Gen nachgewiesen werden.

Bei Chlorophyten dagegen scheint das *glsF*-Gen im Zuge der Etablierung des Plastiden in das Kerngenom transferiert worden zu sein. In allen untersuchten grünen Pflanzen wird die Fd-GOGAT im Kern kodiert und posttranskriptional in den Plastiden transportiert (Suzuki und Rothstein, 1997). In Chlorophyten sollen ca. 90% der für die Plastidenproteine kodierenden Gene in den Zellkern übernommen worden sein (Shinozaki et al., 1986; Ohyama et al., 1986; Hiratsuka et al., 1989).

Rhodophyta besitzen im Vergleich mit Chlorophyten 80-100 zusätzliche ursprüngliche Endosymbionten-Gene auf dem Plastidengenom (Reith und Munholland, 1993; Glöckner et al., 2000).

Den gleichen Weg wie bei den Chlorophyten hat offensichtlich auch die Fd-GOGAT bei *C. paradoxa* genommen. Auch hier ist kein *glsF*-Gen auf dem Plastidengenom vorhanden (Löffelhardt et al., 1997). Vielmehr konnte für die isolierten Genfragmente *CparFd1* und *CparFd2* gezeigt werden, dass sie aus dem Kerngenom stammen (Stahlheber, pers. Mitteilung).

Die Fd-GOGAT aus einer Heterokontophyte (*O. danica*) ist ihrer Stellung im Fd-GOGAT Baum nach eher nicht via Gentransfer aus dem Rotalgenplastiden in den Kern der sekundären Wirtszelle gelangt. Ob die sekundäre Wirtszelle vor der Aufnahme des rhodophytischen Endosymbioten bereits Plastiden besessen hat, ist bislang nicht geklärt. Eine plastidäre Fd-GOGAT, die nicht von dem entsprechenden Enzym in Rotalgen abstammt, könnte ein Hinweis auf einen solchen ursprünglichen Plastiden sein.

4.10 Modell für die Evolution der α -GOGAT

Auch aus der proteobakteriellen α -GOGAT haben sich verschiedene eukaryotische Linien der GOGAT entwickelt (vgl. Abbildung 35). Die heute in Rotalgen vorkommenden α -GOGAT Enzyme stammen möglicherweise aus den Prokaryoten-Endosymbioten. Dafür spricht ihre Stellung im phylogenetischen Baum in einem Cluster mit den GOGAT Enzymen aus α -Proteobakterien.

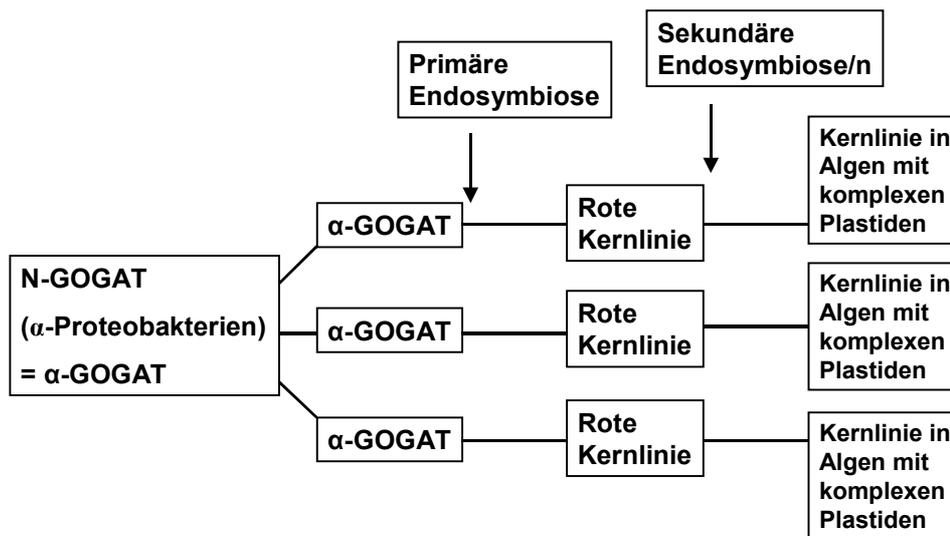


Abbildung 35: Modell zur Evolution der α -GOGAT in Proteobakterien sowie den verschiedenen Gruppen von Algen.

Aus einer ursprünglichen α -GOGAT haben sich (durch Genduplikation) mehrere GOGAT Enzyme in dieser Gruppe von Bakterien entwickelt. Im Zuge der Evolution der Mitochondrien wurden die Mitglieder dieser Multigenfamilie in den Kern von rhodophytischen Algen integriert. Mit der Entwicklung von Rotalgen abgeleiteter sekundärer Plastiden wurden die α -GOGAT Gene in den Kern der jeweiligen Wirtszelle transferriert.

Das in Abbildung 35 dargestellte Modell geht von einer Multigenfamilie als Ursprung dieser Enzyme aus. Bereits während der Evolution der α -Proteobakterien sind mehrere GOGAT Enzyme nebeneinander entstanden, von denen heute in verschiedenen Bakterien dieser Gruppe unterschiedliche GOGAT Enzyme erhalten geblieben sind (vgl. 3.6.2). Während der Endosymbiosereignisse, die zur Etablierung der Mitochondrien geführt haben, wurden von der rhodophytischen Wirtszelle offensichtlich mehrere dieser GOGAT Gene übernommen. Sie wurden dabei in den Kern transferriert. Zumindest auf den vollständig sequenzierten Mitochondriengenomen von *Chondrus crispus* und *P. purpurea* (Leblanc et al., 1995; Burger et al., 1999) kommt kein *gltA*-homologes Gen vor. Zudem erfolgte die PCR aus aufgereinigter Kern-DNA.

Im Zuge der sekundären Endosymbiose(n) wurden die α -GOGAT Gene und Enzyme wiederum von den entsprechenden Wirtszellen übernommen. Bei ihrer Etablierung wurden die Gene möglicherweise auch in Heterokonto-, Crypto- und Haptophyten in das Kerngenom transferriert. Zumindest für die Fragmente *HcartA1* und *HcartA2* konnte bereits gezeigt werden, dass sie aus dem Kerngenom von *H. carterae* stammen (Röttgers, unveröffentlicht).

Außerdem befindet sich offensichtlich kein GOGAT-Gen auf dem Plastom heterokonten Algen (Valentin et al., 1993).

4.11 Modell für die Evolution der N-GOGAT in Eukaryoten

Im großen Cluster der N-GOGAT Enzyme stehen Sequenzen aus verschiedenen Pro- und Eukaryoten, die sich von einer frühen eubakteriellen N-GOGAT ableiten. Dabei könnten auch hier Genduplikationen ursprünglicher N-GOGAT Gene vorgekommen sein. Aus den daraus resultierenden Vertretern dieser Multigenfamilie scheinen sich unterschiedliche Linien entwickelt zu haben.

Eine davon ist die schon beschriebene Linie von N-GOGAT Enzymen in Pilzen, Tieren und höheren Pflanzen. Diesen Enzymen ist eine Fusion der beiden, in Eubakterien getrennten Untereinheiten zu einem 200-240 kDa großen, monomeren Protein gemeinsam, die mit der Fusion der beiden Gene (*gltB* und *gltD*) zum *glsN*-Gen einhergeht. Aufgrund dieser Organisation sowohl in Landpflanzen als auch in Pilzen und Tieren kann für dieses Enzym ein Ursprung in der frühen Eukaryotenentwicklung, wahrscheinlich vor der Evolution der Plastiden, angenommen werden. Innerhalb dieses Unterclusters liegt auch die Sequenz einer N-GOGAT (N1) aus *O. danica*. Möglicherweise hat auch in dieser heterokonten Alge eine entsprechende Fusion der GOGAT Gene stattgefunden.

Zumindest bei Chlorophyten liegt die Aktivität der N-GOGAT im Plastiden. Das Enzym bildet daher offensichtlich ein Beispiel für die Rekrutierung von ursprünglichen Eukaryotenproteinen für den Plastiden während der primären Endosymbiose (Valentin et al., 1993). Genrekrutierung ist auch von anderen ursprünglich eukaryotischen Proteinen bekannt, die im Plastiden lokalisiert sind, wie der Glutamin-Synthetase (Tingey et al., 1988) oder einigen Hitzeschockproteinen (Vierling et al., 1988).

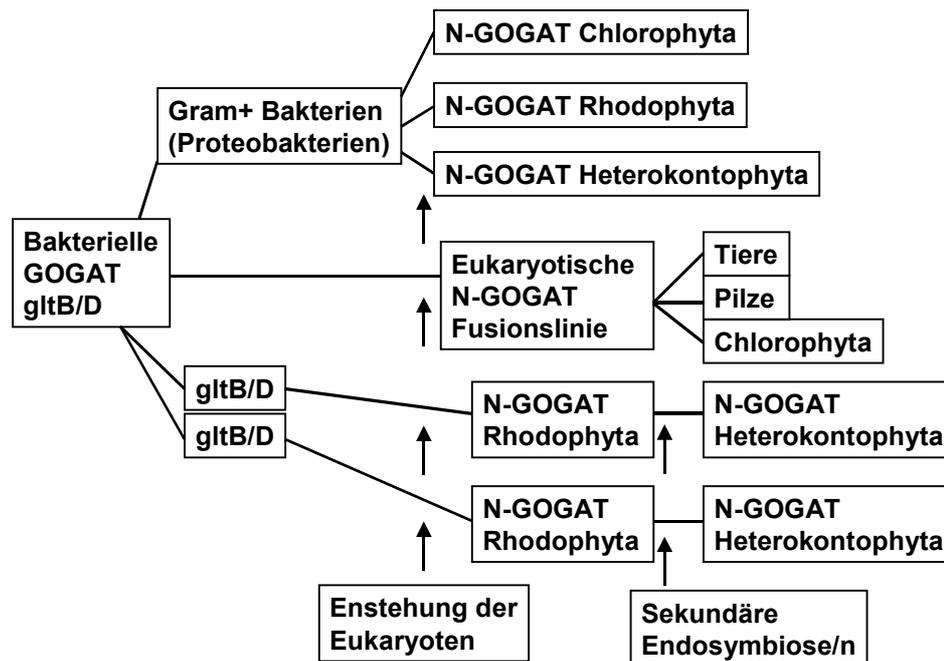


Abbildung 36: Modell zur Evolution verschiedener N-GOGAT Linien

Mittels Genduplikationen sind in Bakterien eine Reihe von N-GOGAT Genen entstanden, von denen sich verschiedene eukaryotische N-GOGATs ableiten. In Pilzen, Tieren und höheren Pflanzen kommt ein fusioniertes monomeres Enzym vor. Ein entsprechendes Enzym könnte in der Heterokontophyte *O. danica* nachgewiesen worden sein. Eher nichtfusionierte Enzyme stellen die beiden Kernlinien in Rhodophyten dar, die via sekundärer Endosymbiose in den Kern von heterokonten Algen transferriert wurden. Daneben wurde in verschiedenen Algen eine weitere Kernlinie nachgewiesen, die mit verschiedenen eubakteriellen Enzymen clustert.

Eine weitere Linie von N-GOGAT Enzymen ist in den Algen *A. acetabulum*, *P. aeruginum* und *O. danica* (N2) nachgewiesen worden. Sie stehen zusammen mit den Sequenzen aus gram+ Bakterien („low GC“ und „high GC“) und verschiedenen Proteobakterien in einem Untercluster des N-GOGAT Baumes. Es könnte sich demnach um eine nicht-fusionierte eukaryotische Kernlinie handeln. Dafür spricht die Tatsache, dass die beiden Gene der bakteriellen GOGAT Enzyme in diesem Teil des Baumes nicht zusammen in einem Operon lokalisiert sind. Der nur für *A. acetabulum* und wenige Ciliaten typische Codongebrauch von UAA und UAG für die Aminosäure Glutamin (Schneider et al., 1989) zeigt, dass zumindest die *A. acetabulum* Sequenz nicht aus einer bakteriellen Verunreinigung stammt. Zudem konnte mittels Southern- bzw. Dot-Blot Experimenten die Herkunft der GOGAT Genfragmente aus *O. danica* und *P.aeruginum* bestätigt werden (Lenz, pers. Mitteilung; Stahlheber, pers. Mitteilung).

Ob ursprünglich in Proteobakterien zwei unterschiedliche N-GOGAT Enzyme nebeneinander vorgekommen sind, oder es sich möglicherweise bei den GOGAT Enzymen aus Proteobakterien, die in diesem Cluster angesiedelt sind, um Produkte eines lateralen Gentransfers handelt, lässt sich anhand der errechneten Bäume schwer beurteilen.

Zwei weitere Linien von GOGAT Enzymen kommen offensichtlich zumindest in Rhodo- und Heterokontophyten vor. Sie könnten sich ebenfalls im Zuge der Evolution der eukaryotischen Wirtszelle aus bakteriellen N-GOGAT Enzymen entwickelt haben. Diese rhodophytischen Kernlinien, repräsentiert durch die N-GOGAT Enzyme *C. caldarium* N1 und N2, wurden während der Etablierung des sekundären Plastiden wahrscheinlich in den Kern der heterokonten Wirtszelle transferriert. Dafür sprechen die N-GOGAT Gene aus den heterokonten Algen *H. carterae* und *E. siliculosus*, deren Aminosäuresequenz im phylogenetischen Baum mit den Sequenzen aus Rhodophyten clustern.

Demnach könnten in Heterokontophyten sowohl N-GOGAT Enzyme vorkommen, die aus der Wirtszelle stammen und die in *O. danica* gefunden wurden, als auch solche, die ursprünglich aus dem Kern des aufgenommenen Endosymbionten stammen.

Für die Sequenzen aus den Eubakterien *R. etli* und *D. radiodurans*, die abseits der übrigen bakteriellen GOGAT Enzyme im N-GOGAT Cluster stehen, könnte ein lateraler Gentransfer diskutiert werden.

4.12 GOGAT-Evolution und Plastidenevolution

Es gilt mittlerweile als gut abgesichert, dass sich die Evolutionslinien der Chloro- und Rhodophyta bzw. ihrer Plastiden bereits sehr früh voneinander getrennt haben (Valentin et al., 1992). Dies spiegelt sich auch in der Phylogenie der GOGAT wieder. Sowohl in Bezug auf die Fd- als auch auf die N-GOGAT lassen sich Rhodo- und Chlorophyta phylogenetisch klar voneinander trennen. Die in Rhodophyten gefundene α -GOGAT scheint in Chlorophyten nicht vorzukommen.

Es ist bisher nicht endgültig geklärt, ob ein einziges Ereignis zu einem Urplastiden geführt hat, aus dem sich dann die Plastiden der unterschiedlichen Algenklassen entwickelt haben, oder ob jeder der verschiedenen Plastiden der roten und grünen Linie sowie der Glaucocystophyta aus einem eigenen Endosymbioseereignis hervorgegangen ist. Auch verschiedene phylogenetische Bäume haben diese Frage noch nicht endgültig klären können. Innerhalb des Fd-GOGAT

Clusters bleibt die Position der cyanobakteriellen GOGAT Enzyme unklar. Eine Lage an der Basis aller plastidären Sequenzen spräche für eine monophyletische, die Positionierung bei den rhodophytischen oder chlorophytischen Enzymen für eine polyphyletische Entwicklung der Plastiden.

Die Annahme, dass die Plastiden von Heterokonto-, Crypto- und Haptophyten durch die sekundäre Endosymbiose einer einfachen Rotalge entstanden sind (Valentin und Zetsche, 1990), wird von den GOGAT-Bäumen unterstützt.

Noch relativ wenig ist über die Einordnung der Cyanellen in Glaucocystophyta bekannt. Sie werden entweder als Schwestergruppe der Rhodoplasten bezeichnet oder aber als ganz eigenständige Gruppe von Plastiden. Die Fd-GOGAT-Phylogenie spricht für eine nahe Verwandtschaft zwischen Cyanellen aus *C. paradoxa* und grünen Plastiden.

4.13 Coenzympezifität und Lokalisation von GOGAT Enzymen in Algen

Bei den Algen, deren N-GOGAT Aktivität bestimmt wurde, wurde diese auch hinsichtlich ihrer Coenzympezifität überprüft. Als bislang einzige Eukaryoten besitzen die Rhodophyten *A. spirographidis* und *P. aeruginosum* offensichtlich eine NADPH-spezifische N-GOGAT Enzymaktivität. Weil NADPH überwiegend im Plastiden vorkommt, könnte auch die N-GOGAT in Rotalgen in diesem Kompartiment lokalisiert sein. Trotz intensiver Bemühungen gelang es bisher leider nicht, aus einer der untersuchten rhodophytischen Algen Plastiden zu isolieren, um die Kompartimentierung der GOGAT Aktivitäten in dieser Algenklasse zu untersuchen. Auch aus der Literatur ist mir kein Fall bekannt, in dem erfolgreich Plastiden aus Rhodophyten isoliert werden konnten. So kann lediglich aufgrund der Coenzympezifität eine Lokalisation im Plastiden vermutet werden. Dabei bleibt zu berücksichtigen, dass sich die in 3.1 gemessene Aktivität aus den Einzelaktivitäten mehrerer Enzyme zusammensetzen könnte.

Obwohl sich wahrscheinlich einige der Pyridinnukleotid-abhängigen GOGAT Enzyme (N- sowie α -GOGAT) in Heterokontophyten phylogenetisch auf die entsprechenden Enzyme in Rhodophyten zurückführen lassen, konnte in *H. carterae* lediglich eine NADH-abhängige Aktivität nachgewiesen werden. Zumindest die Hauptaktivität scheint bei dieser Alge, wie auch bei *O. danica* (Lenz, pers. Mitteilung), im Cytosol zu liegen, was eine NADH-spezifische Aktivität plausibel macht.

Das könnte bedeuten, dass die ursprünglich rhodophytischen GOGAT Enzyme, die an die Gruppe der Heterokontophyta weitergegeben wurden, im Zuge der sekundären Endosymbiose verschiedene Veränderungen durchgemacht haben. Zum einen haben offensichtlich Gentransferereignisse in den Kern der heterokonten Wirtszelle stattgefunden. Darüber hinaus haben die Genprodukte oder zumindest eines der Genprodukte möglicherweise den Wirkungsort Plastid gegen das Cytoplasma getauscht und in Verbindung damit seine Coenzympezifität. Die im Plastiden gemessene Aktivität von 0,09 nkat/mg Protein könnte auf eine Verunreinigung des plastidären mit cytoplasmatischem Protein zurückzuführen sein. Eine andere Erklärung ist, dass eines (oder mehrere) der verschiedenen NADH-abhängigen Enzyme tatsächlich im Plastiden aktiv ist.

Eine Reihe von Studien haben gezeigt, dass auch die N-GOGAT in höheren Pflanzen lediglich NADH, nicht aber NADPH als Reduktionsäquivalent verwendet (Anderson et al., 1989; Chen und Cullimore, 1988; Lea et al., 1990). Während hier die Lokalisation der Fd-GOGAT eindeutig dem Plastiden zugeordnet werden konnte (Wallsgrave et al., 1979; Sommerville und Ogren, 1980; Sakakibara et al., 1991; Becker et al., 1993), war die Lokalisation der N-GOGAT lange Zeit unklar. Einige Autoren gingen von einer cytosolischen Lokalisation des Enzyms aus (Hecht et al., 1988), die meisten Studien weisen eher auf eine Lokalisation des Enzyms in den Plastiden hin (Boland et al., 1982; Shelp und Aktins, 1984; Chen und Cullimore, 1989; Hayakawa et al., 1999). Inzwischen konnten Trepp et al., 1999a mittels Immunogoldmarkierten Antikörpern *in vivo* eindeutig eine Lokalisation der NADH-abhängigen GOGAT in den Amyloplasten der Wurzelknöllchen nachweisen. Außerdem besitzt die N-GOGAT in Alfalfa Wurzelknöllchen eine 101 Aminosäuren lange Präsequenz (Gregerson et al., 1993), die ebenfalls auf eine Zuordnung dieses Isoenzym zu einem Zellkompartiment hindeutet.

Weil aber NADPH und nicht NADH das überwiegende Pyridinnukleotid in Plastiden ist (Lea et al., 1990), stellt sich die Frage, warum z.B. die Amyloplasten der Wurzelknöllchen in der Lage sind, der N-GOGAT NADH als Coenzym zu bieten. Dabei ist die GOGAT aber nicht das einzige Enzym, das offensichtlich im Plastiden lokalisiert, aber auf NADH als Reduktionsäquivalent angewiesen ist. Ähnliche Verhältnisse findet man auch bei der in Wurzelknöllchen vorkommenden Malat-Dehydrogenase (Trepp et al., 1999a). Nach Trepp et al. (1999a) könnte das für diese Enzyme benötigte NADH durch die glykolytische Degradation von Stärke (Plaxton et al., 1996) gewonnen werden. Eine andere Möglichkeit NADH zu gewinnen, ist die Konvertierung von NADPH zu NADH durch eine Transhydrogenase (Bowsher et al., 1992). Bis heute ist ein entsprechendes Enzym in Plastiden aber nicht

nachgewiesen worden (Trepp et al., 1999a). Daher muss noch endgültig geklärt werden, was die Quelle des NADHs ist, das unter anderem eine plastidenlokalisierte NADH-abhängige GOGAT verbraucht (IBID).

Dass die Verhältnisse aus höheren Pflanzen auf die von Plastiden in heterokonten Algen übertragen werden können, ist jedoch nicht wahrscheinlich.

Die Aktivität der Fd-GOGAT scheint bei Heterokontophyten dagegen ebenfalls im Plastiden lokalisiert zu sein und zwar sowohl bei *H. carterae* als auch bei *O. danica* (Lenz, pers. Mitteilung). Da sich die Fd-GOGAT aus *O. danica* phylogenetisch wahrscheinlich nicht auf die rhodophytischen Enzyme zurückführen lässt, könnte das Enzym im Zuge der sekundären Endosymbiose für den Plastiden rekrutiert worden sein.

In der chlorophytischen Alge *A. acetabulum* konnte, wie in höheren Pflanzen, lediglich eine NADH-abhängige N-GOGAT Aktivität nachgewiesen werden. Bisher konnte aber in *A. acetabulum* nur ein *gltB*-homologes Gen nachgewiesen werden, das im phylogenetischen Baum nicht mit den *glsN*-Genen höherer Pflanzen clustert. Das untersuchte *gltB*-homologe Gen könnte einer separaten eukaryotischen Linie angehören, die möglicherweise nur in primitiven Algen erhalten geblieben ist. Da es offensichtlich exprimiert wird, kann ihm wahrscheinlich ein Teil der in 3.1 gemessenen Pyridinnukleotid-abhängigen Aktivität zugeordnet werden. Ob es sich bei dem Enzym um eine im Cytosol lokalisierte Isoform der GOGAT handelt, oder ob *A. acetabulum* wie höhere Pflanzen dazu in der Lage ist, im Plastiden NADH zur Verfügung zu stellen, muss in weiteren Experimenten geklärt werden.

4.14 Temperaturabhängigkeit der N-GOGAT Enzymaktivität

In Extrakten aus höheren Pflanzen werden sowohl die Fd- als auch die N-GOGAT-Aktivität bei 30 °C gemessen (Lea et al., 1990). Da die untersuchten Algen im Meer vorkommen und in diesem Lebensraum solch hohen Temperaturen niemals ausgesetzt sind, lag die Vermutung nahe, dass das Temperaturoptimum der GOGATs in den untersuchten Vertretern von Rhodophyten, Heterokontophyten und chlorophytischen Algen niedriger liegt als bei höheren Pflanzen. Die Messungen wurden deshalb bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. In allen Messungen bei unterschiedlichen Temperaturen lag die maximale Aktivität bei 20 °C. Daraus lässt sich schließen, dass die maximale Aktivität von GOGAT Enzymen bei im Meer vorkommenden Algen bei 20 °C oder sogar etwas niedriger liegt. Diese Beobachtung

widerspricht der im Allgemeinen für Enzymaktivitäten geltenden Q10-Regel. Jedoch konnte auch für andere Enzyme mariner Organismen gezeigt werden, dass deren Temperaturoptimum ihrem natürlichen Lebensraum angepasst ist (Valentin, pers. Mitteilung).

4.15 Regulation der GOGAT-Expression und Enzymaktivität in Pflanzen

Die Regulation der stickstoffassimilierenden Enzyme ist in verschiedener Hinsicht von Bedeutung. Zunächst einmal stellt Stickstoff oft eine limitierende Komponente des pflanzlichen Wachstums dar (Canovas et al., 1998). Der Einbau von Stickstoff in Aminosäuren dient dem Transport dieses Rohstoffes in die ihn verbrauchenden Organe (Temple et al., 1998). Darüber hinaus ist eine Regulation der Assimilation unbedingt erforderlich, um die Akkumulation von toxischen Ammonium-Ionen im pflanzlichen Gewebe zu verhindern. Hier spielt in grünem Gewebe höherer Pflanzen insbesondere die Fd-GOGAT eine Schlüsselrolle (Lea et al., 1992; Coschigano et al., 1998; Temple et al., 1998).

4.16 Regulation der GOGAT in Algen durch Licht

In der vorliegenden Arbeit sollte die Lichtabhängige Regulation von GOGAT Enzymen in Algen untersucht werden. Dabei verhielt sich die N-GOGAT-Expression bei Licht und im Dunkeln in allen Fällen konstitutiv. Entsprechende Ergebnisse sind auch von der Heterokontophyte *O. danica* (Lenz, pers. Mitteilung) und aus verschiedenen Untersuchungen bei höheren Pflanzen bekannt (Lancien et al., 2002).

Auch die α -GOGAT scheint zumindest in *A. spirographidis* nicht Lichtabhängig reguliert zu werden (vgl. 3.10). In *H. carterae* konnten ebenfalls am Tag und in der Nacht gleiche Mengen *HcartA1*- und *HcartA2*-spezifischer mRNA nachgewiesen werden (Röttgers, unveröffentlicht). Demgegenüber war der Wert für die Aktivität der Fd-GOGAT in allen untersuchten Algen bei Licht deutlich erhöht gegenüber dem im Dunkeln gemessenen. Entsprechende Ergebnisse zeigten auch die Untersuchungen in *O. danica* (Lenz, pers. Mitteilung). Lediglich in der chlorophytischen Alge *Chlamydomonas reinhardtii* konnte erstaunlicherweise kein signifikanter Unterschied der Fd-GOGAT-Enzymaktivität zwischen im Dunkeln und im Licht angezogenen Zellen nachgewiesen werden (Marquez et al. 1986).

In höheren Pflanzen findet man in Abwesenheit von Licht ein niedriges Fd-GOGAT-Level (Sakakibara et al., 1991; Zehnacker et al., 1992; Suzuki et al., 1996; Pajuelo et al., 1997), während unter Einfluss von Licht, bei ausreichender Stickstoffzufuhr, eine durchschnittlich zwei- bis vierfach erhöhte Fd-GOGAT Aktivität auftritt (Sakakibara et al., 1991; Zehnacker et al., 1992; Suzuki et al., 1996; Pajuelo et al., 1997; Suzuki und Rothstein, 1997; Suzuki et al., 2001). Dabei geht der Anstieg der Fd-GOGAT Aktivität mit dem Anstieg des steady-state levels der Fd-GOGAT-mRNA und der Neusynthese des Proteins einher (Sakakibara et al., 1991; Zehnacker et al., 1992; Teller et al., 1996; Loulakatis und Roubelakis-Angelakis, 1997; Pajuelo et al., 1997; Suzuki et al., 2001).

Dass in Algen die Regulation der Fd-GOGAT ebenfalls bereits auf Transkriptionsebene erfolgt, konnte mit Hilfe von RT-PCR-Untersuchungen nachgewiesen werden und zwar sowohl bei einem Vertreter aus der rhodophytischen Linie (*A. spirographidis*) als auch bei der grünen Alge *A. acetabulum*. Auch bei *O. danica* konnte eine lichtabhängige Regulation der Fd-GOGAT auf der Ebene der Transkription nachgewiesen werden (Lenz, pers. Mitteilung).

4.17 Photorezeptoren in marinen Algen

In höheren Pflanzen kommen drei Gruppen von Photorezeptoren vor: Phytochrom, das hellrotes und dunkelrotes Licht absorbiert, Cryptochrom, das Blaulicht/UVA-Licht absorbiert sowie UVB-Licht Rezeptoren. Davon ist die Gruppe der Phytochrome molekularbiologisch und biochemisch besonders gut daraufhin untersucht, wie sie Lichtsignale transduzieren und die verschiedenen Antworten auslösen (Mustilli und Bowler, 1997).

Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass die lichtabhängige Regulation der GOGAT wie bei der plastidenlokalisierten Form der Glutamin-Synthetase (Peterman und Goodman, 1991) bei höheren Pflanzen über Phytochrom vermittelt wird (Hecht et al., 1988; Becker et al., 1993; Teller et al., 1996). Phytochrom und Cryptochrom werden allgemein unter anderem eine bedeutende Rolle bei der circadianen Rhythmik zugeschrieben (Sommers et al., 1998; Devlin und Kay, 2000). Zumindest in *M. sativa* (Harmer et al., 2000), *A. thaliana* und *Z. mays* (Suzuki et al., 2001) wird die Fd-GOGAT circadian kontrolliert. In höheren Pflanzen konnte neben der Phytochrom-vermittelten circadianen Steuerung in Mais auch eine direkte Phytochrom-abhängige Regulation der Fd-GOGAT nachgewiesen werden (Suzuki et al., 2001).

Wie bei Landpflanzen ist auch im Meer das Licht ein essentieller Faktor für photosynthetische Organismen. Es stellt die Energiequelle dar und vermittelt außerdem Informationen über die Umgebung. Bisher ist wenig bekannt über die Licht-Antwort in marinen Organismen. So fehlen in vielen Gruppen Informationen darüber, welche Photorezeptoren präsent sind und welche Signalfunktionen sie ausüben (Leblanc et al., 1999). Phytochrom konnte bisher lediglich in grünen Algen eindeutig nachgewiesen werden und ist hier bereits gut untersucht (Hanstein et al., 1991; Lagarias et al., 1995; Winands und Wagner, 1996).

Nach der Entdeckung von Phytochrom auch in Cyanobakterien (Kehoe und Grossman, 1996; Lamparter et al., 1997; Yeh et al., 1997) und dem Nachweis von Rotlicht-vermittelter Genexpression auch in anderen (nicht-chlorophytischen) Algengruppen (Dring, 1988; Lopez-Figuera und Niell, 1988; Rüdiger und Lopez-Figuera, 1992; Leblanc et al., 1999) vermuten Leblanc et al., 1999 Phytochrom sei generell in photosynthetisch aktiven Organismen vorhanden. Dabei soll in der marinen Diatomee *Thalassiosira weissflogii* sowohl hell- als auch dunkelrotes Licht stimulierend auf die Expression des Fucoxanthin-Chlorophyll a/c-Bindeproteins wirken (Leblanc et al., 1999). Daneben soll auch die Behandlung mit Blaulicht positiv auf die *de novo* Synthese des Proteins gewirkt haben (IBID).

Jedoch lassen sich die Verhältnisse in Landpflanzen nicht einfach auf die in marinen Algen übertragen. Ein Phytochrom, das in beiden Linien die gleiche Funktion übernimmt, hätte sich unter Umständen zwei mal unabhängig voneinander entsprechend entwickeln müssen. Zumal die Funktion von Phytochrom in Cyanobakterien bisher nicht geklärt ist.

Daneben bleibt zu berücksichtigen, dass die Lichtverhältnisse an Land und unter Wasser sehr unterschiedlich sind (Kirk, 1992), in beiden Fällen informiert die hellrot/dunkelrot Rate über die Lichtverhältnisse (Smith, 1982). Diese sind im Wasser aber außer vom Tagesverlauf auch von der Wassertiefe abhängig (Chambers und Spence, 1984).

Zumindest in *H. carterae* konnte gezeigt werden, dass die Fd-GOGAT Enzymaktivität der Regulation durch die circadiane Uhr unterliegt. Welche Photorezeptoren damit in Verbindung gebracht werden müssen, ist bisher aber unklar.

Auch in höheren Pflanzen ist die Regulation möglicherweise äußerst komplex organisiert und bislang nicht vollständig verstanden. Für *A. thaliana* sind bereits Modelle erstellt worden, die ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Photorezeptoren bei der Regulation von Schlüsselgenen des pflanzlichen Stoffwechsels wiedergeben (Fuglevand et al., 1996; Wade et

al., 2001). Ein Netzwerk zwischen Phytochrom A, Phytochrom B, Cryptochrom und UV-B-Rezeptor soll hierbei zusammenwirken.

Daneben könnte auch der Anstieg von Kohlenstoffmetaboliten und Ammoniumionen aus der Photorespiration bei höheren Pflanzen zu einer größeren Aktivität der Fd-GOGAT unter Lichteinfluss führen. Ob Photorespiration allerdings auch bei Algen eine Rolle spielt, ist bisher weitgehend ungeklärt.

4.18 Die Aktivität der Fd-GOGAT unterliegt einer circadianen Rhythmik

In *M. sativa* (Harmer et al., 2000) und *Z. mays* (Suzuki et al., 2001) konnte bereits gezeigt werden, dass die Fd-GOGAT nicht nur direkt lichtabhängig sondern auch circadian reguliert wird. Dabei lag das Maximum der Aktivität bei *Z. mays* am morgen, während es in *M. sativa* kurz vor der Mitte der Lichtphase erreicht wurde (IBID).

Am Beispiel von *H. carterae* konnte erstmals gezeigt werden, dass auch die Ferredoxin-abhängige GOGAT einer marinen Alge circadian reguliert wird. Zellen, die zunächst an einen 12stündigen Tag/Nacht-Wechsel adaptiert wurden, zeigten im Dauerlicht weiterhin einen periodischen Anstieg der Aktivität zum Zeitpunkt L6 (Mitte der Lichtphase) gegenüber D6 (Mitte der Dunkelphase), und das sowohl einen als auch zwei Tage nachdem sie dem Dauerlicht ausgesetzt waren.

Am Tag zwei war die Amplitude der Fd-GOGAT Aktivität bei *H. carterae* etwas geringer als am Tag 1 (24 h nach Beginn des Dauerlichtes). Möglicherweise handelt es sich dabei bereits um den Effekt einer abnehmenden Schwingungsamplitude, für die circadian gesteuerte Reaktionen bei dem fehlenden Außenreiz (Tag/Nachtwechsel) bekannt sind. Dabei nimmt das Ausmaß der Reaktion innerhalb von fünf bis sieben Tagen ab, bis schließlich kein Unterschied mehr zwischen der Regulation am Tag und der in der ursprünglichen Nacht zu erkennen ist.

Dass Algenentwicklung sowie verschiedene Stoffwechselwege einer circadianen Rhythmik unterliegen können, konnte bereits an einzelnen Beispielen gezeigt werden (Ronneberg, 1988; Woolum, 1991; Morse et al., 1994; Mittag, 1996; Nikaido und Johnson, 2000).

In *Arabidopsis* konnte mittlerweile eine große Anzahl von Genen ermittelt werden, an deren Regulation circadiane Rhythmik beteiligt ist (Harmer et al., 2000; Schaffer et al., 2001). Darunter fallen neben der Fd-GOGAT auch Gene, deren Produkte in die ersten Schritte der

Stickstoffassimilation involviert sind und außerdem neun Gene, die an der Stickstoffregulation beteiligt sind (Harmer et al., 2000).

4.19 Regulation der GOGAT Enzyme in Algen durch Stickstoffmangel

Sowohl bei der Rhodophyte *P. aeruginum* als auch bei der Heterokontophyte *H. carterae* war kein Einfluss von Stickstoffmangel auf die Aktivität der N-GOGAT festzustellen. In beiden Algen war lediglich eine entwicklungsbedingte Veränderung in der Höhe der NAD(P)H-abhängigen GOGAT-Aktivität nachweisbar. Auch in höheren Pflanzen scheint die N-GOGAT entwicklungsabhängig exprimiert zu werden. Insbesondere während der Knöllchenentwicklung bei Leguminosen konnte ein deutlicher Anstieg der N-GOGAT Aktivität nachgewiesen werden (Chen und Cullimore 1988; Anderson et al., 1989; Gregerson et al., 1993; Vance et al., 1995). Daneben ist in höheren Pflanzen ein Ammonium-induzierter Anstieg der N-GOGAT Enzymaktivität bekannt, die auch durch Okadainsäure (OKA) erzeugt werden kann (Hirose und Yamaha, 1999). Die Transkriptionsrate der NADH-GOGAT steigt innerhalb von 6 Stunden nach NH_4^+ -Gabe auf mehr als das doppelte an (IBID).

Anders als die N-GOGAT Aktivität war die Ferredoxin-abhängige GOGAT Enzymaktivität in *P. aeruginum* offensichtlich auch abhängig vom Stickstoffgehalt des Anzuchtmediums. Unter Stickstoffmangel war eine deutlich erhöhte Aktivität messbar. Vergleichbare Ergebnisse konnten bereits bei der Heterokontophyte *H. carterae* beobachtet werden (Röttgers, unveröffentlicht). Sie stimmten außerdem mit den von Marquez (1986) durchgeführten Experimenten bei *C. reinhardtii* überein. Damit unterscheiden sich die Ergebnisse in Algen aber deutlich von denen höheren Pflanzen. Bei letzteren führte lediglich ein steigendes Angebot an Nitrat zu einer erhöhten Fd-GOGAT Aktivität. In Wurzelgewebe war ein deutlicher Anstieg der Fd-GOGAT Aktivität bei erhöhtem Nitratangebot zu verzeichnen (Redinbaugh und Campbell, 1993). Eine Induktion der Fd-GOGAT Aktivität durch ein höheres externes Stickstoffangebot konnte in grünem Gewebe allerdings nur im Zusammenhang mit Licht festgestellt werden (Sakakibara et al. 1991, Santo und Salema, 1992, Redinbaugh und Campbell, 1993 Mattana et al. 1996, Suzuki et al. 1996 Pajuelo et al 1997).

Über welchen Weg die GOGAT Enzyme bzw. deren Transkription in höheren Pflanzen reguliert werden ist noch unklar. Hirose und Yamaya (1999) halten es für möglich, dass eine Protein Phosphatase an der Regulation beteiligt sein könnte. Als Signalmolekül für eine Akkumulation von N-GOGAT mRNA könnte Glutamin dienen (Hirose und Yamaya 1999).

4.20 Mögliche Aufgaben der verschiedenen GOGAT Isoenzyme in Algen

Über die verschiedenen Aufgaben der GOGAT Isoformen in Algen können bisher nur Vermutungen angestellt werden. Eine spezifische Zuordnung zu unterschiedlichen Geweben fällt im Falle der überwiegend einzelligen und ansonsten fädigen Algen weg. In höheren Pflanzen ist die Fd-GOGAT die Hauptform der GOGAT in grünem Gewebe (Wallsgrrove et al., 1982), in Blättern übernimmt sie 95-97 % der Gesamt-GOGAT Aktivität (Suzuki und Rothstein, 1997). Eine essentielle Rolle kommt ihr bei der Reassimilation des Ammoniums zu, das während der Photorespiration freigesetzt wird (Sechley et al., 1992; Lam et al., 1996). In *A. thaliana* und *Z. mays* konnten zwei unterschiedliche Fd-GOGAT Enzyme nachgewiesen werden, von denen nur eines bei der Photorespiration essentiell ist (Lam et al., 1996). Das andere soll in der Wurzel in die Fixierung von aus dem Boden aufgenommenen Nitrats involviert sein (Lam et al., 1996; Oliveira et al., 1997).

Grundsätzlich konnte auch in den untersuchten Algen eine lichtabhängige Expression der Ferredoxin-abhängigen GOGAT nachgewiesen werden, so dass davon ausgegangen werden kann, dass dieses Isoenzym in die entweder direkt oder indirekt lichtabhängige Assimilation von Stickstoff eingebunden ist. Bisher ist es unklar, ob bei Algen Photorespiration vorkommt. Im Falle von Photorespiration wäre eine lichtabhängig regulierte GOGAT unbedingt erforderlich. Aber unabhängig davon entstehen unter Einfluss von Licht in der CO₂-Fixierung der Photosynthese größere Mengen von C₃-Körpern, die in Form von 2-Oxoglutarat in die Synthese von stickstoffhaltigen Verbindungen wie Aminosäuren eingehen. Zusätzlich werden bei der Assimilation von Stickstoff Reduktionsäquivalente in Form von Ferredoxin oder NAD(P)H sowie ATP gebraucht, die durch den lichtinduzierten Elektronentransfer der Photosynthese gebildet werden. Eine Abstimmung von Photosyntheserate und Stickstoffassimilation ist also auf jeden Fall sinnvoll.

Für die N-GOGAT Aktivität zumindest in *P.aeruginosum* und *H. carterae* konnte gezeigt werden, dass sich ihre Aktivität mit der Entwicklung der Zellen verändert. Wenigstens eines der NAD(P)H-abhängigen Isoenzyme könnte also die Aufgabe haben, eine Grundversorgung der Zellen mit Stickstoff zu gewährleisten. In höheren Pflanzen ist die NADH-abhängige Isoform der GOGAT für die Versorgung mit Stickstoff unter nicht-photorespiratorischen Bedingungen verantwortlich (Lancien et al., 2002). In Blättern nur in geringer Konzentration nachweisbar, stellt sie in nichtphotosynthetischem Gewebe wie den Wurzeln das dominierende Enzym dar. Eine Hauptfunktion der N-GOGAT ist es, Glutamin zu remobilisieren, das via Phloem und Xylem aus seneszierendem Gewebe und Wurzeln exportiert wird (Hayakawa et al., 1999).

Eine besondere Rolle kommt ihr in den Wurzelknöllchen der Leguminosen zu (Hayakawa et al., 1999; Trepp et al., 1999a und b).

Daneben scheint der N-GOGAT in höheren Pflanzen eine nicht zu unterschätzende Wirkung während der Entwicklung von Pollen zuzukommen (Schoenbeck et al., 2000). Möglicherweise sind auch in Algen die unterschiedlichen Isoenzyme in verschiedene Entwicklungsprozesse involviert.

In *H. carterae* konnten vier- bis zehnfach höhere GOGAT Enzymaktivitäten nachgewiesen werden als in den übrigen Algen. Ein Zusammenhang zu der regelmässigen Blütenbildung dieser heterokonten Alge ist dabei durchaus denkbar. Es ist wahrscheinlich, dass dafür eine besonders effektive Stickstoffassimilation erforderlich ist. Auch die besonders ausgeprägte Lichtregulation der Fd-GOGAT macht in diesem Zusammenhang Sinn.

4. 21 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Überblick über das Vorkommen und die Regulation von GOGAT Enzymen in verschiedenen Algengruppen geschaffen werden. Dabei konnten einige interessante Übereinstimmungen zu den aus höheren Pflanzen bekannten Verhältnissen aufgezeigt werden.

Durch den Nachweis einer Vielzahl von GOGAT Genen im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nicht nur gezeigt werden, dass der GS/GOGAT-Weg in den unterschiedlichen marinen Algen offensichtlich für die Assimilation von Stickstoff erforderlich ist, sondern darüber hinaus, dass die Glutamat-Synthase in Algen ein komplexes System aus verschiedenen

Isoenzymen bildet. Dieses betrifft insbesondere Algen mit Plastiden der „roten Linie“, dabei scheinen zumindest in *A. spirographidis* auch verschiedene Pyridinnukleotid-abhängige Enzyme nebeneinander transkribiert werden. Eine Funktion über die Stickstoffassimilation hinaus könnte in diesem Zusammenhang diskutiert werden.

Insbesondere dieser Aspekt sollte - z.B. durch die Analyse von Mutanten - in weiteren Arbeiten weiterverfolgt werden.

5. Zusammenfassung

- In der vorliegenden Arbeit konnten Fd- und N-GOGAT Enzymaktivitäten in zwei rhodophytischen, einer heterokonten und einer chlorophytischen Alge nachgewiesen werden. Die N-GOGAT Aktivität war bei den Rhodophyten NADPH-abhängig, bei den anderen Algen NADH-spezifisch. Die Messtemperatur der Enzymaktivitätstests wurde den natürlichen Bedingungen mariner Organismen angepasst.
- Fragmente für die entsprechenden *glsF*- und *gltB*-homologen Gene konnten aus einer Reihe von Algen isoliert werden. Erstmals wurden *gltB*-homologe Gene in Rhodophyten und in chlorophytischen Algen nachgewiesen.
- Zusätzlich dazu wurden in Algen, deren Plastiden der „roten Linie“ angehören, Gene nachgewiesen, die für eine α -GOGAT kodieren (*gltA*). Erstmals wurden entsprechende Fragmente aus einer Haptophyte und einer Cryptophyte isoliert.
- Gerade für die N- und für die α -GOGAT kommen in einigen Vertretern eine Vielzahl von Genen vor.
- Zusammen mit GOGAT-Sequenzen aus anderen Organismen wurden phylogenetische Bäume errechnet, die der Einordnung der ermittelten Sequenzen dienen. Ein umfassendes Modell für die Evolution der unterschiedlichen GOGAT Enzyme konnte anhand dieser Bäume erstellt werden.
- Die Lichtabhängige Regulation von GOGAT Enzymaktivitäten wurde in Rhodo-Heterokonto- und Chlorophyten untersucht. In je einem Vertreter aus der Gruppe der Rotalgen und der Grünalgen wurde diese Regulation mittels RT-PCR auch auf der Ebene der Transkription nachgewiesen.
- Exemplarisch am Beispiel der Heterokontophyte *H. carterae* konnte gezeigt werden, dass die Lichtabhängige Regulation der Fd-GOGAT der circadianen Rhythmik unterliegt.
- In *P. aeruginosum* und *H. carterae* wurde der Einfluss von Stickstoffmangelbedingungen auf die spezifischen Enzymaktivitäten untersucht.
- In *H. carterae* wurde die Aktivität von Fd- und N-GOGAT den Zellkompartimenten Cytoplasma und Plastid zugeordnet. Während die Fd-GOGAT im Plastiden aktiv ist, scheint die Hauptaktivität der N-GOGAT im Cytoplasma zu liegen.
- Schließlich konnte gezeigt werden, dass Einfrieren bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ bei der N-GOGAT in *H. carterae* zu einem Aktivitätsverlust von 15% führt.

6. Literaturverzeichnis

- ANDERSON M.P., VANCE C.P., HEICHEL G.H., MILLER S.S. (1989):** Purification and characterization of NADH-glutamate synthase from alfalfa root nodules. *Plant Physiol.* 90: 351-358
- AVILA C., BOTELLA J.R., CANOVAS F.M., NUNIEZ DE CASTRO I.N., VALPUESTA V. (1987):** Different characteristics of the two glutamate synthases in the green leaves of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Physiol.* 85: 1036-1039
- AVILA C., MARQUEZ A.J., PAJUELO P., CANELL M.E., WALLSGROVE R.M., FORDE B.G. (1994):** Cloning and sequence analysis of a cDNA for barley ferredoxin-dependent glutamate synthase and molecular analysis of photorespiratory mutants deficient in the enzyme. *Planta* 189: 475-483
- BECKER T.M., PERROT-RECHENMANN C., SUZUKI A., HIREL B. (1993):** Implications of the phytochrome in light regulation of the tomato gene(s) encoding ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Plant Physiol. Biochem.* 31: 725-729
- BHATTACHARYA D., MEDLIN L. (1995):** The phylogeny of plastids: a review based on comparisons of small-subunit ribosomal RNA coding regions. *J. Phycology* 31: 489-498
- BHATTACHARYA D., MEDLIN L. (1998):** Algal phylogeny and the origin of land plants. *Plant Physiol.* 116: 9-15
- BIRNBOIM H.C., DOLY J. (1979):** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523
- BOLAND M.J., BENNY A.G. (1977):** Enzymes of nitrogen metabolism in legume nodules: purification and properties of NADH-dependent glutamate synthase from lupine nodules. *Eur. J. Biochem.* 79: 355-362
- BOLAND M.J., HANKS J.F., REYNOLDS P.H.S., BLEVINS D.G., TOLBERT N.E., SCHUBERT K.R. (1982):** Subcellular organization of ureide biogenesis from glycolytic intermediates and ammonium in nitrogen fixing soybean nodules. *Planta* 155: 45-51
- BOTELLA J.R., VERBELEN J.P., VALPUESTA V. (1988):** Immunocytolocalization of ferredoxin-GOGAT in cells of green leaves and cotyledones of *Lycopersicon esculentum*. *Plant Physiol.* 87: 255-257
- BOWSHER C.G., BOULTON E.L., ROSE J., NAYAGAM S., EMES M.J. (1992):** Reductant for Glu synthase is generated by the oxidative pentose phosphate pathway in non-photosynthetic root plastids. *Plant J.* 2: 893-898

- BRUMMET S.R. (1991):** Suggestions for DNA sequencing. Editorial comments 17, 22, United states Biochemical corporation
- BULT C.J., WHITE O., OLSEN G.J., ZHOU L., FLEISCHMANN R.D., SUTTON G.G., et al. (1996):** Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, *Methanococcus jannaschii*. Science 273: 1058-1073
- BURGER G., SAINT-LOUIS D., GRAY M.W. , LANG B.F. (1999) :** Complete sequence of the mitochondrial DNA of the red alga *Porphyra purpurea*. Cyanobacterial introns and shared ancestry of red and green algae. Plant Cell. 11(9):1675-1694.
- CANOVAS F. M., CANTON F.R., GARCIA-GUTIERREZ A., GALLARDO F., CRESPILO R. (1998):** Molecular physiology of glutamine and glutamate biosynthesis in developing seedlings of conifers. Physiol. Plantarum. 103 (2): 287-294
- CASTANO I., FLORES N., VALLE F., COVARRUBIAS A.A., BOLIVAR F. (1992):** *gltF*, a member of the *gltBDF* operon of *Escherichia coli*, is involved in nitrogen-regulated gene expression. Mol. Microbiol. 6 (18): 2733-2741
- CASTILLO A., TABOADA H., MENDOZA A., VALDERRAMA B., ENCARNACION S., MORA J. (2000):** Role of GOGAT in carbon and nitrogen partitioning in *Rhizobium etli*. Microbiology 146 (7): 1627-1637
- CEDERGREN R., GRAY M.W., ABEL Y., SANKHOFF D. (1988):** The evolutionary relationships among life forms. J. Mol. Evol. 28: 98-112
- CHAMBERS P.A., SPENCE D.H.N. (1984):** Diurnal changes in the ratio of underwater red to far red light in the relation to aquatic plant photoperiodism. J. Ecol. 72: 495-503
- CHEN F.L., CULLIMORE J.V. (1988):** Two isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris*. Plant Physiol. 88: 1411-1417
- CHEN F.L., CULLIMORE J.V. (1989):** Location of two isoenzymes of NADH-dependent glutamate synthase in root nodules of *Phaseolus vulgaris* L. Planta 179: 441-447
- CHUNG C.T., NIEMELA S.L., MILLER R.H. (1989):** One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. Proc. Natl. Acad. Sci. 86(7): 2172-2175
- CLONTECH Laboratories, Inc. (1991):** RT-PCR. Methods & Applications. Books 1-3
- COGONI C., VALENZUELA L., GONZALEZ-HALPHEN D., OLIVERA H., MACINO G., BALLARIO P. et al. (1995):** *Saccharomyces cerevisiae* has a single glutamate synthase gene coding for a plant-like high molecular weight ploypeptide. J. Bacteriol. 177: 792-798

- COSCHIGANO K.T., MELO-OLIVEIRA R., LIM J., CORUZZI G.M. (1998):** Arabidopsis gls mutants and distinct Fd-GOGAT genes: Implications for photorespiration and primary nitrogen assimilation. *Plant Cell* 10: 741-752
- DAUGBJERG N., ANDERSEN R.A. (1997):** Phylogenetic analyses of the *rbcl* sequences from haptophytes and heterokont algae suggest their chloroplasts are unrelated. *Molecular Biology and Evolution* 14: 1242-1251
- DECKERT G., WARREN P.V., GAASTERLAND T., YOUNG W.G., LENOX A.L., GRAHAM D.E., OVERBEEK R., SNEAD M.A., KELLER M., AUJAY M., HUBER R., FELDMAN R.A., SHORT J.M., OLSEN G.J., SWANSON R.V. (1998):** The complete genome of the hyperthermophilic bacterium *Aquifex aeolicus*. *Nature* 392(6674): 353-358
- DEVLIN P.F., KAY S.A. (2000):** Cryptochromes are required for phytochrome signalling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell* 12: 2499-2509
- DINKTURK H.B., KNAFF D.B. (2000):** The evolution of glutamate synthase. *Mol. Biol. Rep.* 27: 141-148
- DOUGLAS S.E., MURPHY C.A., SPENCER D.F., GRAY M.W. (1991):** Molecular evidence that cryptomonad algae are evolutionary chimeras of two phylogenetically distinct unicellular eukaryotes. *Nature* 350 (6314): 148-151
- DOUGLAS S.E., PENNY S.L.J. (1999):** The plastid genome of the cryptophyte alga, *Guillardia theta*: complete sequence and conserved synteny groups confirm its common ancestry with red algae. *J. Mol. Evol.* 48: 236-244
- DRING M.J. (1988):** Photocontrol development in algae. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 157-174
- DUNFORD D.G., DEANE J.A., TAN S., MC FADDEN G.I., GANTT E., GREEN B.R. (1999):** A phylogenetic assessment of the eukaryotic light-harvesting antenna proteins, with implications for plastid evolution. *J. Mol. Evol.* 48: 59-68
- ESEN A. (1978):** A simple method of quantitative, semiquantitative and qualitative assay of protein. *Anal. Biochem.* 89 (1): 264-273
- FILETICI P., MARTEGANI M.P., VALENZUELA L., GONZALES A., BALLARIO P. (1996):** Sequence of the *glt1* gene from *Saccharomyces cerevisiae* reveals the domain structure of Yeast glutamate synthase. *Yeast* 12: 1359-1366
- FUGLEVAND G., JACKSON J.A., JENKINS G.I. (1996):** UV-B, UV-A and blue light signal transduction pathways interact synergistically to regulate chalcone synthase gene expression in Arabidopsis. *Plant Cell* 8: 2347-2357

- GARCIA-GUTIERREZ A., CANTON F.R., GALLARDO F., SANCHEZ-JIMMINEZ F., CANOVAS F.M. (1995):** Expression of ferredoxin-dependent glutamate synthase in dark-grown pine seedlings. *Plant Mol. Biol.* 27 (1): 115-128
- GIBBS S.P. (1981):** The plastids of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eucaryotic algae. *Annu. NY Acad. Sci.* 361: 193-207
- GILSON P.R., MC FADDEN G.I. (1996):** The miniaturized nuclear genome of eukaryotic endosymbiont contains genes that overlap, genes that are cotranscribed, and the smallest known spliceosomal introns. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 93: 7737-7742
- GIOVANNONI S.J., TURNER S., OLSEN G.J., BARNES S., LANE D.J., PACE N.R. (1988):** Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *J. Bacteriol.* 170: 3584-3592
- GLÖCKNER G., ROSENTHAL A., VALENTIN K. (2000):** The structure and gene repertoire of an ancient red algal plastid genome. *J. Mol. Evol.* 51: 382-390
- GOSS T.J., PEREZ-MATOS A., BENDER R.A. (2000):** Roles of Glutamate Synthase, *gltBD*, and *gltF* in Nitrogen Metabolism of *Escherichia coli* and *Klebsiella aerogenes*. *J. Bacteriol.* 183 (22): 6607-6619
- GOTO S., AKAGAWA T., KOJIMA S., HAYAKAWA T., YAMAYA T. (1998):** Organization and structure of NADH-dependent glutamate synthase from rice roots. *Biochim. Biophys. Acta* 1387 (1-2): 298-308
- GRAY M.W. (1989):** The evolutionary origins of organelles. *Trends in Genetics* 5(9): 294-299
- GRAY M.W., CEDERGREN R., ABEL Y., SANKHOFF D. (1989):** On the evolutionary origin of the plant mitochondrion and its genomes. *Inv. Rev. Cytol.* 141: 173-216
- GRAY M.W. (1992):** The endosymbiont hypothesis revisited. *Int. Rev. Cytol.* 141: 233-357
- GREGERSON R.G., MILLER S.S., TWARY S.N., GANTT J.S., VANCE C.P. (1993):** Molecular characterization of NADH-dependent glutamate synthase from alfalfa nodules. *Plant Cell* 5: 215-226.
- HÄUBER M.M., MÜLLER S.B., SPETH S.B., MAIER U.G. (1994):** How to evolve a complex plastid? A hypothesis. *Bot. Acta* 107: 383-386
- HANSTEIN C., LANGE U., SCHNEIDER-POETSCH H.A., GROLIG F., WAGNER G. (1991):** Detection of actin and localization of phytochrome in the green alga *Mougeotia* by monoclonal antibodies. *Acta Histochem. Suppl.* 41: 223-230
- HARMER S.L., HOGENESCH J.B., STRAUME M., CHANG H.-S., HAN B., ZHU T., WANG X., KREPS J.A., KAY S.A. (2000):** Orchestrated Transcription of Key Pathways in *Arabidopsis* by the Circadian Clock. *Science* 290: 2110-2113

- HAYAKAWA T., HOPKINS L., PEAT L.J., YAMAYA T., TOBIN A.K. (1999):** Quantitative intercellular localization of NADH-dependent glutamate synthase protein in different Types of root cells in rice plants. *Plant Physiol.* 119: 409-416
- HECHT U., ÖLMÜLLER R., SCHMIDT S., MOHR H. (1988):** Action of light, nitrate and ammonium on the levels of NADH- and ferredoxin-dependent glutamate synthase in the cotyledons of mustard seedlings. *Planta* 175: 130-138
- HEICHEL G.H., BARNES D.K., VANCE C.P. (1981):** Nitrogen fixation of alfalfa in the seedling year. *Crop Science* 21: 330-335
- HIGGINS D.G., BLEASBY A.J., FUCHS R. (1992):** Clustal V: Improved Software for Multiple Sequence Alignment. *Comput. Applic. Biosci.* 8: 189-191
- HIRASAWA M., TAMURA G. (1984):** Flavin and iron-sulfur containing ferredoxin-linked glutamate synthase from spinach leaves. *J. Biochem.* 95: 983-994
- HIRATSUKA J., SHIMADA H., WHITTIER R., ISHIBASHI T., SAKAMOTO M., MORI M., KONDO C., HONJI Y., SUN C.R., MENG B.Y., LI Y.Q., KANNO A., NISHIZAWA Y., HIRAI A., SHINOZAKI K., SUGUIRA M. (1989):** The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) chloroplast genome: intermolecular combination between distinct tRNA genes accounts for a major plastid DNA inversion during the evolution of the cereals. *Mol. Gen. Genet.* 217: 185-197
- HIRAYAMA C., SAITO H., KONNO K., SHINBO H. (1998):** Purification and characterization of NADH-dependent glutamate synthase from the silkworm fat body (*Bombyx mori*). *Insect Biochem. and Mol. Biol.* 28 (7): 473-482
- HIROSE N., YAMAYA T. (1999):** Okaid acid mimics nitrogen-stimulated transcription of the NADH-glutamate synthase gene in rice cell cultures. *Plant Physiol.* 121: 805-812
- HOLTON T.A., GRAHAM M.W. (1991):** A simple and efficient method for direct cloning of PCR products using ddT-tailed vectors. *Nucleic Acids Res.* 19: 1156
- IRELAND R.J., LEA P.J. (1999):** The enzymes of glutamine, glutamate, asparagin and aspartate metabolism. In: *Plant Amino acids Biochemistry and Biotechnology* (Singh, Bijay,K.) New York; Marcal Dekker, Inc.: 49-111
- JOHN P. (1987):** *Paracoccus* as a free-living mitochondrion. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 503, 140-150
- JOHN P., Whatley F.R. (1975):** *Paracoccus denitrificans* and the evolutionary origin of the mitochondrion. *Nature* 254, 495-498

- JONGSAREETJIT B., RAHMAN R.N.Z.A., FUJIWARA S., IMANAKA T. (1997):** Gene cloning, sequencing and enzymatic properties of glutamate synthase from the hyperthermophilic archaeon *Pyrococcus sp.* KOD1. *Mol. Gen. Genet.* 254: 635-642
- KALING M. (1983):** In vitro Synthese von Phycobiliproteinen und Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase durch poly (A)-RNA verschiedener Rotalgen. Inaugral Dissertation, Justus Liebig Universität, FRG
- KAWARABAYASI Y., SAWADA M., HORIKAWA H., HAIKAWA Y., HINO Y., YAMAMOTO S., SEKINE M., et al. (1998):** Complete sequence and gene organization of the genome of a hyper-thermophilic archaebacterium, *Pyrococcus horikoshii* OT3. *DNA Res.* 5(2):55-76.
- KEEGSTRA K. (1989):** Transport and routing of proteins into chloroplasts. *Cell* 56: 247-253
- KEHOE D.M., GROSSMAN A.R. (1996):** Similarity of a chromatic adaption sensor of phytochrome and ethylene receptors. *Science* 273: 1409-1412
- KENDALL A.C., WALLSGROVE R.M., HALL N.P., TURNER J.C., LEA P.J. (1986):** Carbon and nitrogen metabolism in barley (*Hordeum vulgare* L.) mutants lacking ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Planta* 168: 316-323
- KEYS A.J., BIRD I.F., CORNELIUS M.J., LEA P.J., WALLSGROVE R.M., MIFLIN B.J. (1978):** The photorespiratory nitrogen cycle. *Nature* 275: 741-743
- KIRK J.T.O. (1992):** The nature and measurement of the light environment in the ocean. In: P.G. Falkowski and A.D. Woodhead (Eds.), *Primary Productivity and Biogeochemical Cycles in the Sea*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, Netherlands: 9-29
- KLENK H.P., CLAYTON R.A., TOMB J.F., WHITE O., NELSON K., KETCHUM K.A., et al. (1997):** The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulfate-reducing aechaeon *Archaeoglobus fulgidus*. *Nature* 390: 364-370
- KRÖGER M., KRÖGER-BLOCK A. (1984):** Extension of a flexible computer program for handling DANN sequence data. *Nucleic Acids Res.* 12: 113-123
- LAGARIAS D.M., WU S.H., LAGARIAS J.C. (1995):** Atypical phytochrome gene structure in the green alga *Mesotaenium caldariorum*. *Plant Mol. Biol.* 29: 1127-1142
- LAM H.-M., COSCHIGANO K., OLIVEIRA I., MELO-OLIVEIRA R., CORUZZI G.M. (1996):** The molecular-genetics of nitrogen assimilation into amino acids in higher plants. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* 47: 569-593
- LAMPARTER T., MITTMANN F., GÄRTNER W., BÖRNER T., HARTMANN E., HUGHES J. (1997):** Charcterization of recombinant phytochrome from the cyanobacterium *Synechocystis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 11792-11797

- LANCIEN M., GADAL P., HODHES M. (2000):** Enzyme redundancy and the importance of 2-Oxoglutarate in higher plant ammonium assimilation. *Plant Physiol.* 123: 717-725
- LANCIEN M., MARTIN M., HSIEH M.-H., LEUSTEK T., GOODMAN H., CORUZZI G.M. (2002):** *Arabidopsis* glt1-T mutant defines a role for NADH-GOGAT in the non-photorespiratory ammonium assimilatory pathway. *Plant J.* 29(3): 347-358
- LEA P.J., MIFLIN B.J. (1974):** Alternative route for nitrogen assimilation in higher plants. *Nature* 251: 614-616
- LEA P.J., ROBINSON S.A., STEWARD G.R. (1990):** The enzymology and metabolism of glutamine, glutamate and asparagine, *The Biochemistry of Plants* (B.J. MIFLIN, P.J. LEA, eds.), Academic Press, New York, Vol 16: 121-159
- LEA P.J., BLACKWELL R.D., JOY K.W. (1992):** Ammonia assimilation in higher plants. In: MENGEL K., PILBEAM P.J. (eds) *Nitrogen metabolism of plants*. Clarendon Press, Oxford, 153-156
- LEBLANC C., BOYEN C., RICHARD O., BONNARD G., GRIENENBERGER J.M., KLOAREG B (1995):** Complete sequence of the mitochondrial DNA of the rhodophyte *Chondrus crispus* (Gigartinales). Gene content and genome organization. *J. Mol. Biol.* 250(4):484-95.
- LEBLANC C., FALCIATORE A., WATANABE M., BOWLER C. (1999):** Semi-quantitative RT-PCR analysis of photoregulated gene expression in marine diatoms. *Plant. Mol. Biol.* 40:1031-1044
- LÖFFELHARDT W., BOHNERT H., BRYANT D.A. (1997):** The complete sequence of the *Cyanophora paradoxa* cyanelle genome (Glaucocystophyceae). *Plant Systematics & Evolution* (Suppl. 11): 149-162
- LOPEZ-FIGUEROA F., NIELL F.X. (1988):** Control of chlorophyll a synthesis by phytochrome in the red alga *Corallina elongata* Ellis et Soland. *Rev. Esp. Fisiol.* 44:287-294
- LOULAKAKIS K.A., ROUBELAKIS-ANGELAKIS K.A. (1997):** Molecular cloning and characterization of cDNAs coding for ferredoxin-dependent glutamate synthase from *Vitis vinifera*. *Physiologia Plantarum* 101: 220-228
- LU T., WU Y.Q., SONG H.Y. (1997):** The Nucleotide Sequence of gltD Gene Encoding the Small Subunit of *Rhodobacter sphaeroides* Glutamate Synthase. *Sheng Wu Hua Hsueh Yu Sheng Wu Wu Li Hsueh Pao* 29, 294-302
- LUBBEN T.H., THEG S.M., KEEGSTRA K. (1988):** Transport of proteins into chloroplasts. *Photosyn. Res.* 17: 173-194

- LUDWIG M., GIBBS S.P. (1987):** Are the nucleomorphs of cryptomonads and Chlorarachnion the vestigial nuclei of eukaryotic endosymbionts? *Annals of the New York Academy of Sciences* 503: 198-211
- MAIER U.G. (1992):** The four genomes of the alga *Pyrenomonas salina* (Cryptophyta). *Biosystems*. 28(1-3): 69-73.
- MARGULIS L. (1981):** Symbiosis in cell evolution. W.H. Freeman & Co., San Francisco
- MARQUEZ A.J., GALVAN F., VEGA J.M. (1986):** Utilization of ammonium by mutants and wild types of *Chlamydomonas reinhardtii*. Studies of the glutamate synthase activities. *J. Plant Physiol.* 124: 95-102
- MARQUES S., FLORENCIO F.J., CANDAU P. (1992):** Purification and characterization of the ferredoxin-glutamate synthase from the unicellular cyanobacterium *Synechococcus sp. PCC 6301*. *Eur. J. Biochem.* 206 (1): 69-77
- MARTIN W., MÜLLER M. (1998):** The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* 392: 37-41
- MARTIN W., STÖBE B., GOREMYKIN V., HANSMANN S., HASEGAWA M., KOWALLIK K. (1998):** Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature* 393: 162-165
- MATOH T., TAKAHASHI E., IDA S. (1979):** Glutamate synthase in developing pea cotyledons: occurrence of NADPH-dependent and ferredoxin-dependent enzymes. *Plant Cell Physiol.* 20: 1455-1459
- MATOH T., IDA S., TAKAHASHI E. (1980):** Isolation and characterization of NADH-glutamate synthase from pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Physiol.* 21: 364-378
- MATOH T., TAKAHASHI E. (1981):** Glutamate synthase in greening pea shoots. *Plant Cell Physiol.* 22: 727-731
- MATTANA M., COGAGGIO L., BRAMBILLA L., BERTANI A., REGGIANI R. (1996):** Nitrate assimilation during the anaerobic germination of rice: expression of the ferredoxin-dependent glutamate synthase. *Planta* 199: 74-78
- MEDLIN L., KOOISTRA W.H.C.F., POTTER D., SAUNDERS G.W., ANDERS R.A. (1997):** Phylogenetic relationship of the „golden“ algae (haptophytes, heterokont chromophytes) and their plastids. In BHATTACHARIA D (ed.), *Origins of algae and their plastids*, Springer Verlag, Wien, Austria: 187-220
- MIFLIN B.J., LEA P.J. (1975):** Glutamine and asparagine as nitrogen donors for reductant-dependent glutamate synthesis in pea roots. *Biochem. J.* 149: 403-409

- MITTAG M. (1996):** Conserved circadian elements in phylogenetically diverse algae. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 14401-14404
- MORA J. (1990):** Glutamine metabolism and cycling in *Neurospora crassa*. Microbiol Rev. 54 (3): 293-304
- MOORE S., STEIN W.H. (1963):** Chromatographic determination of aminoacids by the use of automatic recording equipment. Methods in Encymology 4: 819-831
- MORSE D., HASTINGS J.W., RONNEBERG T. (1994):** Different phase responses of the two circadian oscillators in Goyaulax. J. Biol. Rhythmus 9 (3-4): 263-274
- MULLIS K.B., FALOONA F.A. (1987):** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. Methods Enzymol. 155: 335-350
- MURILLO E., SANCHEZ DE JIMENEZ E. (1985):** Glutamate synthase in greening callus of *Bouvardia ternifolia* Schlecht. Planta 163: 448-452
- MUSTILLI A.C., BOWLER J. (1997):** Tuning in to the signals controlling photoregulated gene expression in plants. EMBO J. 16: 5801-5806
- NAVARRO F., CHAVEZ S., CANDAU P., FLORENCIO F.J. (1995):** Existence of two ferredoxin-glutamate synthases in the cyanobacterium *Synechocystis sp.* PCC 6803. Isolation and insertional inactivation of *gltB* and *gltS* genes. Plant Mol. Biol. 27: 753-767
- NIKAIDO S.S., JOHNSON C.H. (2000):** Daily and circadian variation in survival from ultraviolet radiation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Photochem. Photobiol. 71: 758-765
- OAKS A., SIVASANKAR S., GOODFELLOW V.J. (1988):** The specificity of methionine sulfoximine and azaserine inhibition in plant tissues. Phytochemistry 49 (2):355-357
- OHYAMA K., FUKUZAWA H., KOHCHI T., SHIRAI H., SANO T., SANO S., UMESONO K., SHIKI Y., TAKEUCHI M., CHANG Z., AOTA S., INOKUCHI H., OZEKI H. (1986):** Chloroplast genome organisation deduced from complete sequence of liverwort *Marchantia polymorpha* chloroplast DNA. Nature 332: 572-574
- OLIVEIRA I.C., LAM H.-M., COSCHIGANO K., MELO-OLIVEIRA R., CORUZZI G. (1997):** Molecular-genetic dissection of ammonium assimilation in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. Biochem. 35 (3): 185-198
- OLIVEIRA I.C., BHATTACHARIA D. (2000):** Phylogeny of the Bangiophycidae (Rhodophyta) and the secondary endosymbiotic origin of algal plastids. Am. J. Bot. 87: 482-292
- OLIVER G., GOSSET G., SÁNCHEZ-PESCADOR R., LOZOYA A.E., KU L.M., FLORES N., BECERRIL B., VALLE F., BOLIVAR F. (1987):** Determination of the

nucleotide sequence for the glutamate synthase structural genes of *Escherichia coli* K-12. Gene 60: 1-11

OLSEN G.J., WOESE C.R., OVERBEEK R. (1994): The winds of (evolutionary) change: breathing new life into microbiology. J. Bacteriol. 176(1):1-6

PAJUELO P., PAJUELO E., FORDE B.G., MARQUEZ A.J. (1997): Regulation of the expression of ferredoxin-glutamate synthase in barley. Planta 203: 517-525

PALMER J.D. (1991): Plastid chromosomes. In: BOGORAD L., VASIL I.K. (eds.) The molecular biology of plastids. Academic Press, New York, 5-53

PALMER J.D., DELWICHE C.F. (1996): Second-hand chloroplasts and the case of the disappearing nucleus. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 93: 7432-7435

PELANDA R., VANONI M.A., PEREGO M., PIUBELLI L., GALIZZI A., CURTI B., ZANETTI G. (1993): Glutamate synthase genes of the diazotroph *Azospirillum brasilense*. J. Biol. Chem. 286: 3099-3106

PERYSINAKIS A., KINGHORN J.R., DRAINAS C. (1995): Glutamine synthetase/glutamate synthase ammonium-assimilating pathway in *Schizosaccharomyces pombe*. Curr. Microbiol. 30: 367-372

PETERMAN T.K., GOODMAN H.M. (1991): The glutamine synthase family of *Arabidopsis thaliana*: lightregulation and different expression in leaves, roots and seeds. Mol. Gen. Genet. 230: 145-154

PLAXTON W.C. (1996): The organization and regulation of plant glycolysis. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 47: 185-214

REDINBAUGH M.G., CAMPBELL W.H. (1993): Glutamine synthase and ferredoxin-dependent glutamate synthase expression in the maize (*Zea mays*) root primary response to nitrate. Plant Physiol. 101: 1249-1255

REITH M., MUNHOLLAND J. (1993): A high resolution gene map of the chloroplast genome of the red algae *Porphyra purpurea*. Plant Cell 5: 465-475

RÖTTGERS S. (1996): Neue Erkenntnisse zur Evolution und Funktion der Glutamate-Synthase in Algen. Diplomarbeit, Institut für Pflanzenphysiologie, Justus-Liebig-Universität Gießen

RONNEBERG T., NAKAMURA H., HASTINGS J.W. (1988): Creatine accelerates the circadian clock in a unicellular alga. Nature 334 (6181): 432-434

RÜDIGER W., LÓPEZ-FIGUEROA F. (1992): Photoreceptors in algae. Photochem. Photobiol. 55: 949-954

- SAKAKIBARA H., WATANABE M., HASE T., SUGIYAMA T. (1991):** Molecular cloning and characterization of complementary DNA encoding for ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize leaf. *J. Biol. Chem.* 266: 2028-2035
- SANGER F., NICKLEN S., COULSON A.R. (1977):** DNA Sequencing with chain termination inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 74: 5463
- SANTO L., SALEMA R. (1992):** Effect of nitrogen nutrition on nitrate and nitrite reductase, glutamine synthase and glutamate dehydrogenase in the CAM plant *Kalanchoe lageritia*. *Engl. Plant Sci.* 84: 145-152
- SCHAFFER R., LANDGRAF J., ACCERBI M., SIMON V., LARSON M., WISMAN E. (2001):** Microarray Analysis of Diurnal and Circadian-Regulated Genes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 13: 113-123
- SCHENK H.E.A. (1977):** Zur osmotischen Beeinflussung der Photosynthese von *Cyanophora paradoxa* Korschikoff durch Saccharose. *Arch. Microbiol.* 114: 261-266
- SCHLÖSSER U.G. (1994):** SAG-Sammlung von Algenkulturen at the University of Göttingen. *Botanica Acta* 107: 111-186
- SCHNEIDER S.U., LEIBLE M.B., YANG X.P. (1989):** Strong homology between the small subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase of two species of *Acetabularia* and the occurrence of unusual codon usage. *Mol. Gen. Genet.* 218(3): 445-452
- SCHÖNBECK M.A., TEMPLE S.J., TREPP G.B., BLUMENTHAL J.M., SAMAC D.A., GANTT J.S., HERNANDEZ G., VANCE C.P. (2000):** Decreased NADH glutamate synthase activity in nodules and flowers of alfalfa (*Medicago sativa* L.) transformed with an antisense glutamate synthase transgen. *J. Exp. Bot.* 51 (342): 29-39
- SCHWEIGER H.G., DEHM P., BERGER S. (1977):** Culture conditions for *Acetabularia*. In: *Progress in Acetabularia Research.* (Hrsg.: C.F.L. Woodcock): 319-330, Academic Press, New York, San Francisco, London.
- SECHLEY K.A., YAMAYA T., OAKS A. (1992):** Compartmentation of nitrogen assimilation in higher plants. *Int. rev. Cyt.* 134: 85-163
- SHELP B.J., AKTINS C.A. (1984):** Subcellular localization of enzymes of ammonia assimilation and asparagines synthesis in root nodules of *Lupinus albus* L. *Plant Sci Lett* 36: 225-230
- SHINOZAKI K., OHME M., TANAKA T., WAKASUGI T., HAYASHIDA M., ZAITA N., CHUNGWONGSE J., OBOKATA J., YAMAGUCHI-SHINOZAKI K., OHOTO C., TOROZAWA K., MENG B.Y., SUGITA M., DENO H., KAMAGASHIRA T., YAMADA**

- K., SUGUIRA M. (1986):** The complete nucleotid sequence of tobacco chloroplast genome: ist gene organisation and expression. EMBO J. 5: 2043-2049
- SHUMAN S. (1994):** Novel approach to molecular cloning and polynucleotid synthesis using vaccinia DNA topoisomerase. J. Biol. Chem. 269: 32678-32684
- SINGER-SAM J., ROBINSON M.O., BELLVE A.R., SIMON M.I., RIGGS A.D. (1990):** Measurement by quantitative PCR of changes in HPRT, PGK-1, PGK-2, APRT, MTase and Zfy gene transcripts during mouse spermatogenesis. Nuc. Acid Res. 18: 1255-1259
- SITTE P. (1993):** Symbiogenetic evolution of complex cells and compley plastids. European Journal of Protistology 29: 131-143
- SMITH A.J.H. (1980):** DNA sequence analysis by primed synthesis. Methods Enzymol. 65: 560-580
- SMITH H. (1982):** Light quality, photoreception, and plant strategy. Annu. Rev. Plant Physiol. 33: 481-518
- SMITH D.R., DOUCETTE-STAMM L.A., CELOUGHERY C., DUBOIS J., ALDREDGE T. BASHIRZADEH R., et al. (1997):** Complete genome sequence of Methanobacterium thermoautotrophicum deltaH: functional analysis and comparative genomics. J. Bacteriol. 179(22):7135-55
- SOMERS D.E., DEVLIN P.F., KAY S.A. (1998):** Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. Science 282: 1488-1490
- SOMMERVILLE C.R., OGREN W.L. (1980):** Inhibition of photosynthesis in *Arabidopsis* mutants lacking leaf glutamate synthase activity. Nature 286: 257-259
- SOMMERVILLE C.R., OGREN W.L. (1982):** Genetic modification of photorespiration. Trends Biochem. Sci. 7: 171-174
- STEINMÜLLER K., KALING M., ZETSCHE K. (1983):** In vitro synthesis of phycobiliproteides and Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by non polyadenylated RNA of *Cyanidium caldarium* and *Porphyridium aerugineum*. Planta 159: 308-313
- SUZUKI A., GADAL P. (1984):** Glutamat synthase: physiochemical and functional properties of different forms in higher plants and other organisms. Physiol. Veg. 22: 461-471
- SUZUKI A., AUDET C., OAKS A. (1987):** Influence of light on the ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize leaves. Plant Physiol. 84: 578-581
- SUZUKI A., BUKKHART W., ROTHSTEIN S. (1996):** Nitrogen effects on the induction of ferredoxin-dependent glutamate synthase and ist mRNA in maize leaves under light. Plant Science 114: 83-91

- SUZUKI A., ROTHSTEIN S. (1997):** Structure and regulation of ferredoxin-dependent glutamate synthase from *Arabidopsis thaliana*. Eur. J. Biochem. 34 (5): 708-718
- SUZUKI A., RIOUAL S., LEMARCHAND S., GODFROY N., ROUX Y., BOUTIN J.P., ROTHSTEIN S. (2001):** Regulation by light and metabolites of ferredoxin-dependent glutamate synthase in maize. Physiol. Plant 112 (4): 524-530
- TAMURA G., OTO M., HIRASAWA M., AKETAGAWA J. (1980):** Isolation and partial characterization of homogeneous glutamate synthase from *Spinacea oleracea*. Plant Sci. Lett. 19: 209-327
- TELLER S., SCHMIDT K.-H., APPENROTH K.-J. (1996):** Ferredoxin-dependent but not NADH-dependent glutamate synthase is regulated by phytochrome and a blue/UV-A light receptor in turions of *Spirodela polyrhiza*. Plant Physiol. Biochem. 34 (5): 713-719
- TEMPLE S.J., VANCE C.P., GANTT J.S. (1998):** Glutamate synthase and nitrogen assimilation. Trends in Plant Science, Reviews 3 (2): 51-56
- TENGS T., DAHLBERG O.J., SHALCHIAN-TABRIZI K., KLAVENESS D., RUDI K., DELWICHE C.F., JAKOBSEN K.S. (2000):** Phylogenetic analyses indicate that the 19'Hexanoyloxy-fucoxanthin-containing dinoflagellates have tertiary plastids of haptophyte origin. Mol. Biol. Evol. 17 (5): 718-729
- TINGEY S.V., TSAI F.Y., EDWARDS J.W., CORUZZI G.M. (1988):** Chloroplast and cytosolic glutamine synthetase are encoded by homologous nuclear genes which are differentially expressed in vivo. J. Biol. Chem. 263: 9651-9657
- TREPP G.B., PLANK D.W., GANTT J.S., VANCE C.P. (1999a):** NADH-glutamate synthase in Alfalfa root nodules. Immunochemical localization. Plant Physiol. 119: 829-837
- TREPP G.B., VAN DE MORTEL M., YOSHIOKA H., MILLER S.S., SAMAC D.A., GANTT J.S., VANCE C.P. (1999b):** NADH-glutamate synthase in Alfalfa root nodules. Genetic regulation and cellular expression. Plant Physiol. 119: 817-828
- TROTTA P.P., PLATZER K.E.B., HASCHEMEYER R.H., MEISTER A. (1974):** Glutamine binding subunits of glutamate synthase and partial reaction catalysed by this glutamine amidotransferase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 71: 4607-4611
- VALENTIN K., ZETSCHKE K. (1990):** Rubisco genes indicate a close phylogenetic relation between plastids of Chromophyta and Rhodophyta. Plant Mol. Biol. 15: 575-584
- VALENTIN K., CATTOLICO R.A., ZETSCHKE K. (1992):** Phylogenetic origin of the plastids. Origins of plastids, Chapman & Hall, New York and London

- VALENTIN K., KOSTRZEWA M., ZETSCHKE K. (1993):** Glutamate synthase is plastid-encoded in a red alga: implications for the evolution of glutamate synthases. *Plant Mol. Biol.* 23: 77-85
- VANCE C.P., MILLER S.S., GREGERSON R.G., SAMAC D.A., ROBINSON D.L., GANTT J.S. (1995):** Alfalfa NADH-dependent glutamate synthase: structure of the gene and importance in symbiotic N₂ fixation. *The Plant J.* 8 (3): 345-358
- VAN DE PEER Y., NEEFS J.-M., DE WACHTER R. (1990):** Small ribosomal subunit RNA sequences, evolutionary relationships among different life forms, and mitochondrial origins. *J. Mol. Evol.* 30: 463-476
- VAN DE PEER Y., DE WACHTER R. (1993): TREECON: A software package for the construction and drawing of evolutionary trees. *Comput. Applic. Biosci.* 9: 177-182**
- VANONI M.A., CURTI B. (1999):** Glutamate synthase: a complex iron-sulfur flavoprotein. *Cell. Mol. Life Sci.* 55: 617-638
- VIERLING E., NAGARO R.T., DEROCHER A.M., HARRIS L. (1988):** A heat shock protein localized to chloroplasts is a member of a eukaryotic superfamily of heat shock proteins. *EMBO J.* 7(3): 575-581
- VOGEL H. (1998):** Untersuchungen zu spezifischen mRNA-Gradienten in der einzelligen, siphonalen Grünalge *Acetabularia acetabulum* (L.) Silva. Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen
- WADE H.K., BIBIKOVA T.N., VALENTINE J., JENKINS G.I. (2001):** Interactions within a network of phytochrome, cryptochrome and UV-B phototransduction pathways regulate chalcone synthase gene expression in Arabidopsis leaf tissue. *The Plant J.* 25: 675-685
- WALLSGROVE R.M., HAREL E., LEA P.J., MIFLIN B.J. (1977):** Studies on glutamate synthase from the leaves of higher plants. *J. Exp. Bot.* 28 : 588-596
- WALLSGROVE R.M., LEA P.J., MIFLIN B.J. (1979):** Distribution of the enzymes of nitrogen assimilation within the pea leaf cell. *Plant Physiol.* 63: 232-236
- WALLSGROVE R.M., LEA P.J., MIFLIN B.J. (1982):** The development of NAD(P)H-dependent and ferredoxin-dependent glutamate synthase in greening barley and pea leaves. *Planta* 154: 473-476
- WHATLEY J.M., WHATLEY F.R. (1981):** Chloroplast evolution. *New Phytol.* 87: 233-247
- WILSON R., AINSCOUGH R., ANDERSON K., BAYNES C., BERKS M. (1994):** 2.2Mb of contiguous nucleotide sequence from chromosome III of *C. elegans*. *Nature* 368: 32-38
- WINANDS A., WAGNER G. (1996):** Phytochrome of the green alga *Mougeotia*: cDNA sequence, autoregulation and phylogenetic position. *Plant Mol. Biol.* 32: 589-597

- WOOLUM J.C. (1991):** A re-examination of the role of the nucleus in generating the circadian rhythm in *Acetabularia*. *J. Biol. Rhythmus* 6 (2): 129-136
- YANG D., Oyaizu Y., Oyaizu H., Olsen G.J., Woese C.R. (1985):** Mitochondrial Origins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82: 4443-4447
- YEH K.-C., WU S.-H., MURPHI J.T., LAGARIAS J.C. (1997):** A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. *Science* 277: 1505-1508
- ZAUNER S., FRAUNHOLZ M., WASTL J., PENNY S., BEATON M., CAVALIER-SMITH T., MAIER U.G., DOUGLAS S. (2000):** Chloroplast protein and centrosomal genes, a tRNA intron, and odd telomeres in an unusually compact eukaryotic genome, the cryptomonad nucleomorph. *PNAS* 97: 200-205
- ZENACKER C., BECKER T.W., SUZUKI A., CARRAYOL E., CABOCHE M., HIREL B. (1992):** Purification and properties of tobacco ferredoxin glutamate synthase, and isolation of corresponding cDNA clones. *Planta* 187: 266-274

7. Anhang

7.1 Genetischer Code

Position I (3'-Ende)	Position II				Position III (5'-Ende)
	U	C	A	G	
U	Phe	Ser	Tyr	Cys	U
	Phe	Ser	Tyr	Cys	C
	Leu	Ser	Stop*	Stop	A
	Leu	Ser	Stop*	Trp	G
G	Leu	Pro	His	Arg	U
	Leu	Pro	His	Arg	C
	Leu	Pro	Gln	Arg	A
	Leu	Pro	Gln	Arg	G
A	Ile	Thr	Asn	Ser	U
	Ile	Thr	Asn	Ser	C
	Ile	Thr	Lys	Arg	A
	Met	Thr	Lys	Arg	G
G	Val	Ala	Asp	Gly	U
	Val	Ala	Asp	Gly	C
	Val	Ala	Glu	Gly	A
	Val	Ala	Glu	Gly	G

Die normalerweise als Stopcodon fungierenden Basentriplets UAA und UAG codieren im Kerngenom von *A. acetabulum* für die Aminosäure Glutamin (Schneider et al., 1989)

Basen: Uracil (U); Cytosin (C); Adenin (A); Guanin (G)

7.2 Darstellung der Aminosäuren im Ein- und Dreibuchstabencode:

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

7.3 Darstellung alternativer Basenkompositionen:

B	C/G/T	R	A/G	Y	C/T
N	A/C/G/T	W	A/T	H	C/A/T
V	A/C/G/T	K	G/T	M	A/C
D	A/G/T	S	G/C		

7.4 Liste der verwendeten Primer

Universelle GOGAT Primer

Name	Sequenz
9+	CCN CCN CCN CAT CAT GAT AT
9+n	CCN CCN CCN CAY CAY GAY AT
8+	AAR CCN GGK GAA GGT GGN CA
15-	CCN CCN GTC ATC TAT TCG CA
15-n	CCR CCN GTC ATR TAY TCR CA

Primer für RT-Reaktion

- Oligo(dt)₁₇-Primer (Gibco BRL)
- Random-Primer (Promega)

Genspezifische Primer

Alge	Gen	Name	Sequenz	Fragmentgröße [bp] (in Kombination mit 15- Primer)
<i>A. spirographidis</i>	<i>glsF</i>	Fd	TCA TGA AAC TTT AGC TAT TCG	2030
<i>A. spirographidis</i>	<i>gltB</i>	N1	CCT GTC CTT CGG AAG CG	820
<i>A. spirographidis</i>	<i>gltA</i>	A2	GGC ATG GGC ACG CTC AG	740
<i>A. spirographidis</i>	<i>gltA</i>	A3	GCC CAC CTG GAT GAT CT	550
<i>A. acetabulum</i>	<i>glsF</i>	Fd1+	ACA GAC GTG CTC GAT ACC	760
<i>A. acetabulum</i>	<i>gltB</i>	N	AGG AGG ATG CAT CGG TA	950

Sequenzierprimer

<i>A. acetabulum</i>	<i>glsF</i>	Fd1-	TAT GCC AAG TGG AAG GG
<i>A. acetabulum</i>	<i>glsF</i>	Fd2+	GCA GAC CTT CTT AAG CA
<i>A. acetabulum</i>	<i>glsF</i>	Fd3+	ATT GCC CAA GAG ACA CA
<i>A. acetabulum</i>	<i>gltB</i>	N1-	AAC GCA CCG AAG CTC TG
<i>A. acetabulum</i>	<i>gltB</i>	N2+	GCT TCG CAG CAA ATT CA
<i>P. aeruginosum</i>	<i>glsF</i>	Fd1+	GTC ATG AAG GAG GAA CT
<i>P. aeruginosum</i>	<i>glsF</i>	Fd2+	TCC ACT TGG GTT TGA TC
<i>P. aeruginosum</i>	<i>glsF</i>	Fd1-	GCC TCC ATT CAT ACC TT
<i>P. aeruginosum</i>	<i>glsF</i>	Fd2-	GGA GGA TTA AGA ACA GG
<i>P. aeruginosum</i>	<i>gltB</i>	N1+	GCA GAT GTA GTG CTG AT
<i>P. aeruginosum</i>	<i>gltB</i>	N1-	TAC AAT CAG TTT GGC GC
<i>P. aeruginosum</i>	<i>gltB</i>	N2+	GTG CGA TAA TAC CTG AT

7.5 Verwendete DNA-Größenstandarts

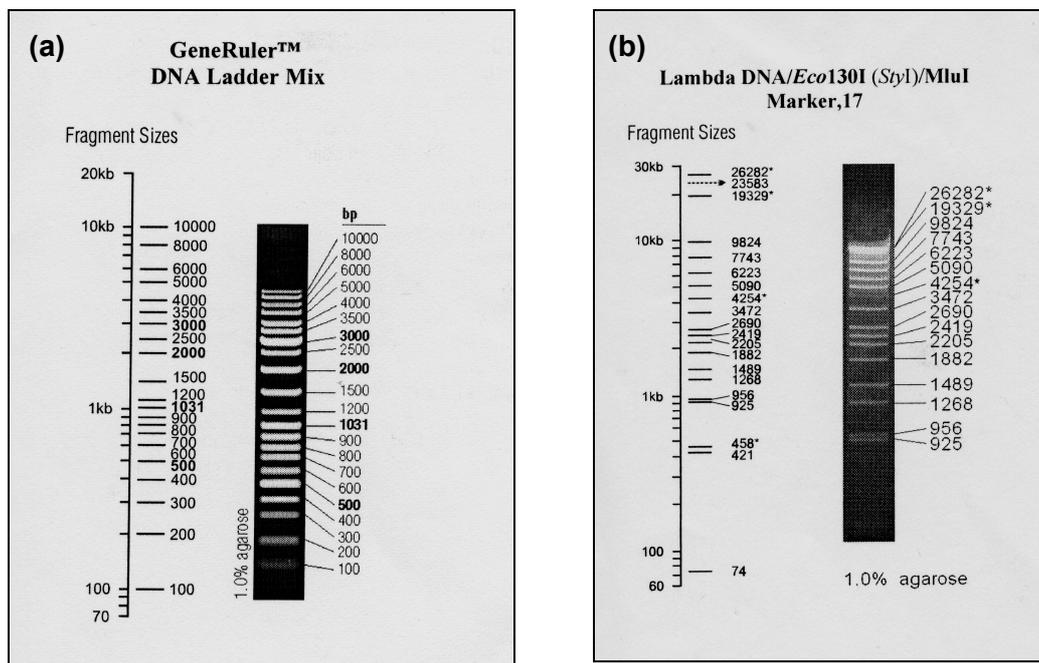


Abbildung 37 a) GeneRuler™ DNA Ladder Mix und 37 b) Lambda DNA/Eco130I/(StyI)MluI Marker17 der Firma MBI Fermentas mit Fragmentgrößen in Basenpaaren.

7.5 Verwendete Vektoren zum Klonieren von PCR Produkten

Abbildung 38: (folgende Seite oben): 3,9 kb großer pCR 2.1-TOPO-Plasmidvektor der Firma Invitrogen mit Restriktionskarte, Multiple Cloning Site (MCS)- Sequenz, Bindungsstellen der Universalprimer sowie Promoterregion der T7-RNA-Polymerase

Abbildung 39: (folgende Seite unten): ca. 2 kb großer pTZ57R-Vektor zur Klonierung von PCR-Produkten mit Restriktionskarte, und MCS-Sequenz (Hersteller: MBI Fermentas)

7.6 DNA- und davon abgeleitete Aminosäuresequenzen der im Rahmen der vorliegenden Arbeit klonierten GOGAT Genfragmente

C. caldarium N-GOGAT N1 (*CcalN1*)

Größe: 1180 bp

```

      Y S I E D L A Q L I F D L K N V N P A A D I S V K L
      CTACTCCATTGAAGACCTGGCACAGTTGATCTTCGATCTGAAGAATGTGAACCCCTGCTGCCGACATTAGCGTCAAGCTT
80  V S E V G V G T V A A G V S K A R A D H V T I S G Y E
      GTGT CAGAAGTGGGTGTGGCACGGTTGCCGCCGGTGTTCCAAAGCGCGTGTGACCATGTCACGATTTCTGGTTATGAAG
      G G T G A S P L T S I K H A G S P W E I G L A E T H Q
161  GCGGAACGGGTGCAAGCCCCTTACCTCCATCAAGCACGCTGGCAGCCCATGGGAAATTGGCCCTCGCTGAAACCCATCAGA
      T L V L N H L R D R I T V Q A D G G L R T G R D V V V
242  CTCTCGTATTGAACCACTTGGCGGACCGGATCACGGTTCAGGCAGATGGCGGATTGCGCACAGGCCGTGATGTGGTTGTAG
      G A L L G A D E F G F S T A P L I A A G C L M M R K C
323  GCGCACTGCTCGGTGCCGATGAATTCGGTTTCTCGACAGCACCCTGATCGCAGCTGGCTGTTTGATGATGCGGAAGTGCC
      H L N T C P V G I A T Q D P V L R K R F V G A P E H V
404  ACCTCAACACCTGCCCTGTGGCATTGCGACCCAGGACCCGGTTCTGCGGAAGCGGTTTGTGGCGCACCCAGAACATGTCA
      I N Y F F F V A E E V R E M M S E L G L P D I N E M I
485  TCAACTATTCTTCTTCTCGTCGACAGGAAGTCCGCGAGATGATGTCGGAACCTCGGGCTACCGGACATCAACGAGATGATCG
      G Q M Q M L D K R R I V D H W K A K G L D F S R L F E
566  GTCAGATGCAGATGCTGGACAAGCGTCGCATCGTGGACCATGGAAAGCGAAGGGCCTCGACTTCTCTCGTCTCTTTGAGA
      K P V A A E G V G I Y Q T K T L D H N I D E I L D R K
647  AACCCTGCTGCTGAAGGCGTCGGTATCTATCAGACGAAGACCCTGGATCACAATATTGACGAGATCCTGGACCGGAAGC
      L I E L S Q P A I K D G K A V S I D L P I K N T D R T
728  TGATCGAGCTTTCACGACCCGCCATCAAGGACGGCAAGGCGGTTTCGATTGATCTGCCAATCAAAAATACAGACCCGACAG
      A G A M L G G E I A K L H G H K G L V D D L V H I K L
809  CCGGTGCCATCTCGCGCGAAATCGCCAAGCTTCATGGGCACAAAGGCTGGTTCGATGACCTGGTCCACATCAAGCTCA
      K G T A G Q S F G A W V T R G V T M E L E G D G N D Y
890  AAGGCACTGCTGGTCAAAGCTTCGCGCCTGGGTACCCGTGGGTAACCATGGAGCTGGAAGGCGACGGCAACGACTATG
      V G K G L S G G R L I V Y P P K E A Q K I V P E E S I
971  TTGGCAAGGGCCTTTCGGTGGCCGGTTGTTGTACTACCACCGAAAGAAGCACAAAAGATCGTCCGGAAGAAAGCATCA
      I V G N T V L Y G A V E G E C Y F R G V A G E R F A V
1052  TTGTCCGCAACACCGTTCTTTACGGTGGCGTTCGAAGGCGAATGCTATTTCCGCGGTGTGGCAGGCGAACGTTTCGCTGTTA
      R N S G A I A V V E G A G D H C
1133  GAAACTCTGGCGCCATTGCCGTTGTTCGAAGGCGCAGGCGATCACTGT

```

C. caldarium N-GOGAT N2 (*CcalN2*)

Größe: 1177 bp

```

      Y S I E D L A Q L I H D L K N V N T G A R I S V K L
      CTACTCGATCGAAGATCTGGCACAGCTGATTCATGATCTGAAGAATGTGAACACCGGTGCGCGGATTTCCGGTCAAGCTG
80  V S E V G V G T V A A G V S K A R A D H L T I S G Y D
      GTGTCCGAAGTGGGCGTGGGACGGTTGCCGACGGCTATCAAAGCGCGCGCGATCATCTGACCATTCCGGCTATGAT
      G G T G A S P L T S L T H A G S P W E I G L A E T Q Q
161  GCGCGCACCGGCGCTTCGCGGCTAACCTCGCTGACCCATGCCGGTTCGCTTGGGAAATCGGTCTTCCGAAAACCCAGCAG
      T L L L N G L R S R I S V Q V D G G L R T G R D V A I
242  ACATGCTGCTCAACCGCCTGCGTTCGAGAATATCTGTGACGGTTGACGGCGGCCTGCGCACGGGCGCGATGTCGCGATT
      G A L L G A D E F G F A T A P L I A A G C I M M R K C
323  GCGCGCTGCTGGCGCGGATGAATTCGGCTTGGCACAGCAGCCGCTGATGCGCGTGGATGATGATGCGCAATGCGCAATGCG
      H L N T C P V G V A T Q N P E L R K K F T G Q P E Y V
404  CATCTCAACACCTGTCCTTGGCGTTCGACGCGAGAATCCGGAACCTGCGCAAGAAATTCACCGGCGAGCCGGAATATGTG
      I N Y F F F V A E E L R Q I M A D M G F R T V E E M V
485  ATCAACTATTCTTCTTCTCGTCGCCGAAGAGTTGCGCCAGATCATGGCGGACATGGGCTTCCGTACAGTCGAGGAGATGGTG
      G R V D R I N M N R A L R H W K A E G V D L S R L L H
566  GGACGGGTGACCGGATCAACATGAACCGGGCGCTGCGCCACTGGAAGGCGGAAGGGTTCGATCTGTCGCGCTGTCGCAC
      N V V L P E G E T L F Q T M T Q D H G L D A A L D K D
647  AATGTTGTGTTGCCGGAAGGTGAAACCGCTGTTTCAGACGATGACCCAGGATCATGGTCTCGATGCGGCCCTCGACAAGGAT
      L I A A A A P A L E H G Q T V K I E R K V K N V N R T
728  CTGATCGCGCTGACGACCTGCACCTGGAGCATGCGCAGCCGCTCAAGATCGAGCGGAAGGTGAAAACCGTCAACCGCACG
      I G A M L S G E V A K M H G H E G L P A N T I Q L V F
809  ATCGGCGGATGCTGTCGCGCAAGTGGCCAAAATGCATGGGCATGAAGGCTGCGCGCAATACCATCCAGCTGGTGTGTT
      E G V A G Q S F G A F L A H G I S A E L I G D A N D Y
890  GAAGGCTGCGCGGACAGAGCTTCGGCGCTTTCGCGCACCGAATCAGCGCAGAACTGATCGGGATGCCAATGACTAT
      V G K G L S G G R V V V K Q P G H V D R N P T E N I I
971  GTCGGAAGGGGCTGTCGCGCGGGCGGTTGGTGTCAAGCAACCGGGCCATGTCGACCGCAATCCGACCGAGAATATCATT
      V G N T V L Y G A V A G E A Y F N G V A G E R F A V R
1052  GTCGGAATACCGTTCTGTATGGCGCGGTGCGCGCGAAGCCTATTTCAACGGTGTGGCCGGGAACGCTTTCGCGTCCG
      N S G A V A V E G T G D H G
1133  AATAGCGGCGGTCGCGTGGTTCGAAGGCGCAGGCGATCACGGC

```

***C. caldarium* α -GOGAT (*CcalA*)**

Größe: 1168 bp

Y S I E N L A Q L I Y D L K Q I N P D C R V C V K L
 CTACAGTATCGAGAATCTGGCGCAGCTGATCTATGACCTGAAGCAGATCAACCCGGACTGCCGGGTCTGTGTGAAACTC
 V A Q S G V G T V A A G V A K A K A D I I L I A G G V
 80 GTCGCTCAATCTGGTGTGGAACCGTCGCCGCCGGGGTTCGCGAAAGCCAAGGCAGACATCATCCTGATCGCGGGTGGTGT
 G G T G A S P Q T S I K Y A G L P W E M G L A E A H Q
 161 GGGGACCGGCGCTCTCCCAGACCAGCATCAAATATCGGGCCTTCCATGGGAAATGGGACTGGCAGAGGCGACCAA
 V L S L N N L R D K V T L R T D G G L R T G R D I V I
 242 GTGCTCAGCCTCAACAACCTTCGTGACAAGTGACCTGCGCACAGATGGCGGTCTCCGGACGGGGCGTGACATTGTCATC
 A A M L G A E E Y G I G T A S L V A M G C I M V R Q C
 323 GCGCCATGCTGGGCGCTGAAGAATATGGCATCGGTACCGCGTCACTGGTTGCGATGGGATGCATCATGGTGGCGCAGTGT
 H S N T C P V G V C T Q D E S L R A K F T G T A D K V
 404 CACTCGAACACCTGCCCGGTAGGTGTGTGACGCAAGATGAGTCGCTCCGCGCCAAGTTCACCGGCACAGCGGACAAGGTC
 I N L M S F I A E D V R R I L A S L G L N S L D E A I
 485 ATCAATTTGATGACCTTTATCGCGGAAGATGTGCCCGGATCCTGGCATCGCTCCGCTCAACTCCCTCGATGAAGCCATT
 G R T D L L A Q V S R G A P H L D D L D L N P L L V Q
 566 GGGCGACTGATTTGCTGGCTCAGGTCTCGCGCGGCACCGCATCTTGATGACCTCGACCTCAACCCGCTCCTGGTCCAG
 V D T A T A I E Y Q P D R R E E V P D T L D A Q I L R
 647 GTCGATACGGGACAGCGATTGAGTATCAGCCAGATCGAGTGAAGAGGTGCCGATACGCTCGATGCACAATCCTGCGC
 D G E P F F A R G E K M Q L T Y E V Q N V Q R S I G A
 728 GATGGCAACCGTTCTTTGCGCGCGGCGAGAAAATGCAACTCACCTATGAAGTGCAGAACGTTTCAGCGCTCCATCGGGCG
 R A S S S I V R K F G E R A L P E G R L H V R L T G S
 809 CGTGCCAGTTCTTCGATTGTCGCAAGTTTGAGAACGGCGTTGCTGAAGGTGCGCTGCATGTCGCTGACAGGAAGC
 A G Q S L G A F S T Q G L L L D V I G D A N D Y V G K
 890 GCCGACAGTCGCTGGTGCCTTCTCAACCCAGGGCCTGTTGTTGGACGTGATCGCGACGCAATGACTATGTCCGCAAA
 G L S G A T I Q L R P P T D A S Y S A G E N T I I G N
 971 GGCCTGTCGGTGCAGCATCCAGCTCCGCCACCAACCGACGCATCTTACTCAGCCGGCGAAAACACGATCATTTGGCAAT
 T C L Y G A T S G H L Y A A G Q A G V R F A V R N S G
 1052 ACTTGCTCTATGGCGCAACCGGTCATCTCTATGCCGCTGGCCAAGCCGGTGTCCGTTTTCGGTCCGTAACCTCAGGC
 A E A V V E G C G A N G
 1133 GCTGAGGCTGTGGTGAAGGCTGCCGTGCCAATGGC

***P. aeruginose* Fd-GOGAT (*PaerFd*)**

Größe: bp

Y S I E D L A Q L I F D L H Q I N P K A P V S V K L
 TTATTTCTATTGAAGACCTAGCTCAATTAATATTTGATTTGCATCAAATTAATCCTAAAGCACCAGTGTGAGTAAAT
 V A E V G I G T I A A G V A K A N A D I I Q I S G H E
 79 AGTGGCAGAAGTTGGTATAGGTACTATTGACGCTGGAGTTGCTAAAGCTAATGCAGATATTATACAAATCTCGGGTCATGA
 G G T G A S P L S S I K H A G S P W E L G L T E V H K
 160 AGGAGGAACCTGGTCTTCCATTAAGCTCAATAAAACATGCAGAAAGTCCATGGGAACCTAGGTTTAAACAGAAGTTCATAA
 V L L E N K L R N R V L L R V D G G L R T G C D I I M
 241 AGTTTTATTAGAGAATAAACTACGAAATAGAGTCTTATTAAAGAGTTGATGGAGATTAAGAACAGGTTGTGATATTATCAT
 A A L M G A E E F G F G T I A M I A T G C I M A R I C
 322 GGCTGCATTAATGGGAGCTGAAGAATTTGGCTTTGGTACAATTTGCAATGATAGCTACTGGATGTATTATGGCTCGCATATG
 H T N S C P V G V A T Q R E E L R A R F P G V P E A L
 403 TCATACGAATAGTTGTCCAGTTGGAGTGGCTACACAACGGGAAGAAATTAAGAGCACHATTCCTGGAGTTCCGAGGCATTA
 V N Y L L F L A E E I R E I L A S I G Y T S L N D I I
 484 GTAAACTATTTATTGTTCTTAGCTGAAGAGATAAGAGATTTTTAGCTTCTATAGGATATACTAGCTTAAATGATATTATT
 G R A D L L V Q N K N L N L T K T K N I N L N S I I N
 565 GGAAGAGCTGATTTACTGGTGCCATTTAAGAAGGCCACGTTTATTTTAAATTTAATTGTTTTGCTTCTATAGTTAAAT
 L P N S K N N R S Y L E H G I V H S N G L V L D D I
 646 GGCTTATCATTTCTTGTCTTCAATAAATCTGTACCCCTAACAAGTATCATTACCAAATCATGATCTACTGCTATAAAAT
 L S S S D V S K A I N E N S I V E K H I R I V N T D R
 727 AGAAGATCACTACAGTCATCCGCTATTTGCTTTTAAAGATAACATCTTTTTGTATAAGCTTAAACAGTTATGCTAGCGTGG
 T V G A R I S G I I A Q K Y G N T K F N G K L K L N F
 808 CATCCTCGTGCATATAGTCCATAATAGCGTGTTTTTATACGATTTGTTTTAAATGGCATTAAATTTAAATTTAAATA
 Y G S A G Q S F G A F N I K G M E I K L I G E A N D Y
 889 CCATCAGCCAGTTTCAAACCGGATTTTATAGTTCCTTACCTTTAATTCGAATAACCTCTCGTTTGTGATACAT
 V S K G M N G G E I V I V P P V D M A K I D Y N N V I
 970 AGCTTCCATACTTACCTCGCTTAAACAATAACATGGAGTCAACTATAACCGTTTGTAGCTGATATTAGTATGATAT
 I G N T C L Y G A S G S L F A L G Q A G E R F C V R
 1051 CCTTTATGTACGGAATACCTCGAAGTCCACCTATAACAACGAGATCCAGTCCGACCCTTTCTAAAACGCATTTCTTTA
 N S G A T A I I E G V G D H A
 1132 AGTCTCGATGACGATAGTATCTTCCACATCCTCTAGTACGAACG

***P.aeruginosa* N-GOGAT (*PaerN*)**

Größe: 1207 bp

```

      Y S I E D L A Q L I F D L K N A N R A A R I N V K L
      TTATTTCGATAGAGGATCTGGCACAATTGATTTTTGATTTGAAGAACGCCAACCGCGCAGCACGCATTAACGTTAAGCTT
      V S K A G V G T I A A G V A K A K A D V V L I S G F D
80  GTTTCAAAAGCAGGCGTAGGTACCATTGCTGCGGGTGTTCGCAAAGCAAAGCAGATGTAGTGTCTCAGGTTTCGCAC
      G G T G A S P I S S I K H A G L P W E L G L A E T H Q
161  GGAGGTACGGCGTCTCTCCGATCAGCTCTATCAAACATGCAGGACTACCTGGGAACTCGGCCTTGCAGAAACACACCAG
      T L V K N K L R S R V V V Q A D G Q M K T G R D I A I
242  AACTGGTAAAAATAAATACGCAGCCGTGTAGTGGTACAGGCCGACGACAAATGAAAACCGGCGCGATATTGCCATC
      A A L L G A E E W G G A T A A L I V E V V I M M R K C
323  GCTGCTTTACTGGTGGGAAGAATGGGGGGTGCCTGCTGCTGCTGATTGTAGAAGTTGTGATCATGATGCGTAAATGT
      H M N T C P V G V A T Q D P E L R K R F A G A Q D P E
404  CATATGAATACCTGTCCGGTTGGTGTGCAACCCAGGATCCTGAATTACGCAAACGCTTCGAGGAGCCCAGGATCCTGAA
      L R K R F A G D P D H V V N F F R F I T E E L R E I M
485  TTACGCAAACGCTTCGAGGAGACCCCGACCATGTGGTGAATTTCTCCGCTTTATCACAGAAGAATTAAGAGAAATCATG
      A E L G F K T I N E M V G Q V D S L E M R E E S P T E
566  GCCGAAGTGGTTTCAAACCATTAACGAAATGGTGGACAGGTAGATTCACTGGAAATGAGAGAAGAATCACCCACTGAA
      I Q T L T C L Q Y Y T K S R N P Y T Q A C I T R S T G
647  ATACAAACCTGACCTGTCTGCAGTATTATACAAAGAGCCGGAATCCTTATACACAGGCCCTGTATAACAGAACACAGGA
      S R V I S E V L D W H Y S K P C A A I E S K Q R V N V
728  TCACGGGTAATCAGTGAAGTGTCTCGACTGGCATTACTCAAAGCCGTGCGCTGCTATTGAAAGCAAGCAACGGGTGAATGTT
      S F P I K N T D R T A G T I L S N E I T K K Y K A D G
809  TCTTTCCAATCAAGAATACAGACAGGACCGCAGGAACCATTTATCAAATGAGATTACCAAAAAATACAAAGCCGATGGC
      L P E D T I H F N F T G T A G Q S F G A F N T K G I T
890  CTGCCGGAAGATACGATCCACTTCAATTTTACAGGTACTGCCGGACAAAGTTTTGGCGCCTTAATACCAAGGCATTACG
      L E L E G D A N D Y F G K G L S G A K L I V Y P S K Q
971  CTTGAGCTGGAAGGAGATGCAATGACTATTTTCGAAAAGGACTGAGCGGCGCCAAACTGATTGTATATCCTTCCAACAG
      A S Y V P E E N I I I G N V A F Y G A T S G E A Y I R
1052  GCAAGCTATGTGCCGGAGAAAACATCATTATCGGTAACGTGGCTTTCTATGGTGCAACATCAGGCGAAGCTTATATCAGA
      G K A G E R F A V R N S G T S V V V E G V G D H G
1133  GGTAAGCCGGCGAACGTTTCGCAGTAAGAACTCAGGAACCCAGTGTGGTGGTAGAAGGTGTAGGCGATCATGGT

```

***A. spirographidis* N-GOGAT N1 (*AspirN1*)**

Größe: 1282 bp

```

      Y S I E D L A Q L I F D P K N V N P S A D I S V K L
      TACTCCATTGAAGATTGGCTCAGCTGATCTTCGACCCGAAGAATGTGAACCCATCAGCAGACATCAGCGTCAAACCTG
      V S E V G V G T V A A G V S K A R A D H V T I S G Y E
79  GTGTCTGAAGTAGGTGTCGGCACCGTGGCAGCTGGCGTATCCAAGGCACGCGGTGACCATGTGACAATTTTCAGGCTATGAA
      G G T G A S P L T S I K H A G S P W E I G L A E T H Q
160  GGCGGCACAGGTGCAAGTCTCTAACCTCCATCAAGCATGCAGGGAGCCCTTGGGAGATCGGCCTTGGCGAGACGCCAG
      T L V M N R L R D R I T V Q A D G G L R T G R D V I V
241  ACCCTCGTCATGAACCGCTGCGGGACCGCATCAGGTTACAGGCCGACGGTGGCCCTCCGCACCGGGCGCGATGTATCGTC
      A A L L G A E F G F S T A P L I A A G C L M M R K C
322  GCAGCCCTCCTGGGCGCTGATGAATTTGGTTTCTCAACGGCCCGCTCATCGCTGCGGGTGCCTGATGATGCGCAAATGT
      H L N T C P V G I A T Q D P V L R K R F V G A P E H V
403  CACCTCAACACCTGCCCGTCGGCATCGCGACCCAGGACCTGTCTTCGGAAGCGTTTTGTGGGTGCCCTGAACATGTG
      I N Y F F F V A E E V R E L M A E L G Y R T F N E M I
484  ATCAACTACTTCTTCTCTAGCCGAAGAAGTTCGCGAGTTGATGGCCGAGCTCGGCTATCGCACCTTCAATGAAATGATC
      G Q M Q M L D K R R A V D H W K A K G L D F S R L F H
565  GGCCAGATGCAGATGCTCGATAAGCGCCGCGCGTGCATCACTGGAAGCAAGGGTCTCGACTTCTCGCGCTCTTCCAC
      K P I A A D G V G T Y R T Q A Q D H N I D E I L D R K
646  AAGCCAATTGCTGCAGACGGTGTAGGCACCTACCGCACGACGGTCAAGGATCACAATATTGATGAGATCCTCGACCCGGAAG
      L I E L A E P A I S D G K A V S I N L P I K N T D R T
727  CTGATCGAATTGGCTGAGCCCGCAATTTCCGATGCAAGCAGTTTCCATCAACCTGCCCATCAAAAAACAGACCCGACCC
      A G A M L G G E I A K R H G H K G L V E D L V H I K L
808  GCTGGTGCATGCTCGGGCGGAGATCGCAAGCGCATGGTCAAAAGACTGGTCAAGACCTCGTTTATATCAAGCTC
      K G T A G Q S F G A W V T R R G V T M E L E G D G N D Y
889  AAGGGCACAGCAGGCCAAGCTTCGGCGCTGGGTACCCGTCACCATGGAAGTGAAGGGCAGCGCAACGACTAT
      V G K G L S G G R L I V Y P P K E A Q Q I V P E E S I
970  GTTGGCAAGGGCTTTTCAGGCGTCTGATTGTCTATCCGCAAAAGAGGCACAGCAAAATCGTGCCAGAAGAAAGCATC
      I V G N T V L Y G A V E G E C Y F R G V A G E R F A V
1051  ATCGTGGCAACACTGTTCTCTATGGAGCTGTGCAAGGGGAATGCTATTTCCGGGGCGTGGCGGGAGAACGCTTCGCTGTT
      R N S G A I A V E G A G D H C
1132  AGAAACTCCGGTGCCATCGCTGTGGTTGAAGGCGCTGGCGACCACTGT

```

***A. spirographidis* N-GOGAT N2 (*AspirN2*)**

Größe: 1177 bp

Y S I E D L A Q L I F D L K N V K P S S D I S V K L
 CTATTCTATCGAAGACCTCGCCCAACTGATCTTCGACCTCAAGAACGTAAAGCCTTCGTCGGATATCAGTGTGAAACTG
 V S E I G V G T V A A G V S K A R A D H V T I A G F E
 80 GTTTCGAAATCGGGTTCGGGACCGTGGCGCGCGGCTTTCGAAGGCCCGCGCCGATCACGTACGATGGAGGGTTGAG
 G G T G A S P L T S I K H A G S P W E I G L A E T Q Q
 161 GGCGGCACCGGTGCCTCTCCGCTGACGTGATCAAAACACGGGCTCGCCCTGGGAAATCGGTCTTGCCGAAACCCAGCAG
 T L V M N D L R G R I A V Q V D G G L R T G R D V A V
 242 ACCCTGGTATGAACGATCTGCGTGGCCGATTGCGGTGACGGTGGACGGCGGGTTGCGCACCGGGCGCGACGTTGCGGTC
 G A L L G A D E F G F A T A P L I A S G C I M M R K C
 323 GGCGCGCTGCTTGGCGCCGACGAGTTCGGCTTTGCGACGGCCCCGCTGATTGCATCGGGCTGCATCATGATGCGCAAATGC
 H L N T C P V G I A T Q D P E L R K K F T G E P E H V
 404 CATCTGAATACCTGCCCGTCCGATCGCGACGCAGGACCCGAACTCAGGAAGAAATTACCCGGCGAGCCGAAACACGTC
 V N Y F F Y V A E L R E L M A E T G F R T V N D M I
 485 GTCAATTATTTCTTCTATGTGGCTGAAGAATTGCGCGAACTGATGGCCGAAACGGGTTTCCGACCGGTCAACGACATGATC
 G Q T D V L D T T K A I D H W K A N G L D F S K L F F
 566 GGCCAGACAGACGTCTGATACACGAAGCGATCGATCACTGGAAGGCGAACGGGCTCGATTTCCAGCAAACCTGTTTTTC
 K P I E A E R V D I H H T G E Q N H P I K D I L D R K
 647 AAACCGATCGAAGCCGAGCGGGTGGATATCCACCATACCGGCGAACAGAACCATCCGATCAAGGACATTCTGGACCGCAAG
 F I E T A K P A L D D G T A V Q A E F P I G N T D R S
 728 TTATTCGAGACCGGAAGCCGCGCTGGATGACGGAACGGCAGTTCAGGCGGAATTTCATCGGCAATACCGACCGGTCT
 A G T M L S G E L A L K Y G H A G L P D D T I W F K L
 809 GCGGCACGATGCTGTCCGGAGAAGTGGCGCTGAAATACGGCCATGCCGACTTCCCGACGATACGATCTGGTTCAAGCTT
 T G V A G Q S F G A W V T Q G V T L E L I G E A N D Y
 890 ACCGGGTTGCGGCAAGTTTCCGGTGCCTGGTCCACCGAGGAGTACGCTCGAACTGATCGGCGAGGCAATGACTAT
 V G K G L S G G K L I V R P D P A S G I N P D E S M I
 971 GTCGGAAGGGCTGTCCGGCGGTAAACTGATCGTTCCGCCGATCCCGCCAGCGGCATCAACCCGGACGAAAGCATGATC
 V G N T V L Y G A V N G E C Y F R G I A G E R F A V R
 1052 GTCGGAATACCGTCTGTATGGCGCGGTGAACGGCAATGTTATTTCCGCGGCATTGCCGGCAACGGTTTCCCGTACGC
 N S G A I A V V E G A G D H G
 1133 AACTCCGGCGCTATTGCGGTTGTGAGGGTGCAGGGTCCGGCGACCATGGG

***A. spirographidis* α -GOGAT A2 (*AspirA2*)**

Größe: 1253 bp

Y S I E D L A Q L I Y D L K Q I N P D C R V C V K L
 TATTCAATCGAAGATCTGGCGCAGCTGATCTATGACCTGAAGCAGATCAACCCGGACTGCCGGTCTGTGTGAAACTG
 V A Q S G V G T V A A G V A K A K A D I I L I A G G V
 79 GTCGCTCAATCTGGTGTGGAAACCGTCCCGCGGGTTGCGAAAGCCAGACATCATCTCGCGGGCGGTGTT
 G G T G A S P Q T S I R Y A G L P W E M G L A E A H Q
 160 GGGGACCGGGCGCTCTCCCGAGACCAGCATCAGATATCGGGCCTTCCATGGGAAATGGGACTGGCAGAGGCGCACCAA
 V L S L N N L R D K V T L R T D G G L R T G R D I V I
 241 GTGCTCAGCCTCAACAACCTTCGTGACAAGTCACTCTGCGCACAGATGGCGGTCTCCGGACGGGGCGCGACATTGTCATC
 A A M L E Y G I G T A S L V A M G C I R S I G A
 322 GCTGCCATGCTGGCGCTGAAGAATATGGCATCGGCACCGCGTCTGCTGTTGCGATGGGATGCATCATGGTTCGGCGAGTGT
 H S N T C P V G V C T Q D E S L R A K F T G T A D K V
 403 CACTCGAACACCTGCCCGTGGTGTGTGTACGCAGGATGATGCTCCCGCCAAAGTTACCCGGCACAGCGGACAAGGTC
 I N L M S F I A E D V R R I L A S L G L N S L D E A I
 484 ATCAATTTGATGAGCTTTATCGCGAAGATGTACGCCGATCCTGGCATCGCTCGGCCTCAACTCTCGATGAAGCCATT
 G R T D L L A Q V S R G A P H L D D L D L N P L L V Q
 565 GGCCGACTGATTTGCTGGCTCAGGTCTCGCGCGGCGCACCGCATCTTGATGACCTCGACCTCAACCCGCTCTGGTCCAG
 V D T A T A I E Y Q P D R R E E V P D T L D A Q I L R
 646 GTCGATACGGCGACAGCGATTGAGTATCAGCCAGATCGAGTGAAGAGTCCCAGATACGCTCGATGCACAAATCTGCGC
 D G E P F F A R G E K M Q L T Y E V Q N V Q R S I G A
 727 GATGGCGAACCGTTCTTTGCCCGCGGAGAAAATGCAACTCACCTATGAAGTGCAGAACGTTTCAGCGCTCCATCGGGGCG
 R A S S S I V R K F G E R A L P E G R L H V R L T G S
 808 CGTCCGAGTCTTCGATTGCCGAAGTTTGGAGAACGGGCTTTGCTGAGGCGCCCTGCATGTCCGCTGACAGGAAGC
 A G G Q S L G A F S T Q G L L D V I G D A N D Y V G K
 889 GCCGACAGTCGCTTGGAGCCTTCTCAACCCAGGCTTGTGTTGACGTGATCGGCGACGCCAATGATGTCGGCAAA
 G L S G A T I Q L R P P T D A S Y S A G E N T I I G N
 970 GGCTGTCTGGCGCAGCATCCAGCTCCGGCCACCAACCGATGCATCTTACTCAGCCGGCGAAAACAGCATCATCGGCAAT
 T C L Y G A T S G H L Y A A G Q A G V R F A V R N S G
 1051 ACTTGCCCTCTATGGCGCAACCGGTCACCTCTATGCCGCTGGCCAAAGCCGGTGTCCGCTTCCGGTCCGTAACCTCAGGC
 A E A V V E G C G A N G
 1132 GCTGAGGCTGTGGTGAAGGCTGCGGTGCTAATGGC

***A. spirographidis* α -GOGAT A3 (*AspirA3*)**

Größe: 1252 bp

```

      Y S I E D L A Q L I Y D L K Q I N P R C K V T V K L
      TATTCCATCGAGGATCTGGCGCAGCTGATTTACGACCTCAAGCAGATCAACCCGCGCTGCAAGGTGACGGTGAACCTG
79  V A S S G V G T I A A G V A K A K A D V I L I S G H N
      GTGGCCTCAAGCGGCTCGGCACGATTGCCGCCGGTGTGGCCAAGGCCAAGGCGGACGTGATTCTGATCTCGGGCCACAAT
160  G G T G A S P A T S I K F A G L P W E M G L T E A H Q
      GGCGGCACTGGTGCATCGCCGGCAGCTCGATCAAATTCGCGGGTCTGCCGTGGGAAATGGGCCTGACCGAGGCGCATCAG
241  V L A M N N L R S R V T L R T D G G L R T G R D I V M
      GTTCTGGCGATGAACAACCTGCGCAGCCGCTGACGCTGCGCACCGATGGCGGGCTTCGCACTGGCCGCGACATTGTCATG
322  A A M M G A E E Y G I G T A A L I A M G C I M V R Q C
      GCGGCAATGATGGGGCCGAGGAATATGGCATTGGCACTGCGGGCGCTGATTGCCATGGGCTGCATCATGGTGGCCAGTGC
403  Q S N T C P V G V C T Q D E A L R G K F T G S A D K V
      CAGTCGAACACCTGCCCGTGGGCGTCTGCACGCAGGACGAGGCCCTACGCGGCAAGTTCACCGGCTCTGCCGACAAGGTA
484  V N L I T F Y A Q E V R E L L A S I G A R S L D E V I
      GTGAACCTGATCACCTTCTACGCGCAGGAAGTGGCGGAAGTGTGGCCAGTATCGGTGCGGGTCTGCTGGATGAGTTCATT
565  G R A D L L S Q V S R G G S A H L D D L D L N P L L I T
      GGCCGGGCGACCTGCTCAGCCAGTTCAGCCGTGGGTCTGCCACCTGGATGATCTCGACCTCAACCCGCTGCTGATCACC
646  V D G S Q N I V Y D R N K P R N A V P D T L D A Q I V
      GTCGATGGGTGCGAGAATCGTCTATGATCGCAACAAACCGCGCAACGCGGTGCCGACACGCTGGACGCTCAGATCGTC
727  K D A H R F L E D G E K M Q L S Y A V Q N T L R T I G
      AAGGATCGCATCGCTTCTTGGAGACGGCGAGAAGATGCAGCTGTCCTACGCCGTGCGAAGACCTTGGCCACCATCGGT
808  T R T S S H I V K N F G M R N A L Q P D H L T V K L E
      ACGCGGACCACTAGCCACATCGTCAAGAATTTGGGATGCGCAATGCGTTGCGAGCCGATCACCTGACTGTGAAGTGGAG
889  G S A G Q S L G A F A A P G L K L E V S G D A N D Y V
      GGGTCTGCCGGGCAATCGCTTGGGCGCTTCCGCGCGCGGGGCTGAAGCTGGAAGTGTCTGGCGATGCCAATGACTATGTC
970  G K G L S G G T V V R P A Q V S P L K A D E N V I I
      GGCAAGGCTGTCTGGTGGCACCGTAGTGGTTCGCGCCGCGCAGGTGAGCCCGCTGAAGGCGGATGAGAACGTCATCATC
1051  G N T V L Y G A T D G Y L F A A G R A G E R F G V R N
      GGTAACACCGTGTCTTATGGCGCAGCCGATGGCTACCTCTTTGCCGCTGGCCGGGCGGGGAGCGGTTCCGCGTGCAGAAC
1132  S G A K V V I E G C G S N G
      TCTGGCCCAAGGTGGTGCATCGAGGGCTGCGGGTCCAACGGT

```

***H. carterae* N-GOGAT (*HcartN*)**

Größe: 1177

```

      Y S I E D L A Q L I H D L K N V N T G A R V S V K L
      CTATTTCGATTGAAGATCTGGCGCAACTGATTCATGATTTGAAGAATGTGAACACTGGTGCACGCGTATCGGTGAAGCTC
80  V S E V G V G T V A A G V S K A R A D H L T I S G Y D
      GTTTCCGAAGTTCGAGTAGGAACGGTTGCTGCGGGCGTTTCAAAGCGCGCGGATCATTGACGATATCTGGTTATGAT
161  G G T G A S P L T S L T H A G S P W E I G L A E T Q Q
      GGCGGTACCGGGCATCTCCCTTGACGTCGTTGACCCATGCCGGTTCGCCATGGGAAATCGGCTTGGCCGAAACCCAGCAA
242  T L L L N G L R S R I S V Q V D G G L R T G R D V A I
      ACCTCCTGCTCAATGGATTGCGTTCAAGAATTTCCGTGCAAGTCGACGGCGCCCTGCGGACCGGTCGTGATGTTGCCATC
323  G A L L G A D E F G F A T A P L I A A G C I M M R K C
      GGTGCGCTATTGGGTGCTGATGAATTTGGCTTTGCAACTGCTCCGCTGATTGCGGCAGGCTGCATCATGATGCGGAAATGT
404  H L N T C P V G V A T Q N S E L R K K F T G Q P E H V
      CACCTCAATACCTGTCCAGTAGGGTTCGCCACGCAAACTCTGAATGCGGAAAAAATTCACCGGACAGCCAGAGCATGTC
485  I N Y F F F V A E E L R Q I M A E M G F R T V E E M V
      ATCAACTATTTCTTCTTCGTCGCCGAAGAATTGCCCCAGATAATGGCCGAATGGGTTTCCGTACCGTTCGAGGAAATGGTC
566  G R V T E L I D M N K A I N H W R A E G I D L S R L L H
      GGACCGTGGAACTGATTGATATGAATAAAGCGATCAATCACTGGAGAGCTGAAGGCATCGACCTTTCGCGTTTGTCTCCAC
647  K V D L P D R E T L H Q T I V Q D H G L E A A L D Q D
      AAGTTGACCTTCCAGATAGAAAACACTGCATCAGACAATAGTTCAAGATCATGGCTGGAGGCGGCATTGGATCAGGAT
728  L I A A A A P S L E K G E A V K I E R K V K N V N R T
      TTGATTGCTGCAGCGGCACCGTCTGAAAAGGGTGGAGGCGGTCAAATCGAACGGAAAGTGAAAACGTCATTCGGACC
809  V G A M L S G E V A K I Y G H K G L P N N T I Q L A F
      GTAGGCGCTATGCTATCGGGTGAAGTGGCGAAGATTTATGGACATAAAGGCTTGGCGAACAACACGATCCAATGGCATT
890  E G V A G Q S F G A F L A H G I T A E L V G D A N D Y
      GAAGGAGTTGCTGGCCAGAGCTTCCGGGCTTTTCGCGCATGGCATAACCGCGGAATGGTCCGAGACGCTAATGACTAT
971  V G K A G L S G G R V I V K Q P S Y V D R N P T E N I I
      GTCGGCAAAGCCCTGTCCGCGGACGAGTGCATGGAAGCAGCCCTTCTATGTGGACCGTAATCCGACAGAAATATCAT
1052  V G N T V L Y G A V A G E A Y F N G V A G E R F A V R
      GTCGGAAATACGGTGTCTTATGGCGCAGTCGCTGGAGAAGCCTATTTCAATGGCGTCCCGGTCGAGCGCTTTGCTGTCCG
1133  N S G A V A V V E G T G D H G
      AATTCGGAGCCGTTGCGGTTGTCGAGGGCACAGGCGATCATGGC

```

***H. carterae* α -GOGAT A3 (*HcartA3*)**

Größe: ca.1200 bp (321 + 300 bp sequenziert)

Y S I E D L A Q L I Y D L K Q I N P G V K V C V K L
 CTACAGTATCGAGGATCTGGCGCAGCTCATCTATGACCTCAAGCAGATCAATCCGGGC59GTCAAAGTATGCGTCAAGC
 V A Q S G V G T I A A G V A K A K A D V I L I S G H N
 80 TGGTGGCGCAATCCGGTGTGGGCACGATTGCCGCCGGTGTGGCCAAGGCCAAGGCAGATGTGATCTGATTCCGGGCATA
 H A A H R W R A A H R A R Y R H G G D D G G R G I W H
 161 ATCACGCTGCGCACCGATGGCGGGCTGCGCACCGGGCGCATATCGTTCATGGCGCGATGATGGGGCCGAGGAATATGGC
 R N R S A D R D G L I M V R Q C Q V E H L S R G V
 242 ATCGGAACCGCAGCGCTGATCGCGATGGGCTGATCATGGTGCCTCAGTGCCAAGTGAACACCTGTCCCGTGGCG
 R V K L T G S A G Q S L G A F A A P G L K I E V S G D
 CGGGTCAAGCTGACGGGAAGTGGGGCAGAGCCTTTGGGCCTTTGCCGCGCCGGCCTCAAGATCGAGGTCTCGGGCGAC
 A N D Y V G K G L S G A T I V V R P P M A S P L V A A
 GCCAATGACTATGTGGGCAAGGCCTGTCCGGGGCAACCATCGTGTACGCCACCAATGGCCAGCCCGCTGGTTGCCGCC
 E N T I I G N T V L Y G A T D G Y L F A A G R A G E R
 GAAAACACGATCGGCAATACCGTGTCTATGGCGCAGCCGATGGCTATCTTTGCCGCGGGCCGTGTGGCGAACGC
 F A V R N S G A K V V I E G C G S N G
 TTTGCCGTGCGCAATTCGGGTGCAAAGGTGGTGTGATCGAGGGCTGCGGCAGCAATGGC

***E. siliculosus* α -GOGAT A1 (*EsilA1*)**

Größe: 1174

Y S I E D L A Q L I Y D L K Q I N P R A R V C V K L
 CTATTCGATCGAAGATCTGGCGCAACTGATCTATGATCTCAAGCAGATCAACCCGCGCGCGGGTCTGCGTCAAGCTG
 V S S A G I G T I A A G V A K A H A D V I L I S G N T
 80 GTCTCTCGGCCGGTATCGGGACGATTGCCCGAGCGTGGCCAAGGCCATGCCGATGTATCCTGATCTCCGGCAATACC
 G G T G A S P Q T S I K F A G T P W E M G L S E A N Q
 161 GCGGCACTGGCGCGTCCGCGCAGACGAGTATCAAATTTGCCGGTACGCCCTGGGAAATGGGACTCAGCGAAGCCAATCAG
 V L T L N G L R H R V K L R T D G G L K T G R D I V I
 242 GTACTCACCTCAACGGCCTGCGCCACCGGGTGAATTTGCGCACCGACGGCGGGCTCAAGACCGGCGGTGACATCGTCATC
 A A I L G A E E F G I G T L S L V A M G C I M V R Q C
 323 GCCCGATTCTGGCGCGGAGGAATTTGGCATCGGCACGCTCAGCCTTGTGCCATGGGCTGTATCATGGTCCGGCAATGC
 H S N T C P V G V C V Q D E K L R E K F T G T P E K V
 404 CACAGCAATACCTGTCCGGTCCGGGTCTGTGTCCAGGATGAAAACTGCGCGAAAAATTCACCGGTACGCCGAAAAGGTG
 I N L M T Y M A E E V R E I L A R L G Y R S L H E I I
 485 ATCAATCTGATGACCTATATGGCCGAAGAAGTGGCGGAGATACTGGCGCGCCTCGGCTATCGCTCGCTGCACGAGATCATC
 G R T E L L R Q V S R G A E H L D D L D L N P I L A K
 566 GGCCGTACCGAGCTGTCCGCCAGGTCAGCCGCGCGCCGAGCATTGGATGATCTCGACCTCAACCCGATTCTGGCCAAG
 V D A P D T A R S F N L P T H R N E V P D S L D A Q M
 647 GTCGACGCGCCGATACCGCGCAGTTTCAACCTGCCAACCCATCGCAACGAAGTCCCGACAGTCTCGATGCGCAGATG
 I V D A Q P V F E R R E K M Q L T Y T V R N T H R A V
 728 ATCGTGCATGCCCGACGATTCGAACGGCGGGAGAAAATGCAGCTGACCTATACGGTGCGCAACACCCACCGCGCGGT
 G T R F S A E V T A K Y G M T N L A E D H V H V R L R
 809 GGCAAGGCTTCTCGGCCGAGGTCACCGCAAAATATGGCATGACAAATCTCGCCGAAGATCATGTCCACGTCCGCTCGCGC
 G S A G Q S L G A F L C Q G I T L E I F G D A N D Y V
 890 GGATCCGCCGGCAATCCCTTGGCGCCTTTCTCTGTGAGGGATCACGCTCGAGATATTCGGCGACGCCAATGACTATGTC
 G K G L C G G K I V V R P M V S S P L T S Q A N T I I
 971 GGCAAGGCTGTGCGGGCGCAAGATTGTGTCGGCCGATGGTTCAGCTCACCGCTCACCTCCAGGCCAATACGATCATC
 G N T V L Y G A T S G Q L Y A A G Q A G E R F A V R N
 1052 GGCAATACCGTGTCTATGGCGGACCTCTGCCAGCTCTATGCCGCGGACAGGCGGGCGAGCGTTTTGCCGTACGCAAT
 S G A D V V V E G C G A N G
 1133 TCCGCGCGGATGTGCTGGTTCGAGGGCTGTGGTGCACCAATGGC

***E. siliculosus* α -GOGAT A2 (*EsilA2*)**

Größe: 1174

Y S I E D L A Q L I Y D L K Q I N P R A R V C V K L
 CTATTTCGATCGAAGATCTGGCGCAACTGATCTATGATCTCAAGCAGATCAACCCGCGCGCGGGTCTGCGTCAAGCTG
 V S S A G I G T I A A A V A K A H A D V I L I S G N T
 80 GTCTCTCGGCGGTATCGGGACGATTGCCGACGGTGGCCAAGGCCCATGCCGATGTCATCTGATCTCCGGCAATACC
 G G T G A S P Q T S I K F A G T P W E M G L S E A N Q
 161 GGCGGCACTGGCGCGTCCGCGCAGACGAGTATCAAATTTGCCGGTACGCCCTGGGAAATGGGACTCAGCGAAGCCAATCAG
 V L T L N G L R H R V K L R T D G G L K T G R D I V I
 242 GTACTCACCTCAACGGCCTGCGCCACCGGGTGAATTTGCGCACCGACGGCGGGCTCAAGACCGGCGGTGACATCGTCATC
 A A I L G A E F G I G T L S L V A M G C I M V R Q C
 323 GCCCGATTCTGGCGCCGAGGAATTTGGCATCGGCACGCTCAGCCTTGTGCCATGGGCTGTATCATGGTCCGGCAATGC
 H S N T C P V G V C V Q D E K L R E K F T G T P E K V
 404 CACAGCAATACCTGTCCGGTCCGGGTCTGTGTCCAGGATGAAAACTGCGCGAAAAATTCACCGGTACGCCGAAAAGGTG
 I N L M T Y M A E E V R E I L A R L G Y R S L H E I I
 485 ATCAATCTGATGACCTATATGGCCGAAGAAGTGC CGGAGATACTGGCGGCCTCGGCTATCGCTCGCTGCACGAGATCATC
 G R T E L L R Q V S R G A E H L D D L D L N P I L A K
 566 GGCCGTACCGAGCTGCTCCGCCAGGTCCAGCGCGCGCCGAGCATTGGATGATCTCGACCTCAACCCGATTCTGGCCAAG
 V D A P D T A R S F N L P T H R N E V P D S L D A Q M
 647 GTCGACGCGCCGATACCGCGCGCAGTTTCAACCTGCCAACCCATCGCAACGAAGTGCCCGACAGTCTCGATGCGCGAGATG
 I A D A Q P V F E R R E K M Q L T Y T V R N T H R A V
 728 ATCCCGATGCCAGCCAGTATTTCGAACGGCGGGAATAATGACAGTACCTATACGGTGGCGCAACCCACCGCGCGGTG
 G T R F S A E V T A K Y G M T N L A E D H V H V R L R
 809 GGCACGCGTTCTCGGCCAGGTCCAGCCAAATATGGCATGACAAATCTCGCCGAAGATCATGTCCACGTCGCCCTGCGC
 G S A G Q S L G A F L C Q G I T L E I F G D A N D Y V
 890 GGATCCGCGGCCAATCCCTTGGCGCCTTTCTCTGTGAGGGATCAGCTCGAGATATTCGGCGACGCCAATGACTATGTC
 G K G L C G K I V V R P M V S S P L T S Q A N T I I
 971 GGCAAGGGTCTGTGCGCGCAAGATTGTCTGTCGGCCGATGGTTCAGCTCACCGCTCACCTCCAGGCCAATACGATCATC
 G N T V L Y G A T S G Q L Y A A G Q A G E R F A V R N
 1052 GGCAATACCGTGTCTATGGCGCGACCTCTGCGCCAGCTCTATGCCCGGGACAGGCGGGCGAGCGTTTTGCCGTACGCAAT
 S G A D V V V E G C G A N G
 1133 TCCGCGCGGATGTCTGTGTCGAGGGCTGTGTTGCAACGGT

***G.theta* α -GOGAT A1 (*GtheA1*)**

Größe: 1173

Y S I E D L A Q L I Y D L K Q I N P R C K V T V K L
 TATTTCGATCGAAGACCTTGGCGAGTTGATCTATGACCTCAAGCAGATCAACCCGCGCTGCAAGGTGACGGTCAAGCTT
 V A S S G V G T I A A G V A K A K A D V I L I S G H N
 79 GTCGCTCTTGGCGTCCGACGATTGGCGCCGTTGGCCAAGGCCGAGCGTATCTGATCTCCGGCAATCCGGCCCAAC
 G G T G A S P A T S I K Y A G L P W E M G L T E A H Q
 160 GGTGGCACCGCGCGTCCGCTGCGACCTCGATCAAATATGCCGGTCTGCCTTGGGAAATGGGTCTGACCGAAGCGCATCAG
 V L S M N K L R D R V T L R T D G G L R T G R D I V M
 241 GTTCTGTGATGAACAAGCTGCGGGATCGTGTGACCTGCGGACCGACGGTGGTCTGCGCACGGGCGGTGACATCGTCATG
 A M L G A E Y G I G T A A L I A M G C I M V R Q C
 322 GCTCGATGTTGGGTGCCGAAGAGTACGGCATCGGGACAGCGCGCTGATCGCGATGGGCTGTATCATGGTCCGTGACGTC
 Q S N T C P V G V C T Q D E S L R A K F T G N A D K V
 403 CAGTCCAACACCTGCCCGTTGGTGTGTGTACGCAGGATGAATCGCTGCGGGCCAAGTTTACTGGCAATGCGGACAAAGT
 V N L I T F Y A Q E V R D V L A S I G A R S L D E V I
 484 GTGAACCTGATCAGTTCTATGCGCAGGAAGTGGCGGAGTGTGGCCCTCTATCGGCGCACGGCTGGACGAAGTGATC
 G R A D L L S Q V S R G S D H L D D L D L N P L L I R
 565 GGCCGGCCGATCTGCTCAGCCAAGTCCAGCGTGGTCCGATCACCTGGACGATCTGGACCTCAACCCGCTTCTGATCCGT
 V D G S D D I V Y D R N K P R N A V P D T L D A E I V
 646 GTCGATGGATCGGACGACATTGTCTACGACCGCAACAAGCCGCGCAATGCGGTGCCGGATACTCTGGATGCCGAAATCGTG
 R D A A R F L E E G E K M Q L S Y A V Q N T H R T V G
 727 CGCGATGCGGCGCGGTTTCTTGGAGGGGTGAGAAGATGCAACTGCTTACGCGGTGACAGAACACCGGACTGTAGGC
 T R T S S H I V R K F G M R N A L Q P N H L T V K L I
 808 ACACGCACCTCGTCCACATCGTTTCGCAAGTTCGGGATGCGCAACGCGCTGACGCCGAACACCTGACGGTCAAACCTCATT
 G S A G Q S L G A F A P G L K L E V S G D A N D Y V
 889 GGTTCTGCGGCCAGTCCGCTGGGCGGTTTTGCCGCTCCGGGCTCAAGCTCGAAGTCTCAGGTGATGCCAACGATATGTC
 G K G L S G G T I V V R P P M M S P L V A A N N T I I
 970 GGCAAGGTTTGTGAGGGGCACGATCGTGGTGCCTCCGCCGATGATGTGCGCTCTGGTGGCGGCCAACAATACGATCATC
 G N T V L Y G A T D G Y L F A A G R A G E R F A V R N
 1051 GGCAACACCGTCTGTATGGGCGACTGACGGCTACCTTTTGGCGGGCCGCGCAGGCGAGCGTTTTGCCGTGCGGAAC
 S G A K V V V E G C G S N G
 1132 TCCGCGCGAAGTGGTGGTTCGAGGGCTGTGTTGCAACGGT

***G.theta* α -GOGAT A2 (*GtheA2*)**

Größe: 1174

Y S I E D L A Q L I Y D L K Q I N P G V K V C V K L
 CTACAGTATCGAGGATCTGGCGCAGCTCATCTATGACCTCAAGCAGATCAATCCGGGCGTCAAAGTATGCGTCAAGCTG
 V A Q S G V G T I A A G V A K A K A D V I L I S G H N
 80 GTGGCGCAATCCGGTGTGGGCACGATTGCCGCGGTGTGGCCAAGGCCAAGGCAGATGTGATCCTGATTTCCGGGCATAAT
 G G T G A S P A T S I K Y A G L P W E M G L T E A H Q
 161 GGTGGCACCGGCGCATCCCCGCAACGAGCATCAAATATGCCGGCTGCCGTGGGAAATGGGCCTGACCGAGGCGCATCAG
 V L S M N N L R E R I T L R T D G G L R T G R D I V M
 242 GTGCTGAGCATGAACAATCTGCGCGAGCGGATCACGCTGCGCACCGATGGCGGGTGGCCACCGGGCGCATATCGTCATG
 A A M M G A E E Y G I G T A A L I A M G C I M V R Q C
 323 GCGCGATGATGGGGCCGAGGAATATGGCATCGGAACCGCAGCGCTGATCGCGATGGGCTGTATCATGGTCCGTCAGTGC
 Q S N T C P V G V C T Q D E A L R A K F T G N A D K V
 404 CAGTCGAACACCTGTCCCCTGGGCGTTTGACGCGAGGACGAGGCGTGGCGCCAAAGTTCACCGGCAATGCCGACAAAGT
 V N L I T F Y A Q E V R E I L A S I G A R S L D E V I
 485 GTGAACCTCATCTTTCTACGCGCAGGAGTGGCGGAAATCCTTGCCCTATCGGTGGCGCAGCCTTGATGAGGTGATC
 G R A D L L T Q V S R G S A H L D D L D L N P M L I T
 566 GGGCGGGCGGATCTACTGACGCGAGGTGTGCGCGGGTGGCGCATCTGGATGATCTTGACCTCAACCCGATGCTGATCACC
 V D G A Q H Q R Y D R L K P R N E V P D T L D A E I V
 647 GTCGATGGGGCGCAGCATCAGCGCTATGACCGGCTCAAGCCGCGCAACGAGGTGCCGATACGCTGGACGCGGAAATCGTG
 R D A A R F L N D G E E K M Q L H Y A V Q N T H R T V G
 728 CGCGATGCCGCGCGTTCTGAAACGATGGTGAGAACGAGCTGCATTATGCGGTGCAGAACACGATCCGACCTGGGGC
 T R V S S H I V R R F G M R N S L Q P D H L T V K L T
 809 ACGGGGTTTCAGCCATATCGTGGCGCAGGTTCCGAATGGCAATAGCCTTCAGCCGATCACCTGACGGTCAAGCTGACG
 G S A G Q S L G A F A A P G L K I E V S G D A N D Y V
 890 GGAAGTGGCGGGCAGAGCCTTGGGGCCTTGGCGCGGGCCTCAAGATCGAGGTCTGGGGCAGCCCAATGACTATGTG
 G K G L S G A T I V V R P P M A S P L V A A E N T I I
 971 GGCAAGGGCCTGTGGGGCAACCATCGTGGTACGCCACCAATGGCCAGCCGCTGGTTGCCGCCGAAACACGATCATC
 G N T V L Y G A T D G Y L F A A G R A G E R F A V R N
 1052 GGCAATACCGTGTCTATGGCGCGACCGATGGCTATCTCTTTGCCGCGGGCCTGTGCGGAACGCTTTGCCGTGCGCAAT
 S G A K V V I E G C G S N G
 1133 TCGGGTCAAAGGTGGTGATCGAGGGCTGCGCGCAGCAATGGC

***C. carterae* α -GOGAT A1 (*CcartA1*)**

Größe: 1174

Y S I E D L A Q L I Y D L K Q I N P R A R V C V K L
 CTATTTCGATCGAAGATCTGGCGCAACTGATCTATGATCTCAAGCAGATCAACCCGCGCGCGGGTCTGCGTCAAGCTG
 V S S A G I G T I A A G V A K A H A D V I L I S G N T
 80 GTCTCCTCGGCCGATCGGGACGATTGCCGCGAGCGTGGCCAAGGCCATGCCGATGTATCCTGATCTCGGCAATACC
 G G T G A S P Q T S I K F A G T P W E M G L S E A N Q
 161 GGCGCACTGGCGGTCGCGCGCAGACGATCAAAATTTGCCGCTACGCCCTGGGAAATGGGACTCAGCGAAGCCAAATCAG
 V L T P N G L R H R V K L R T D G G L K T G R D I V I
 242 GTACTCACCCCAACGCGCTGCGCCACCGGGTGAATTTGCGCACCGCGGGCTCAAAGACCGCGGCTGACATCGTCATC
 A A I L G A E E F G I G T L S L V A M G C I M V R Q C
 323 GCCGCGATTCTGGGCGCGGAGGAATTTGGCATCGGCACGCTCAGCCTTGTGCCATGGGCTGTATCATGGTCCGGCAATGC
 H S N T C P V G V C V Q D E K L R E K F T G T P E K V
 404 CACAGCAATACCTGTCCGGTGGGGTCTGTGTCCAGGATGAAAACTGCGCGAAAAATTCACCGGTACGCCGAAAAGGTG
 I N L M T Y M A E E V R E I L A R L G Y R S L H E I I
 485 ATCAATCTGATGACCTATATGGCCGAAGAAGTGCAGGATACTGGCGCGCTCGGCTATCGCTCGCTGCAGGATCATC
 G R T E L L R Q V S R G A E H L D D L D L N P I L A K
 566 GGCCGTACCGAGCTGTCCGCCAGGTGAGCCGCGCGCGGAGCATTGGATGATCTCGACCTCAACCCGATCTGGCCAAG
 V D A P D T A R S F N L P T H R N E V P D S L D A Q M
 647 GTCGACGCGCCGATACCGCGCAGTTTCAACCTGCCAACCATCGCAACGAAGTCCCGACAGTCTCGATGCGCAGATG
 I A D A Q P V F E R R E K M Q L T Y T V R N T H R A V
 728 ATCGCCGATGCCACGCGATTTGAAACGCGGGAGAAAATGCAGCTGACCTATACGGTGGCGAACACCCACCGCGGGT
 G T R F S A E V T A K Y G M T N L A E D H V H V R L R
 809 GGCACGCGCTTCTCGGCCGAGGTACCGCCAAATATGGCATGACAAATCTCGCCGAAGATCATGTCCACGTCCGCCTGCGC
 G S A G L G A F L C Q G I T L E I F G D A N D Y V
 890 GGATCCGCGGCCAATCCCTTGGCGCCTTCTCTGTGAGGGATCACGCTCGAGATATTCCGGCAGCCAAATGACTATGT
 G K G L C G G K I V V R P M V S S P L T S Q A N T I I
 971 GGCAAGGGTCTGTGCGGGCAAGATTGTGTCGGCCGATGGTTCAGCTCACCGCTCACCTCCAGGCCAATACGATCATC
 G N T V L Y G A T S G Q L Y A A G Q A G E R F A V R N
 1052 GGCAATACCGTGTCTATGGCGCGACCTGCGCCAGCTATGCGCGGGACAGGCGGGCAGCGTTTGGCGTACGCAAT
 S G A D V V E G C G A N G
 1133 TCCGCGCGGATGTCGTGGTGGGCTGTGGTCCCAATGGC

***C. carterae* α -GOGAT A2 (*CcartA2*)**

Größe: 1171

Y S I E D L A Q L I Y D L K Q I N P E A R V C V K L
 CTATTCCATCGAGGATCTGGCGCAGCTGATCTATGACTTGAAGCAGATTAATCTCGAAGCACGGGTCTGCGTGAATTG
 V A K A G I G T V A A G V A K A H A D T I L I S G H S
 80 GTCGCAAAGGCCGGGATCGGCACGGTTGCCGACGGGTCGCCAAGGCCCATGCCGATACGATCCTGATTTCCGGTCATTCC
 G G T G A S P Q T S I K Y A G L P W E M G L A E A H Q
 161 GGCGGAACCGGTGCCTCGCCCCAGACCTCCATCAAATATGCGGGCTGCCGTGGGAAATGGGTCTGGCAGAGGCACATCAA
 V L T L N G L R H R V R L R T D G G I R T G R D V V I
 242 GTGCTGACGCTGAACGGATTGCGCCACCGGTGCGGCTGCGCACCGATGGCGGCATTCGCACCGGTGCGGATGTGGTCATC
 A A I L G A E Y G I G T A S L V A M G C I M V R Q C
 323 GCCGCCATTCTAGGCGCAGAAGATATGGTATCGGGACCGCCAGCCTTGTGCCATGGGCTGTATCATGGTGGCGCAATGC
 H S N T C P V G V C T Q D E R L I D K F S G S P E K V
 404 CATTCCAATACCTGCCCGTCCGGTCTGTACCCAGGATGAACGCTGATGATAAATTCAGTGGATCGCCGAAAAGGTC
 M N L F S F V A E E V R E I L S R L G A R S L S D I I
 485 ATGAACCTGTTTCAAGTTTCGTTGCAGAAGAGTTCCGCGAGATTCTGTCCCCTGGGCGCGGATCGCTCAGCGACATTATC
 G R T E L L A Q V S R G A D H L D D L D L N P L L T Q
 566 GGGCGCACGGAATTGCTGGCCAGGTCCGCGGGGCGGGATCATCTGGATGATCTGGACCTGAACCCCTGCTGACCCAA
 P G M V R G V F P T E A E G R N S V P E T L D A L M I
 647 CCGGCATGGTGGCGGTGCTTCCCGACAGAGGCGGAAGGCCCAATTCAAGTGCAGAAACATTTGGATGCGCTGATGATC
 Q D A E N L F R D R E K M Q L Q Y N I R N T Y R A I G
 728 CAGGATGCCGAAAACCTGTTCGCGACCGGGAGAAAATGCAGCTTCAATACAATATCCGAAAACACCTATCCGGCAATCGGC
 T K I S S K I T R Q F G M K A L R P G H L T V R M R G
 809 ACAAAGATCTCCTCAAGATCACCGTCAAGTTCCGATGAAAGCCTGCGCCCGGTCATCTGACCGTACGATGCGCGGA
 S A G Q S L G A F A V Q G L K L E V L G D A N D Y V G
 890 TCGCCGGGCAATCCCTGGGGCGTTTCCCGTGCAGGATTGAAGCTGGAAGTTCTGGGCGATGCCAATGACTATGTCCGC
 K G L S G G E I V I R P I T T S P L E S N K N A I I G
 971 AAGGGATTAAGCGCGGTGAAATTTGTTATCCGCCAATCACACCAGTCCGTTGGAAAGCAACAAGACCGGATTATCGGC
 N T C L Y G A T D G R L F A A G M A G D R F A V R N S
 1052 AATACCTGTCTGTATGGGGCAACCGATGGTGCCTGTTTCCGCGCGCATGGCGGGGATCGGTTCCGCGGTACGAAATTC
 G A Y T V V E G V G S N G
 1133 GGTGCTTATACCGTTGTGGAAGCGTCCGGTTCGAATGGC

***A. acetabulum* Fd-GOGAT (*AaceFd*)**

Größe: 1203

Y S I E D L A Q L I Y D L H Q V N K D A K V S V E L
 CTATTCCATAGAGGATTGGCTCAACTTATTTATGATTACATCAGGTAAATAAGATGCCAAGGTATCAGTAGAGCTT
 V A E A G I G T V A S G V A K A N A D V I Q I S G H D
 80 GTCGAGAGGCTGGTATTGGCACTGTTGCATCTGGAGTTGCTAAAGCAAACGCTGATGTGATCCAATCAGTGGACATGAT
 G G T G A S P I S S I K H A G G P V E M G L A E V H Q
 161 GGTGGTACTGGTGCCTCACCAATATCTTCCATTAAGCATGCTGGCGGTCCTGTAGAGATGGGATTGGCTGAAGTGCAT**TAA**
 I L T Q N E L R E R V V L R C D G G M R S G R D V I V
 242 ATTTTGACACAGAACGAGTTACGTGAACGTGTGGTCTTAGATGTGATGGTGGTATGCGAAGTGGAAAGGGATGTTATTGTG
 S A A L G A D E Y G F G T V A M I A T G C I M A R V C
 323 TCCGAGCACTTGGAGCTGATGAATATGGCTTTGGTACTGCTGCTATGATGTCTACAGGGTGTATTATGGCTCGTGTATGC
 H T N N C P V G V A S Q R E D L R A R F P G A P G D L
 404 CATACTAACCACTGCCAGTAGGTGTAGCTTCCCAACGTGAAGATCTAAGAGCTCGTTCCCTGGTGTCTCGTGGTATCTT
 V N F F Q M I A E E V R M E L S R L G L K S L D D L I
 485 GTCAATTTCTT**TAA**ATGATTGCTGAAGAAGTTAGAATGGAGCTTTCCAGACTTGGTTTAAAATCCTTGGACGACTTAATC
 G R A D L L K Q R D N I I S K T F G L D L S F L T T Y
 566 GGCCGTGCAGACCTTCTTAAG**TAG**CGTGATAACATAAATTCAAAACTTTCCGATTGGATCTTTCTTCTCACTACTTAC
 G G A T D A S S S R I A Q E T H S N G P I L D D E I L
 647 GGTGGAGCTACCGATGCATCCTCCTCCGAAATGGCCAAGACACATTCAAATGGACCAATTTTGGATGATGAAATTTG
 N D T E L L Q A I E N G T S V E R T Y D I V N T D R A
 728 AATGACACTGAACTTCTT**TAA**GCCATTGAAAACGGCACATCCGTTGAGCGAACTTACGATATTGTTAATACAGATCGTGCA
 V L G R V A G A I A K K W G D N G F P G E I K L N L K
 809 GTTCTTGGCGTGTGCTGCTATTGCCAAAAAATGGGATGATAATGGATTCCCTGGAGAAATCAAGTTGAACCTTGAAG
 G S G G C S S F C F S V R G L V I H L E G E A N D Y I
 890 GGATCCGGTGGCTAGTCATCATTTTCTGTTTCTGTTTCGAGGTTTGGTTATCCATTTAGAAGGTGAAGCAAACGATTATATT
 G K G M A G G D I T I V P P A G T K F D P S T A S I V
 971 GGTAAGGGTATGGCTGGAGGGGACATTACCATTGTACCCCGAGGATACCAAATTTGACCCTTCAACTGCTTCCATTGTT
 G N T C L Y G A T G G N I Y V N G R A G E R F G V R N
 1052 GGTAATACATGCTTGTATGGAGCAACTGGTGGAAATATCTATGTAATGGCGTGCAGGTGAAAGGTTTGGTGTACAGAAAT
 S M A E A V V E G A G D H C
 1133 TCTATGGCTGAAGCTGTTTGTGAGGGAGCAGGTGACCACTGT

A. acetabulum N-GOGAT (AaceN)

Größe: 1168

```

      Y S I E D L A Q L I H D L K K A R D A R I S V K L V
      CTATTTCGATTGAGGATTTGGCATAGCTGATCCATGATTTAAAGAAAGCTCGTGATGCCAGGATCAGCGTCAAGCTAGTG
      S K A G V G T I A A G V A K G A A D V I V V S G Y D G
80  TCAAAAGCAGGCGTGGGCACGATTGCAGCCGGTGTGGCCAAAGGTGCCGAGATGTCATCGTTGTGAGCGGTATGATGGC
      G T G A S P K T S I K H T G L P W E L G L A E A H Q T
161  GGTACGGGTGCATCACAAAAACAAGTATCAAACATACGGGTCTTCTTGGGAGCTTGGCCTTGTGAAGCACACTAAACA
      L M L N G L R S R V V L E T D G K L M T G R D V V M A
242  TTGATGCTGAATGGCCTGCGCAGCCGTGTAGTCCTTGAAACGGACGGGAAATTAATGACGGGACGCGACGTTGTATGGCG
      A I L G A E E F G F A T A P L V V L G C V M M R A C H
323  GCAATCCTTGGAGCGGAAGAAATTCGGCTTGTCTACGGCACCGCTTGTGGTACTTGGCTGTGTCATGATGCGTGTCTTGTAT
      L D T C P V G V A T Q N P E L R S K F T G D P D H V V
404  TTGGATACATGTCCAGTCCGGGTCTGCTACTTAAAACCTGAGCTTCGCAGCAAATTCAGTGGAGATCCGGATCATGTGCTG
      N F M R F I A E E V R E T M A E L G F R T L E E M V G
485  AATTCATGCGCTTCATCGCTGAGGAAGTGCAGGAAACGATGGCTGAGCTTGGTTTGTAGAACACTAGAGGAGATGGTCCGGC
      R T D V L Q A S E R A Q N H W K A K H L D L T T L L F
566  CGCACTGATGTTTTACAAGCGAGCGAGCGTGCACAAAACCATTTGAAAGCGAAGCATCTGGACTTGACGACACTTCTTTTC
      Q P E G I R T Y Q L P Q N H K I D E S L D I R E I L P
647  CAACCGGAGGGGATACGTACGTATCAACTTCCGCAAAACATAAAATTTGACGAATCCTTAGATATCCGTGAGATTTTACCT
      V V Q P A L N D Q T Q V D V S F P I T N V N R V V G T
728  GTGGTGCAGCCTGCTTAAATGATCAAACTAGTGGATGTCAGCTTCCCGATTACAAACGTGAACCGTGTGGTGGGAACG
      I V G S E V S K R Y G E D G L P E D T I T L R F T G S
809  ATCTCGGCAGTGAAGTATCCAAACGCTATGGGGAGATGGGTTGCCTGAAGATACGATCACACTTCGCTTACCGGATCG
      A G Q S F G A F I P K G M S M Y L T G D V N D Y L V G K
890  GCGGCCAGAGCTTCGGTGCCTTCCAAAGGAATGTCGATGATTTGACAGGTGATGTCAATGACTATGTTGGGAAA
      G L S G G K I I V T A P S G N Q I E A G D N V I A G N
971  GGATTATCTGGCGAAAGATCATTGTACGGCACCTTCTGGGAATCAGATTGAGCCGGGGACAATGTAATGCGCGTAAT
      I A L Y G A T S G E A Y I N G R A G E R F A V R N S G
1052  ATCGCCTTATACGGTGAACAAGCGGCGAGGCGCTAATTAATGGCCGTGCGGGAGAACGATTTGCCGTACGGAACAGTGA
      V N V V V E H G I G D H C
1133  GTCAATGTCGTGGTTGAAGGAATTGGAGACCATGGC

```

C. paradoxa Fd-GOGAT (CparFd1)

Größe: 1176 bp

```

      Y S I E D L A Q L I Y D L H Q I N E A A K V S V K L
      TACTCGATCGAGGACCTTGCACAGCTCATTTATGACCTGCATCAGATCAACAGGCGCCGCTAAGGTCTCGGTCAAGCTT
      V S E I G I G T V A A G V A K A N A D A I Q I P G H D
79  GTCTCCGAGATCGGCATCGGCACCGTTGCTGCTGTGTCGCGAAAGCCAACGCTGACGCCATCCAGATCCCGGCCATGAC
      G G T G A S P I S S I K H A G G P W E M G L S E V Q R
160  GGTGGCACTGGTGCCTCGCAATTTGCTCAATCAAGCACCGCGGCCCTTGGGAGATGGGTCTCTCGGAGGTGCAGCGC
      V L L E N G L R D R V V L R V D G G F K T G N D V L V
241  GTGCTGCTTGAACCGCCTTCCGATCGCGTGGTGTCTCCGTGTGATGGCGGATTCAAGACCGGCAATGATGCTTGTG
      G A L M G G D E Y G F G S I A M I A T G C I M A R V C
322  GGTGCCCTGATGGGCGGTGACGAGTACGGCTTCCGCTCGATCGCCATGATCGCCACAGGCTGCATCATGGCACGCGTCTGC
      H T N N C P V G V A S Q R E D L R Q R F P G V P G D I
403  CACACAAACAACCTGCCCGTCCGGCTTCCAGCGCGAGGACTCCGTGACGGCTTCCCGGGCGTCCCGGGGACATC
      V N F F M A V A E E T R E L L A S M G Y R S L D E V I
484  GTGAACCTTTCATGGCCGTGCGGAGGAGACTCGGAGTGTCTTGCCTCGATGGGCTACCGCAGCTCGACGAAGTCATT
      G R V D L L K P R D G L R L A K T D S V S L D Y L L S
565  GGGCGCGTGGATCTTCTAAGCCGCGACGGGTGCGTCTGGCAAGACCGACAGCGTGTGCTCGACTATCTGCTGTGCG
      T P V P A D R S W V K Q P E T A H S N G P V L D D E I
646  ACCCCCGTCCCGCCGACCGCTCCTGGGTCAAGCAGCTGAGACGGCCACTCAAATGGCCCGTCTTGGACGACGAGATC
      L A D Q E I K T A I E S H G T V N K T I K I T N V D R
727  CTCGCCGACAGGAGATCAAGACAGCCATCGAGTGCATGGCACCGTCAACAAGACCATCAAGATCACCAACGTGGACCGC
      S V G A R V S G Q I A V R Y G D R G F K G K L N L N F
808  TCGGTTGGTGCACCGTGTGCGGCGAGATCGCTGTTGCTATGGCGACCGTGGCTTCAAGGGCAAGCTTAACTCAACTTC
      V G A A G Q S F F G A F I V D G M R M R I E G G E C N G Y
889  GTCGGCGCGCTGGCCAGTCTTTGGTGCCTTTCATGTTGATGGCATGCGCATGCGCATGAGGGGAGTGCACCGGTTAC
      V G K G M N G G E I T V V P P S G S S I S P S E S V I
970  GTTGGCAAGGGCATGAACGGTGGCGAGATCACCGTGTGCCGCTTCCAGGCTCGTCCATCAGCCCTCGGAGTCTGTCTATT
      V G N T C L Y G S T G G R M F A Y G R A G E R F G V R
1051  GTGGCAACACCTGCTGTACGGCTCGACGGTGGGCGCATGTTTGCCTACGGCCGCGCAGGAGAGCGTTTTCGGAGTCCGC
      N S L G T A V V E G T G D H C
1132  AACTCGCTCGGCACGGCCGTTGTGGAGGGCACTGGTACCCTGC

```


A. thaliana Fd1 KTLIGNLRRVIRVDDGGFKSGVDVLI AAMGADEYFGFTLAM IATGCMARICHTNNCPVGVASQREELRAR-FPGL-

A. thaliana Fd2 RVLMEENLRRSLVLRVDGGLKSGVDVLI GALMGAEYFGFTSIAM IAEGCMARICHTNNCPVGVASQKEELRKR-FTGI-

A. spirogr. Fd CLLVENNLREKVIILRVDDGGLRTQDVMMAALLGADEYFGFTIAM IAGGCMARVCHTNNCPVGVATQKEELRMR-YPGV-

C. caldarium Fd QTLIENGLRERVILRVDDGGFRSGVDVMAAAMGADEYFGFTSIAM IATGCMARICHTNNCPVGVASQREELRAR-FPGV-

G. max QTLIQNGLRERVVLRVDGGLKSGVDVLI AAMGADEYFGFTSIAM IATGCMARICHTNNCPVGVASQREELRAR-FPGV-

Z. mays SVLRKNGLRDRVLLRADGGLKSGVDVMAAAMGADEYFGFTSIAM IAEGCMARICHTNNCPVGVATQNEALRKR-FVGT-

P. silvestris QTLIENGLRERVVLRVDGDFKSGVDVMAAAMGADEYFGFTSIAM IATGCMARICHTNNCPVGVASQREELRAR-FPGV-

P. aerugin. Fd KVLEENLRRNRVLRVDGGLRTGCDI IMAALMGAEYFGFTSIAM IATGCMARICHTNNCPVGVATQREELRAR-FPGV-

P. purpurea QTLIENGLRERVVLRVDGGLRTGSDIVLAAIMGAEEYFGFTSIAM IATGCMARICHTNNCPVGVATQREELRAR-FSGV-

S. oleracea QTLISNGLRERVILRVDDGGLKCGVDVMAAAMGADEYFGFTSIAM IATGCMARICHTNNCPVGVASQREELRAR-FPGV-

Anabaena TTLVENSRLREKVIILRVDDGGLRTGKDI I AALMGAEYFGFTSIAM IATGCMARVCHTNNCPVGVATQRQDLRNR-FPGI-

Nostoc QVLMENLRRSLVLRVDGGLKSGVDVLI GALMGAEYFGFTSIAM IAEGCMARICHTNNCPVGVASQKEELRKR-FTGI-

Synechocyst Fd RVLMEENLRRSLVLRVDGGLKSGVDVLI AAMGADEYFGFTSIAM IAEGCMARVCHTNNCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

C. rheinhardtii QTLVPLELRRVLRVDDGGVNRGRDVLMAALMGAEYFGFTSIAM IATGCMARVCHTNNCPVGVASQREELRAR-FPGA-

A. acetabul. Fd QLLTQNELRERVLRDGGMRSGRDVISAALGADEYFGFTSIAM IATGCMARVCHTNNCPVGVASQREELRAR-FPGA-

C. paradoxa QVLEENGLRDRVLRVDGGLKSGVDVLI GALMGDEYFGFTSIAM IATGCMARVCHTNNCPVGVASQREELRQR-FPGV-

A. aeolicus RVLMEENLRRSLVLRVDGGLRTGSDIVLAAIMGAEEYFGFTSIAM IAEGCMARICHTNNCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

E. coli QALVANGLRHKIRLQVDGGLKSGVDVLI IKAAILGAESFGFTSIAM VALGCKYLRICHLNCCATGVATQDDKLRKNHYHGL-

P. aeruginosum QTLRGNLDRGKVRVQTDGGLKSGVDVLI IKAAILGAESFGFTSIAM IALGCKYLRICHLNCCATGVATQNDKLRKHDIYIGT-

Xylolla QALVANLDRERTMLQTDGGLKSGVDVLI KAAILGANSFGFTSIAM IVALGCKYLRICHLNCCATGVATQDELRANHFHTGL-

C. carterae A2 QVLPNGLRHRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IAMGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

A. spirogr. A2 QVLMNNLRSRVTLRDGGGLRTGRDIVMAAMGAEEYFGFTSIAM IAMGCMVRQCSNTCPVGVATQDEALRQK-FTGS-

A. spirogr. A1 QVLSLNLDRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IAMGCMVRQCSNTCPVGVATQDEALRQK-FTGS-

R. sphaeroides QVLMNNLRRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IAMGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

H. carterae A1 QVLSMNNLRRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IAMGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

H. carterae A2 QVLSMNNLRRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IAMGCMVRQCSNTCPVGVATQDEALRQK-FTGN-

C. caldarium A1 QVLSLNLDRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IAMGCMVRQCSNTCPVGVATQDEALRQK-FTGN-

C. carterae A1 RVLTLNGLRHRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IAMGCMVRQCSNTCPVGVATQDEALRQK-FTGN-

G. theta A2 QVLSMNNLRRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IAMGCMVRQCSNTCPVGVATQDEALRQK-FTGN-

E. siliculos. A2 -VLTNGLRHRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IAMGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

A. spirogr. A3 QVLTNGLRHRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IAMGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

G. theta A1 QVLTNGLRHRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IAMGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

E. silicul. A1 QVLTNGLRHRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IALGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

A. brasilense QVLTNGLRHRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IAMGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

Z. mobilis QVLTNGLRHRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IAMGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

O. danica N1 QTLIANGLRERVILRVDDGGLKSGVDVLI AAMGADEYFGFTSIAM IATGCMARICHTNNCPVGVASQREELRAR-FPGV-

P. aeruginosum N QTLVKNLRRSRVVRVQADGQMKTRDVAIAALLGAEEYFGFTSIAM IVEVIMMRKCHMNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

A. acetabul. N QTLMLNGLRHRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IVALGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

B. subtilis QTLMLNGLRDRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IVALGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

C. acetobutyl. QTLMLNGLRDRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IVALGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

C. glutamicum QTLMLNGLRDRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IVALGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

R. etli QTLMLNGLRDRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IVALGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

Synechocyst N QTLVNLNLRSRIVVETDQMKTRDVAIAALLGAEEYFGFTSIAM IVALGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

B. halodurans QTLVNLNLRDRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IVALGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

S. coelicor QTLMLNGLRDRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IVALGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

V. cholerae QTLMLNGLRDRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IVALGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

M. tuberculosis QTLMLNGLRDRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IVALGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

D. radiodurans QTLVNLNLRDRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IVALGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

O. danica N2 QVLSMNNLRRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IAMGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

C. elegans QVLTNGLRHRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IAMGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

N. crassa QTLVNLNLRGRVVRVQADGQMKTRDVAIAALLGAEEYFGFTSIAM IVALGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

S. cerevis. QTLVNLNLRGRVVRVQADGQMKTRDVAIAALLGAEEYFGFTSIAM IVALGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

S. pombe QTLVNLNLRGRVVRVQADGQMKTRDVAIAALLGAEEYFGFTSIAM IVALGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

M. sativa QTLVANDLRGRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IITLGCIMMRKCHLNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

O. sativa QTLVANGLRGRAILQTDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IITLGCIMMRKCHLNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

C. jejuni QTLILNGLRDRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IVALGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

N. tabacum QTLIENGLRERVVLRVDGGLKSGVDVLI AAMGADEYFGFTSIAM IATGCMARICHTNNCPVGVASQREELRAR-FPGV-

A. spirogr. N1 QTLVMMNLRDRITVQADGGLRTGRDVAIAALLGAEEYFGFTSIAM IAAGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

A. thaliana N QTLVANDLRGRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IITLGCIMMRKCHLNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

E. siliculos. N QTLITNGLASRIALQVDGGLRTGRDVAIRALLGAEEYFGFTSIAM IAAGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

P. boryanum N QTLVNLNLRSRIVVEADGQMKTRDVMMAALLGAEEYFGFTSIAM IVALGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

H. carterae N QTLMLNGLRDRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IVALGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

C. caldarium N1 QTLVNLNLRDRITVQADGGLRTGRDVAIAALLGAEEYFGFTSIAM IAAGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

C. caldarium N2 QTLMLNGLRDRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IVALGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

A. spirogr. N2 QTLVMMNLRDRITVQADGGLRTGRDVAIAALLGAEEYFGFTSIAM IAAGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

L. lactis QTLMLNGLRDRVLRVDDGGLKSGVDVLI AAILGAEEYFGFTSIAM IVALGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

S. solfatorius KILRREGLRDKFTI IAGRVSSATDAKLFALGADIVSVGTGAL IAGCMVRQCSNTCPVGVATQDEKLQR-FKGV-

* * * * *

A. thaliana Fd1 -----PGDLVNFFLYIAAEVVRGILAQGLYKELDDIIGRTDILLK---ARDISLVKT-HLDSL YLLSSVGLP-----
 A. thaliana Fd2 -----PEHVVNFFYFVAEEVVRHLLAKLGYRSLSEIIGRADILTT--RKDVQLSQQTQAINLNCILQLPDTK-----
 C. caldarium Fd -----PGDLVNFYFLVAAEEVVRGILAQGLYKELDDVIGRTDILFQ---PRDISLAKTQHLDLNYILSNVGLP-----
 G. max -----PGDLVNFYFLVAAEEVVRRAALAQGLYKELDDIIGRTDILLK---PKHISLVKTQHIDLGYLLSNAGLP-----
 Z. mays -----PEHVVTFFQFVAAEEVVRHLLAKLGYRSLSEIIGRPGLLQP--RKSLSLRKVSRLDVS YLLTSLTCTMPETGE
 P. silvestris -----PGDLVNFYFLVAAEEVVRGILAQGLYKELDDVIGRTDILLR---PRHISLMKTQQDL SYLLSSVGRP-----
 A. spirogr. Fd -----PENVVNYFIFLAEIRVILSKLGFETLSQIIGRKDLINH--NFDKKLCKTHCIDT SIFFNIKTNE-----
 P. aerugin. Fd -----PEALVNYLLFLAEIIRILASIGYTSLNDIIGRADLLVQ--NKNLNLTKTKNINLNSIINLPNS-----
 P. purpurea -----PEALVNFYFLVAAEEVVRILASLGYKSLDEITGQNHLLIK--NTDIELAKTRGIELNSLINI-----
 S. oleracea -----PGDLVNFYFLVAAEEVVRGILAQGLYKELDDIIGRTDILK---PRDISLMKTQHLDL SYILASAGLP-----
 Anabaena -----PSDVNFYFVAAEEVVRILAEELGYKSLDEELIGLNDLKF--VKDIELSKTKNLLNLPNSINMN-----
 Nostoc -----PEHVVNFFYFVAEEVVRHLLAKLGYRSLSEIIGRADILTT--RKDVQLSQQTQAINLNCILQLPDTK-----
 Synechocyst Fd -----PGQVNFYFVAAEEVVRILARLGYRSLDEIIGRTDILLK--RSVQLSKTQKQAINLNCILQLPDTK-----
 C. reinhardtii -----PEDLVNFYFVAAEEVVRANLANLGYRSLDEVIGRADLLK---QRSVKLAKTEGLDLSFLTTFAGAS-----
 A. acetabul. Fd -----PGDLVNFYFVAAEEVVRMELSRGLKSLDDLIGRADLLK---QRDNIISKTFGLDLSFLTTFYGGAT-----
 C. paradoxa -----PGDIVNFYFVAAEEVVRRELLASMGYRSLDEVIGRVDLLKP--RDGLRLAKTDSVSLDYLLSTPVP-----
 A. leucostictus -----VENVMAYFKVAQEVREILASIGYRSLDEIIGRTDILLV--VRYDFEFGSKRIEKLNSLINI-----
 E. coli -----PFKVTNYFEFIARETRELMAQLGVTRLVDLIGRTDILLK--LDGFTAKQQ--KLALS KLETAEPHPG-----
 P. aeruginosum -----VDMVNFYFVAAEEVVRRELAKLGYRSLDEELIGRTDILLV--IEGQTAKQH--HLDLTPPLGSDYIPAD-----
 Xylolla -----PERVENFRLLAEEVVRQWLSYLGAMSLDDIIGRTDILLQ--LEVSSREGV--RVNLSRLLTNACYEG-----
 C. carterae A2 -----PEKVINLMTYMAEEVVRILARLGYRSLDEIIGRTELLR---QVSRGAEHLDLDDLNPILAKVDAPDT-----
 A. spirogr. A2 -----ADKVVNLITFYAQEVRELLASIGARSLDEVIGRADLLS---QVSRGSAHLDDL DLNPLLITVDGSQ-----
 A. spirogr. A1 -----ADKVINLMSFIAEDVRRILASLGLNSLDEAIGRTDILLA---QVSRGAPHLDDL DLNPLLVQVDTAT-----
 R. sphaeroides -----ADKVVNLITFYAQEVREILASIGARSMDEIIGRADLLT---QVSRGAHLDDL DLNPLLITVDGSN-----
 H. carterae A1 -----PEKVINLMTYMAEEVVRILARLGYRSLDEIIGRTELLR---QVSRGAEHLDLDDL NPILAKVDAPDT-----
 H. carterae A2 -----ADKVVNLITFYAQEVREILASIGARTLDEVIGRADLLT---QVSRGSAHLDDL DLNPLLITVDGAQ-----
 C. caldarium A1 -----ADKVINLMSFIAEDVRRILASLGLNSLDEAIGRTDILLA---QVSRGAPHLDDL DLNPLLVQVDTAT-----
 C. carterae A1 -----PEKVMNLSFVAAEEVREILSRLGARSLSDEIIGRTELLA---QVSRGADHLDDL DLNPLLITQPGMVRG-----
 G. theta A2 -----ADKVVNLITFYAQEVREILASIGARSLDEVIGRADLLT---QVSRGSAHLDDL DLNPLLITVDGAQ-----
 E. siliculos. A2 -----PEKVINLMTYMAEEVVRILARLGYRSLHEIIGRTELLR---QVSRGAEHLDLDDL NPILAKVDAPDT-----
 A. spirogr. A3 -----PEKVINLMTYMAEEVVRILARLGYRSLHEIIGRTELLR---QVSRGAEHLDLDDL NPILAKVDAPDT-----
 G. theta A1 -----PEKVINLMTYMAEEVVRILARLGYRSLHEIIGRTELLR---QVSRGAEHLDLDDL NPILAKVDAPDT-----
 E. silicul. A1 -----PEVYNLFFLLAEVREILAGLGFRLNEVIGRTDILLH--KNGKALHDDL DLNPLLITVSYELNP-----
 A. brasilense -----PEKVVNLFTFLAEVREILAGLGFRLNEVIGRTDILLH--QVSRGAEHLDLDDL NPILAQVDPGEN-----
 Z. mobilis -----PERVINLMTFIAEEVREILAKLGYRSLKEIIGQTDILLS---QVNRGADHLDDL DLNPLVLAQVDANTE-----
 O. danica N1 -----PGDLVNFYFLVAAEEVVRGILAQGLYNSLDDIIGRTELLR---PRDISLVKTQHLDL SYLLSSVGTG-----
 P. aeruginosum N -----PELRKRFAGDPDHVNFVFRFITEELREIMAELGFRTINEMVGVQVDSLEMRRES---PTEIQLTCLQYTTKSRNPY-----
 A. acetabul. N -----PDHVNFVFRFIAEEVRETEMAELGFRTLEEMVGRTDVLAQASERA--QNHWKAKHLDLTTLTFLYQPE--G-----
 B. subtilis -----PDHIVNYMLFIAEEVREYMAALGFKTFDEMIGRTDVLHASERA--KEHWKASQLDLSLTLTYQPE--G-----
 C. acetobutyl. -----QN-MLLTLCIYSTRIREIMAKLGFRLKDEMIGRVDKLLKQ--KEN--IHGWKAKNVLDLSAVLYTTPDKYKKG-----
 C. glutamicum -----AEHVNFVFFVIAEQEVREYLAQLGFRSLDEAVGQAQVLRKRSRSG--IPADSRAAHLDLSPHFRPHTPFP-----
 R. etli -----PEHVINYFFVAAEEVVRILASLGFRLDETHRRFGTPGEGR--DAGALEGQPPRLQPHLPQG--RCRQ-----
 Synechocyst N -----PAHAVNFMTFIATELREVMQAELGFRTINEMVGRTDILEP--KKA--VAHWKAKGIDLSTILHQPEVGD-----
 B. halodurans -----PEHVNYMFTFVAAEQEIREIMAELGFRTVDEMIGRTDVLQ--NRN--IDNWKAVHVDLSLLYQPKPQG-----
 S. coelicor -----AEYIVNFVFRFIAEEVREILAEELGYRSLHEIIGRTELLR---AVDHWKAGLDDLPLFHPV--ALTE-----
 M. tuberculosis -----PEFVENFFMFI AEEVREYLAQLGFRSLDEAVGQAQALDITL--ARAHWKAKHLDLAPVLEHEPE--SAFM-----
 V. cholerae -----VDDVVTFFQYMAQGLREIMAELGFRTINEMVGVQAHKLVKVRDDIG--HWKYKNLDLSPILFIEQPRSED-----
 D. radiodurans -----PEHVINYFFVAAEEVVRQMASLGVRSFDLLIGRSDLLDMRA--GIDHWKAGLDFSRVYKPK--EMPA-----
 O. danica N2 -----ADKVVNLITFYAQEVREVLASIGARSLDEVIGRADLLS---QVSRGSDHLDDL DLNPLLIRVDGSD-----
 C. elegans -----PEHVNYMFMVAAEEVRYFLSKLGRKLEDAVGRTDLLYASN--PVNKKATMLEFSGSILKNAQQMFP-----
 N. crassa -----PEHVINFVFFVYVANELRAIMARLGFRTINEMVGHVEVLKVRDLRT--KKTSNIDL SLILTPAHKLRP-----
 S. cerevis. -----PEHVINFVFFYL IQDLRQIMAKLGFRTIDEMVGHSEKLLKRDDVN--AKAINIDLSPILTPAHVIRP-----
 S. pombe -----PEHVNFVFFVYVAAEELRGMARLGFRTINEMVGRSDKLVKVAEPIN--NKSKLLDLTPLLTPAFTLRP-----
 A. thaliana N -----PEHVINFVFFMLAEVREIMASGLGFRTVTEMIGRADMLELDREVVKNNDKLENIDL SLLLRPAEIRP-----
 M. sativa -----PEHVINFVFFMVAEEMREIMSGLGFRTVTEMVGRSDMLEVDKVEVVKGNALLENIDL SLLLRPAEIRP-----
 O. sativa -----PEHVINFVFFMLAEELREIMSGLGFRTITEMVGRSDMLEVDPEVVKSNKLENIDL SLLLRPAEIRP-----
 C. jejuni -----VDDVINFMFYIAEELREYMARLGFERLDDMIGRVDKLRQ--KS--VQKAGKLNLDKILKSLPTYNRT-----
 N. tabacum -----PGDLVNFYFLVAAEEVVRGILAQGLYKELDDIIGRTDILLR---PRDISLMKTQHLDL SYLLSNVGLP-----
 A. spirogr. N1 -----PEHVINYFFVAAEEVRELMARLGFRTFNEMIGQMQLDKRR--AVDHWKAKGLDFSRFLFKP--IAAD-----
 E. siliculos. N -----PEHVINYFFVAAEEVVRMAELGIAKFPDDLIGRSDWLDNET--AIDHWKSKGLDFDRFLFHRP--DASD-----
 P. boryanum N -----PDNTVNFMKFIAEQEVREIMAQLGFRTLNEMVGRTDILEA--KQA--VEHWKAKGLDFSKILYQPDVDP-----
 H. carterae N -----PEHVINYFFVAAEELRQIMAEAGFRVTEMVGRVVELIDMKN--AINHWRAEGIDL SLLLRHVK--DLPD-----
 C. caldarium N1 -----PEHVINYFFVAAEEVREMMSELGLPDINEMIGQMQLDKRR--IVDHWKAKGLDFSRFLFKP--VAAE-----
 C. caldarium N2 -----PEYVINYFFVAAEELRQIMADMGRFRTVTEMVGRVDRINMNR--ALRHWAEGVDLSRLLHNV--VLPE-----
 A. spirogr. N2 -----PEHVNFVFFVYVAAEELRELMARLGFRTVNDMIGQTDVLDITK--AIDHWKAGLDFSKFLFKP--IEAE-----
 L. lactis -----PEHIVRLMEFMAEEVRELLAEELGFRTINELVGHAEELLQ--AKEDLPKMRGLDFSRFLGHALP-----
 S. solfatorius -----VKMLVNFINGFSLANILDNLGLNNIRELRGRDILY--HGLSKDTLETGLIDGTEDEANPKLG-----

*

A. thaliana Fd1 ----KRSSTSIRKQEVHNSGPV----LDDTLLQDPEIMDAIENEK----TVHKTM-SIYNVDRSVCGRVIAKKY
 A. thaliana Fd2 ----ENRCWLHV-EQVHNSGPV----VDDQLLADPDIQAAIRNQS----AVTKTL-PIVNTDRTLGLARLAGAIASQY
 C. caldarium Fd ----KWSSTEIRNQEPTNGPV----LDDVLLADPEVADAIENEK----VVNKTII-KIYNIDRAVCGRIAGVIAKKY
 G. max ----EWSSSQIRSQDVHTNGPV----LDETILADPEIADAIENEK----EVSKAF-QIYNVDRAVCGRVAGVIAKKY
 Z. mays NFDVDIDRSWLEHKSIVETKRKESGVI TVDERLLSDALMOKAINEHD----KYNRAY-HLVNTDRSAFARISGLVIAKKY
 P. silvestris ----KWSSTKIRQQNVHTNGPV----LDDILLADPQISDAIEKER----EVKKTIV-QIYNVDRSVCGRVIAKKY
 A. spirogr. Fd ----YNFLEIPGGHKKLKTSL----LDYELLNSSDILYAIENHK----TLEKHI-KISNSDRSVGAKLAGRLAKQY
 P. aerugin. Fd ----KNNRSYLEHGIVHNSGLV----LDDILSSSDVSKAINENS----IVEKHI-RIVNTDRTVGARISGIIAQKY
 P. purpurea ----NTHWTWTFNSVHTNGPV----MDDDLAIPEINDAIKLEN----EVAKHF-KIANTNRTVGTRLSGVIAQKY
 S. oleracea ----TMSSTAIRKQEVHTNGPV----LDDQILSDPEI IDAIENEK----IVNKTIV-KIFNVDRAVCGRIAGVIAKKY
 Anabaena ----RNLIPLKHKHTVHTNGNV----LDDILLSKSNINAINLQS----NIVQDI-EILNTDRCVGARISGLITKMY
 Nostoc ----ENRCWLHV-EQVHNSGPV----VDDQLLADPDIQAAIRNQS----AVTKTL-PIVNTDRTLGLARLAGAIASQY
 Synechocyst Fd ----QNRQWLNH-EPVHNSGPV----LDDDLIADPDIQEAINHQT----TATKTY-TRVNTDRTVGTRLSGVIAKKY
 C. rheinhardtii ----GKSST-RAAQEVHDNGPQ----LDDRILAEPEVMAAIKDKH----PCPRP-SSRNVDPRP-PVAGVYRQAP
 A. acetabul. Fd ----DASSS-RIAQETHSNGPI----LDDEILNDTELLQAIENGT----SVERTY-DIVNTDRAVLGRVAGAIKWW
 C. paradoxa ----ADRSWVKQPETAHNSGPV----LDDEILADQEIKTAIESHG----TVNKTII-KITNVDRSVGARVSGQIAVRY
 E. coli ----KALYCTEN-NPFFDNGL----LNAQLLQQAQPFVDERQ----SKTFYF-DIRNTDRTVGTTRVSSHIVRRF
 P. aeruginosum ----KPQFCQVDRNPPFDKGE----LAEKMVDMAAAAINDLS----GAEFDL-DICNCDRSIGARISGEIARKH
 Xylella ----THCAAKRLYESPDS-----LSVQIDSLADAIANKT----GGDYRF-LIHNTDRTVGTTRLSGAIARVH
 A. aeolicus ----ENEPRRCMVKEKNDNPAPN----FNDKILED--LLPYIEEGI----PVEKEY-TIRNVDRTIPTKINYFISLRY
 C. carterae A2 ----ARSFNLPTHRNEVPDSDL----AQMIAD--AQPVERRE----KMQLTY-TVRNTHRAVGTTRFSAEVTAKY
 A. spirogr. A2 ----NIVYDRNKPRNAVPTLD----AQIVKD--AHRFLEDGE----KMQLSY-AVQNTLRTIGTRTSSHIVKNF
 A. spirogr. A1 ----AIEYQDPR-REVPDPTLD----AQILRD--GEPFFARGE----KMQLTY-EVQNVQRSIGARASSIVRKF
 R. sphaeroides ----RITYDRSKPRNAVPTLD----AEIVKD--GARFFEDGE----KMQLSY-AVRNTHRTIGTRASSHIVRKY
 H. carterae A1 ----ARSFNLPTHRNEVPDSDL----AQMIAD--AQPVERRE----KMQLTY-TVRNTHRAVGTTRFSAEVTAKY
 H. carterae A2 ----HQRYDRLKPRNEVPDPTLD----AEIVRD--AARFLNDGE----KMQLHY-AVQNTHRTVGTTRVSSHIVRKF
 C. caldarium A1 ----AIEYQDPR-REVPDPTLD----AQILRD--GEPFFARGE----KMQLTY-EVQNVQRSIGARASSIVRKF
 C. carterae A1 ----VFPTEAE-GRNSVPETLD----ALMIQD--AENLFRDRE----KMQLQY-NIRNTYRAIGTKISSKITRQF
 G. theta A2 ----HQRYDRLKPRNEVPDPTLD----AEIVRD--AARFLNDGE----KMQLHY-AVQNTHRTVGTTRVSSHIVRRF
 E. siliculos. A2 ----ARSFNLPTHRNEVPDSDL----AQMIAD--AQPVERRE----KMQLTY-TVRNTHRAVGTTRFSAEVTAKY
 A. spirogr. A3 ----ARSFNLPTHRNEVPDSDL----AQMIAD--AQPVERRE----KMQLTY-TVRNTHRAVGTTRFSAEVTAKY
 G. theta A1 ----ARSFNLPTHRNEVPDSDL----AQMIVD--AQPVERRE----KMQLTY-TVRNTHRAVGTTRFSAEVTAKY
 E. silicul. A1 ----KSPLKKTQQNHMLESALD-----QQIADARPALEEGV----PVTLEY-PVTNLTNRVGTTRVSSHIVRKY
 A. brasilense ----ARYCTLQ-GRNEVPDPTLD----ARIVAD--ARPLFEEGE----KMQLAY-NARNTQRAIGTRLSMVTRKF
 Z. mobilis ----ARYFQIDGFRNPVPSLD----AQMLQD--AQAVFTRE----KTQLTY-SVRNTQRAIGTRFSAEITRNF
 O. danica N1 ----SLSSTEIRKQEVHTNGPV----LDDDLADPLVIDAIENEK----VVEKTV-KICNVDRACGRVAGVIAKKY
 P. aeruginosum N ----TQACITRSTGSRVIDEVLV-----WHYSKPCAAIESKQ----RVNVSF-PIKNTDRTAGTILSNEITKRY
 A. acetabul. N ----IRTYQ-LPQNHKIDESLDI-----REILPVQPALNDQT----QVDVSF-PIITNVNRVGTTRVSSHIVRKY
 B. subtilis ----VRTFQ-SPQNHKIDQSLDI-----TTILPAVQEAIESGK----EADISI-EINNTNRVAGTITGSEISKRY
 C. acetobutyl. ----VVKFDETKKYDFKLNKVIDE-----KIFLDFKDAIENKI----KTNFEI-DVTNTDRALGTILGSEITRNV
 C. glutamicum ----TQDVRCCTKTQEHSLKALD-----NAPIDKASDTITRAAAGVETSIVIDS--SISNVNRVGTTRVSSHIVRKY
 R. etli ----GGNLLDEPAAAP--DRSHS-----RPRADRAGAAGADQD----ARRLRG-YIKNVDRSAGAMLSGEVAKRY
 Synechocyst N ----DVGRYCIQPDHGLQHSLDI-----TQLLDLQCPAIAKGE----KVTATL-PIITNINRVGTTRVSSHIVRKY
 B. halodurans ----QEKNYKTI EQDHQLEQSLDM-----TKLLDTCRPALEERKE----KVQAAV-SIKNIDRVAGTIVGSEISKRY
 S. coelicor ----GAVRHQAVGQDHGLEKALD-----NQLIKLASDALAAPDATRAAPVRAQV-AIRNINRVGTTRVSSHIVRKY
 M. tuberculosus ----NQDLYCSSRQDHGLDKALD-----QQLIVMSREALDS-----GKPVRFST-TIGNVNRVGTTRVSSHIVRKY
 V. cholerae ----GIYCQTQQN--HQLESILDR-----TLIQLATPALERGE----AVKAEL-PIINTDRSTGTMLSNIEICKVY
 D. radiodurans ----EVGTRHLTGQDHGLDKALD-----LKLIEKCRPAIEHGE----RVHFLQ-DARNVNRVGTTRVSSHIVRKY
 O. danica N2 ----DIVYDRNKPRNAVPTLD----AEIVRD--AARFLEEGE----KMQLSY-AVQNTHRTVGTTRVSSHIVRKY
 C. elegans ----NISIKGGSVKQVIELGALET-----RMLTELDGVPNDAGEH----KVFENE-YITNIDRTVGTTRVSSHIVRKY
 N. crassa ----GVATFNVRKQDHKLYVRLD-----NKLITEAELTLDKGL----PSRIEC-DIVNTDRAMGTSLSYQISKRY
 S. cerevis. ----GVPTKFTKKQDHKHLHTRLD-----NKLIDEAEVTLDRGL----PVNIDA-SIINTDRALGSTLSYRVSKKF
 S. pombe ----GAATYNVRKQDHRLYTRLD-----NKLIDEAEVTLLEGI----PSVVEC-EIINTDRTLGLATLSNKISKRY
 M. sativa ----EAAQYCVQKQDHGLDMALD-----NKLISLSNAALEKGL----PVYIET-PICTNTRAVGTTRVSSHIVRKY
 O. sativa ----GAAQYCVQKQDHGLDMALD-----NKLIALSKAALEKEV----RVFIET-PIQNTNRVGTTRVSSHIVRKY
 C. jejuni ----AVHFKDYK--DNKLEKTIIDY-----RILLPLCKNAVEKKE----PIKLSL-EVGNQSRFTATMLSSSEILKTY
 N. tabacum ----EWSSSMIRNQEVSNSGPV----LDDVLLADPKIFDAIENEK----VVNKTIV-EIYNIDRAVCGRIAGVIAKKY
 A. spirogr. N1 ----GVGTYRTQAQDHNIIDEILD-----RKLIELAEPALSDGK----AVSINL-PIKNTDRTAGAMLSGEVIAKRY
 A. thaliana N ----GAAQYCVQKQDHGLDMALD-----QELIALSKSALEKSL----PVYIET-PICTNTRAVGTTRVSSHIVRKY
 E. siliculos. N ----EEARWTETQTHPINDVLD-----RKLIELGSPALESKT----PVTIDL-PCKNVDRSVGAMLSGEVIAKRY
 P. boryanum N ----SVGLYCIQPDHGLDKSLDL-----TVLVLDLCKDAIEEGK----PVKATL-PIRNVNRVGTTRVSSHIVRKY
 H. carterae N ----RETLHQITIVQDHGLEAALD-----QDLIAAAAPSLKKEG----AVKIER-KVKNVNRVGTTRVSSHIVRKY
 C. caldarium N1 ----GVGIYQTKTLDHNIIDEILD-----RKLIELSQPAIKDGGK----AVSIDL-PIKNTDRTAGAMLSGEVIAKRY
 C. caldarium N2 ----GETLFTQMTQDHGLDAALD-----KDLIAAAAPALEHGQ----TVKIER-KVKNVNRVGTTRVSSHIVRKY
 A. spirogr. N2 ----RVDIHHTGEQNHPIKIDILD-----RKFIETAKPALDDGT----AVQAEF-PIGNTDRSAGTMLSGELAKRY
 L. lactis ----IATR--HSDPFANPR-----AWKELDQTEATLNNGS----QATVHG-TIKNINRTTARMAGWIAERY
 S. solfatorius ----ELWNRRI IAYMHELMNKGN-----PVITSMGSTAPPDVEKPAR----IIDWLRSDGAQVTRPSIDPYREDVDTSF

A. thaliana Fd1 GDT--GFAGQLNLTFTGSAG----QSFACFLTPGMNIRLVGEANDYVKGKGMAG--GEVVILPV--ES---TGFRPE-DA
 A. thaliana Fd2 GDS--GFEGQINLNFTGSVSG----QSFAGFNLPGIILHLKGEANDYVKGKGMHG--GEI I IKPP--TE---ATYDPA-QN
 A. spirogr. Fd KNE--GFRGSLILNFYGTAG----QSFSGFNKGVTLRLIGEANDYVKGKSMG--GEIVIVPP--SE---VAFDAS-EQ
 C. caldarium Fd GDT--GFAGQLNLTFTGSAG----QSFACFLTPGMNIRLVGEANDYVKGKIAG--GELVITPV--DK---TGFEPE-DA
 G. max GDT--GFAGQLNLTFTGSAG----QSFAGFNLPGIILHLKGEANDYVKGKGMAG--GELVVVPV--DK---TGFPVE-DA
 Z. mays GDN--GFEGSLEFDLTGAAG----QSFAGFLSRGMDLNLKGYANDYVKGKGMAG--GVISIRAP--EE---ELIQTKRSL
 P. silvestris GDT--GYAGRLEILFTGSAG----QSFAGFNLPGIILHLKGEANDYVAKGMAG--GEIVITPS--DK---TGFPVE-DA
 P. purpurea GNE--GFKGLIKLNFYGSAG----QSFAGFLASGVNLKLMGEANDYVKGKGMNG--GSI I I VPP--AG---TTYEDN-NQ
 S. oleracea GDT--GFAGQLNLTFTGSAG----QSFAGFNLPGIILHLKGEANDYVKGKGMAG--GELIVTPA--EN---PGFRPE-DA
 Anabaena GRD--NFNGNLQLNFVGSAG----QSFAGAFISKGIHLYLKGEANDYVKGKGMNG--GEI I I C P P--IE---QKTSSS-NQ
 Nostoc GDS--GFEGQINLNFTGSVSG----QSFAGFNLPGIILHLKGEANDYVKGKGMHG--GEI I I K P P--TE---ATYDPA-QN
 Synechocyst Fd GNN--GFEGNITLNFQGAAG----QSFAGFNLDMGTLHLQGEANDYVKGKGMNG--GEIVIVPH--PQ---ASFAP E-DA
 C. reinhardtii RRQ--NLAPGKVMIT-LTGSAG----QSLGAFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGMNG--GK I A I V R P P--DK---TGFPVE-DA
 A. acetabul. Fd GDN--GFPGEIKLNLKGSAG----QSSFCFSVRGLVHLEGEANDYIGKGMAG--GDITIVPP--AG---TKFDPS-TA
 C. paradoxa GDR--GFKGKLNLFVGAAG----QSFAGFIVDGMRMRIEGECNGYVKGKGMNG--GEITVVPP--SG---SSISPS-ES
 A. aeolicus GDR--GLPEDTIKLTFRGTAG----QSFAGFNHRGVSLTLIGDANDYVKGKMYG--GRIVIPD--GV---KETDKN---
 E. coli GAADPIKAYFNGTAG----QSFAGVWVNAAGGLKIEVSGDANDYVKGKGMAG--GK I A I R P P--EN---PGFRPE-DA
 P. aeruginosum GNQ--GMAKAPVTFRFKGTAG----QSFAGVWVNAAGGLNMYLEGDANDYVKGKGMTG--GKLVIVPP--KG---SVYKTQ-DS
 Xylella GMH--GMEADPLHLRFRGTAG----QSFAGFNVGGLHLELEGEANDYVKGKGMAG--GCLVVRPP--RG---ARFEAR-HT
 C. carterae A2 GMT--NLAEDHVHVRLRGSAG----QSLGAFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLCG--GK I V V R P M--VS---SPLTSQ-AN
 P. aerugin. Fd GNT--KFNGLKLNLFYGSAG----QSFAGVWVNAAGGLKIEVSGDANDYVKGKGMNG--GEIVIVPP--VD---MAKIDY-NN
 A. spirogr. A2 GMRNALQPDHLTVKLEGSAG----QSLGAFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V R P A--QV---SPLKAD-EN
 A. spirogr. A1 GER--ALPEGRHLVRLTGSAG----QSLGAFSTQGLLLDVIIGDANDYVKGKGLSG--ATIQLRPP--TD---ASYSAG-EN
 R. sphaeroides GMRNNLQPDHLTVKLTGSAG----QSLGAFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V R P Q--ME---SPLVAA-EN
 H. carterae A1 GMT--NLAEDHVHVRLRGSAG----QSLGAFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLCG--GK I V V R P P--MA---SPLVAA-EN
 H. carterae A2 GMRNSLQPDHLTVKLTGSAG----QSLGAFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V R P P--MA---SPLVAA-EN
 C. caldarium A1 GER--ALPEGRHLVRLTGSAG----QSLGAFSTQGLLLDVIIGDANDYVKGKGLSG--ATIQLRPP--TD---ASYSAG-EN
 C. carterae A1 GMK--ALRPGHLTVRMRGSAG----QSLGAFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V R P I--TT---SPLSN-KN
 G. theta A2 GMRNSLQPDHLTVKLTGSAG----QSLGAFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V R P P--MA---SPLVAA-EN
 E. siliculos. A2 GMT--NLAEDHVHVRLRGSAG----QSLGAFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLCG--GK I V V R P M--VS---SPLTSQ-AN
 A. spirogr. A3 GMT--NLAEDHVHVRLRGSAG----QSLGAFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLCG--GK I V V R P M--VS---SPLTSQ-AN
 G. theta A1 GMT--NLAEDHVHVRLRGSAG----QSLGAFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLCG--GK I V V R P M--VS---SPLTSQ-AN
 E. silicul. A1 GAAGLPDGT--IDITFDGSAG----NSFGAFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V R P P--MA---SPLVAA-EN
 A. brasilense GMF--GLQPGHITIRLRGTAG----QSLGAFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V R P T--TS---SPLTN-KN
 Z. mobilis GMD--SLADGHVHVRLRGSAG----QSLGAFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V R P T--VS---SPIDGH-TN
 O. danica N1 GDT--GFAGQVNLTFGLSAG----QSFAGFNLPGIILHLKGEANDYVKGKGMAG--GEIVVTPV--EK---IGFVPE-EA
 P. aeruginosum N KADGLPDDT--VDITFTGSAG----QSFAGFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V R P P--MA---SPLVAA-EN
 A. acetabul. N GEDGLPDDT--ITLRFVGSAG----QSFAGFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V T A--PS---GNQIEAGDN
 B. subtilis GEEGLPDDT--IKLHFTGSAG----QSFAGFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V K S--SE---GFNSASDDN
 C. acetobutyl. GTDGLPDDT--ISIKCNGAAG----QSFAGFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V Y P--PK---KSTFIAEDN
 C. glutamicum RAHQLPDGT--ITLNLQGCAG----NSFGAFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V I K P S--AQ---PKQLKNNPN
 R. etli GHRGLKEDT--INVTLRGTAG----QSFAGFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I I I R P--PE---NSQIQAEDS
 Synechocyst N WE--GLPEDT--VHLHFQGSAG----QSFAGFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V Y P--PK---GSSFIASEN
 B. halodurans GAAGLPDDT--IELTFKGSAG----QSFAGFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V R P--PA---GSTFKAEEN
 S. coelicor GGGGLPDDT--VDITFTGSAG----QSFAGFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V R P--DR---GADHLAEYS
 M. tuberculosis GQQGLPDGT--IDITFDGSAG----NSFGAFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V R P S--DDA---PQDYVAEDN
 V. cholerae KDQGLPQP--MQVKFNGSAG----QSFAGFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V L Y P--NR---NATIVPEEN
 D. radiodurans -PGGLPDDT--VF IQMEGTGG----QSFAGFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V R P--SI---EFRGKAENN
 O. danica N2 GMRNALQPNHLTVKLTGSAG----QSLGAFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V R P P--MM---SPLVAA-NN
 C. elegans GELGLEGRSITIGLKGHAG----QSFAGFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V I F P--PK---AASYKSEEN
 N. crassa GEKGLPDDT--VHVNKGSAG----QSFAGFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V Y P--PR---SAVFKAEEN
 S. cerevis. GEDGLPKDT--VVVNIEGSAG----QSFAGFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V I K P--PK---DSKFKSDEN
 S. pombe GEEGLPDDT--IRVNVFSGAG----QSFAGFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I I I Y P--PR---VSPFKPEEN
 M. sativa NLAGLPDDT--IHQFTGSAG----QSFAGFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V Y P--PK---GNSFDPKDN
 O. sativa HMKGLPAGT--IHVKLTGSAG----QSLGAFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V Y P--PR---DSTFIPEDN
 C. jejuni GKDALDEDS--IHKAIGNAG----NSFGAFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I I A K I--SN---EATFSPEEN
 N. tabacum GDT--GFAGQLNLTFTGSAG----QSFACFLTPGMNIRLIGEANDYVKGKGMAG--GELVVTPV--EN---TGFCPE-DA
 A. spirogr. N1 GHKGLVEDL--VHKLKGTAG----QSFAGFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V Y P--PK---AQQIVPEES
 A. thaliana N HLTGLPKDT--IHKFTGSAG----QSLGAFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V Y P--PK---GSSFDPKEN
 E. siliculos. N GYKGLADD--IAIKLSGTAG----QSFAGFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V R P--PE---NTQITPEKS
 P. boryanum N WN--GLPEDT--VHLHFQGSAG----QSFAGFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V Y P--PA---VSSFDPSN
 H. carterae N GHKGLPNNT--IQLAFEGVAG----QSFAGFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V K Q--PS---YVDRNPTN
 C. caldarium N1 GHKGLVDDL--VHKLKGTAG----QSFAGFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V Y P--PKE---AQKIVPEES
 C. caldarium N2 GHEGLPANT--IQLVFEVAG----QSFAGFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V V K Q--PG---HVDNRNPTN
 A. spirogr. N2 GHAGLPDDT--IWFKLTGVAG----QSFAGFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V R P--DP---ASGNPDES
 L. lactis NAGFL--LKDASVCYEGVAG----QSFAGFVLCQGITLEIFGDANDYVKGKGLSG--GK I V V K P--LD---AAYDIENT
 S. solfatorius YLKGGEIYLSLPIFDITEAPLEYKEAFSWSALALSSAVFDYETIDKYAEVFISSDGRGIARWSRNEIYENSYLLI PADE

A. thaliana Fd1 TIVGNTCLYGATGGLL-FVRGKAGERFAVRNSLAQAVVEGTGDHC-----
 A. thaliana Fd2 VIVGNTCLYGATGGVL-FANGLGGERFAVRNSKGVAVIEGTNDHC-----
 C. caldarium Fd AIVGNTCLYGATGGQV-FVRGRAGERFAVRNSLAEAVVEGAGDH-----C
 G. max TIVGNTCLYGATGGQV-FVRGKAGERFAVRNSLCQAVVEGTGDH-----
 Z. mays ALAGNTLLYGATGGKL-FIGGRVGERFAVRNSGGLAVVEGMGDHG-----
 P. silvestris TIVGNTCLYGATGGRL-FVRGKAGERFAVRNSLAEAVIEGTGDHC-----
 A. spirogr. Fd VILGNTCLYGATGGFL-FAYGAAGERFAVRNSNAFVLEGVGDHA-----
 P. aerugin. Fd VIIGNTCLYGASGGSL-FALGQAGERFCVRNSGATAIEGVGDHA-----
 P. purpurea VIIGNTCLYGATGGYL-FAQQAGERFAVRNSLAKSVVEGVGDH-A-----
 S. oleracea TIVGNTCLYGATGGQI-FVRGKAGERFAVRNSLAEAVVEGTGDHC-----
 Anabaena VILGNTCLYGATGGYL-FANGQAGERFAVRNSNGYSVVEGVGDHA-----
 Nostoc VIVGNTCLYGATGGVL-FANGLGGERFAVRNSKGVAVIEGTNDH--C-----
 Synechocyst Fd VIIGNTCLYGATGGNL-YANGRAGERFAVRNSVGKAVIEGAGDHC-----
 C. rheinhardtii SLLGNTCLYGATGGRL-FVNGRAGERFAVRNSLAEAVVEGAGDHC-----
 A. acetabul. Fd SIVGNTCLYGATGGNI-YVNGRAGERFGVRNSMAEAVVEGAGDHC-----
 C. paradoxa VIVGNTCLYGSTGGRM-FAYGRAGERFGVRNSLGTAVVEGTGDHC-----
 A. aeolicus VIMGNTCLYGATGGYL-FAAGVAGERFAVRNSGATAVIEGAGLHC-----
 E. coli SIIGNTCLYGATGGRL-YAAGRAGERFGVRNSGAIITVVEGIGDNG-----
 P. aeruginosum AIIGNTCLYGATGGKL-FAAGTAGERFAVRNSGAHTVVEGTGDHC-----
 Xylolla PILGNTCLYGATGGEL-FAAGRAGERFAVRNSGALAVIEGAGDHC-----
 C. carterae A2 TIIGNTVLYGATSGYL-YAAGQAGERFAVRNSGADVVEGCGANG-----
 A. spirogr. A2 VIIGNTVLYGATDGYL-FAAGRAGERFGVRNSGAKVVIEGCGSNG-----
 A. spirogr. A1 TIIGNTCLYGATSGHL-YAAGQAGV-FAVRISGAEAVVEGCGAN-G-----
 R. sphaeroides TIIGNTVLYGATDGFLL-FAAGRAGERFAVRNSGAKVVIEGCGSNG-----
 H. carterae A1 TIIGNTVLYGATSGQL-YAAGQAGERFAVRNSGADVVEGCGANG-----
 H. carterae A2 TIIGNTVLYGATDGYL-FAAGRAGERFAVRNSGAKVVIEGCGSN-G-----
 C. caldarium A1 TIIGNTCLYGATSGHL-YAAGQAGVRFVRNSGAEAVVEGCGANG-----
 C. carterae A1 AIIGNTCLYGATDGRLL-FAAGMAGDRFAVRNSGAYTVVEGVGSNG-----
 G. theta A2 TIIGNTVLYGATDGYL-FAAGRAGERFAVRNSGAKVVIEGCGSNG-----
 E. siliculos. A2 TIIGNTVLYGATSGQL-YAAGQAGERFAVRNSGADVVEGCGANG-----
 A. spirogr. A3 TIIGNTVLYGATSGQL-YAAGQAGERFAVRNSGADVVEGCGAN--G-----
 G. theta A1 TIIGNTVLYGATSGQL-YAAGQAGERFAVRNSGADVVEGCGANG-----
 E. silicul. A1 VIVGNVLYGATSGRA-FFRGKAGERFAVRNSGAIIVVEGCGDHG-----
 A. brasilense TIIGNTVLYGATAGKL-FAAGQAGERFAVRNSGATVVVEGCGSNG-----
 Z. mobilis TIIGNTVLYGATAGKL-FAAGRAGERFAVRNSGAETVIEECGANG-----
 O. danica N1 TIVGNTCLYGATGGQI-FARGKAGERFAVRNSLAEAVVEGTGDH-C-----
 P. aerugineum N IIIGNVAFYGATSGEA-YIRGKAGERFAVRNSGTSVVVEGVGDHG-----
 A. acetabul. N VIAGNIALYGATSGEA-YINGRAGERFAVRNSGVNVVVEGIGDGH-----
 B. subtilis VIIGNVAFYGATSGEA-YINGRAGERFAVRNSGVNVVVEGIGDGH-----
 C. acetobutyl. I IIGNVALYGATSGKV-FINGIAGERFCVRNSGATAVVEGVGAH-G-----
 C. glutamicum I IAGNVLYGATSGEL-FIRGQVGERFCVRNSGATAVVEGIGNHG-----
 R. etli I IIVGNTVLYGATEGEC-YFRGVAGERFAVRNSGAIIVVEGVGDHG-----
 Synechocyst N I IAGNVCLYGATAGEV-YISGMVGERFCVRNSGVNTVVEAVGDH-G-----
 B. halodurans V I IIGNTSFGYATSGEA-FIRGQAGERFCVRNSGVNVVIEGMGDHG-----
 S. coelicor TIAGNTIGYGATGGEM-FLRGKAGERFCVRNSGALVVSEGVGDH-G-----
 M. tuberculosis I IIGNVILFYGATSGEV-YLRGVVGERFAVRNSGAHAVVEGVGDHG-----
 V. cholerae I IVVGNVCFYGATSGES-YIRGLAGERFCVRNSGAKVVVEGIGDH-G-----
 D. radiodurans I I IIGNTALYGATSGEA-YFRGVAGERFAVRLSGASAVVEGTGDHG-----
 O. danica N2 T I IIGNTVLYGATDGYL-FAAGRAGERFAVRNSGAKVVVEGCGSN--G-----
 C. elegans S V I IIGNVALYGATSGDC-WFRGVAGERFAVRNSGANVIEAVGDHG-----
 N. crassa I I IIVGNVCLYGATSGTC-FFRGVAAERFAVRNSGATAVVEGVGDHG-----
 S. cerevis. V I IIVGNTCFYGATSGTA-FISGSAGERFGVRNSGATIVVERIKGNNA-----
 S. pombe M I I IIGNVCLYGATSGHA-FISGVAAERFAVRNSGAIIVVEGVGDH--G-----
 M. sativa I I I IIGNVALYGATRGEA-YFNGMAAERFCVRNSGALAVVEGVGDHG-----
 O. sativa I I I IIGNVALYGATIGEA-YFNGMAAERFCVRNSGAQAVVEGIGDGH-----
 C. jejuni I I I IAGNACLYGATKGEV-YLDGIAGERFCVRNSGALAVVLTGTGVHG-----
 N. tabacum T I I I V G N T C L Y G A T G G Q V - F V R G K A G E R F A V R N S L A N A V V E G T G D H C -----
 A. spirogr. N1 I I I I V G N T V L Y G A V E G E C - Y F R G V A G E R F A V R N S G A I A V V E G A G D H -----C-----
 A. thaliana N I I I I I G N V A L Y G A T S G E A - Y F N G M A A E R F S V R N S G A K A V V E G L G D H G -----
 E. siliculos. N I I I I I G N T A L Y G A V T G E C - Y F Q G V A G E R F G V R N S G A V A V V E G C G D H G -----
 P. boryanum N I I I I I G N V A M Y G A T K G E V - Y I N G I A G E R F C V R N S G V N T V V E G V G D H G -----
 H. carterae N I I I I I V G N T V L Y G A V A G E A - Y F N G V A G E R F A V R N S G A V A V V E G T G D H - G -----
 C. caldarium N1 I I I I V G N T V L Y G A V E G E C - Y F R G V A G E R F A V R N S G A I A V V E G A G D H C -----
 C. caldarium N2 I I I I V G N T V L Y G A V A G E A - Y F N G V A G E R F A V R N S G A V A V V E G T G D H G -----
 A. spirogr. N2 M I I I V G N T V L Y G A V N G E C - Y F R G I A G E R F A V R N S G A I A V V E G A G D H G -----
 L. lactis S I I I V G N V S L F G A I G G E A - Y F R G R A G E R C G V R N S G A H F V V E G T G D H G -----
 S. solfatorius N V I D E V I G M G V Q G F I I D E D S G N S D L E L V V S A L D T K L K E V G V R N H Y D I L A K S S R -----

7.8 Liste verwendeter Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
abs.	absolut
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	copyDNA
cm	Zentimeter
D	Dalton
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dNTP	Desoxynucleotidtriphosphat
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
et al.	et alter
Fd-GOGAT	Ferredoxin-GOGAT
g	Erdbeschleunigung
g	gramm
G	Guanin
GOGAT	Glutamat-Synthase
h	Stunde
k	Kilo
kb	Kilobase
m	Milli
M	Molar
MCS	multiple cloning site
min	Minute
μ	mikro
mRNA	messenger RNA
N-GOGAT	NAD(P)H-GOGAT
PCR	polymerase chain reaction
pH	potentia hydrogenii
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
RT	Raumtemperatur
RT	reverse transcription
s	Sekunde
T	Thymin
TAC	Tris/Acetat/EDTA
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TE	Tris/EDTA
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Unit
U	Uracil
u.a.	unter anderem
ü.N.	über Nacht
UV	Ultraviolett
V	Volt
vgl.	vergleiche
v/v	volume per volume
VT	Volumenteile
W	Watt
w/v	weight per volume
X-Gal	Galaktopyranosid
z.B.	zum Beispiel

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Zetsche danke ich für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, seine stete freundliche Bereitschaft zur Diskussion und seine hilfreichen Tipps.

Herrn Prof. Dr. Zetsche und Herrn Prof. Dr. Forchhammer danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Der DFG sowie der Justus-Liebig-Universität Gießen danke ich für die Bereitstellung der Mittel für die Anfertigung der Arbeit.

Herrn Dr. Klaus Valentin danke ich für das interessante Thema.

Allen ehemaligen Mitarbeitern des Pflanzenphysiologischen Instituts danke ich für die gute Zusammenarbeit und insbesondere Heiko Vogel ich für manch hilfreichen praktischen Tipp und Elke Stahlheber für das nette Arbeitsklima. Hanne Kwapisch hat mir in ihrer aktiven Zeit bei der Anzucht der Algen sehr geholfen.

Prof. Dr. Maier danke ich dafür, dass er mir die DNA aus *G. theta* überlassen hat.

Jon Hughes und seiner gesamten Arbeitsgruppe möchte ich für die sehr nette Aufnahme ins neue Institut danken, Christoph Vorreiter für manchen Tipp und Frank Landgraf für die interessanten Diskussionen beim Tee auch über fachliche Fragen hinaus.

Auch Susanne Viehmann hat mir zu manchem einen guten Ratschlag gegeben.

Jochen Harbott danke ich dafür, dass ich ihn stets mit Computerfragen belästigen durfte.

Meinem Sohn David danke ich für seine Geduld abzuwarten, bis Mama mit der „alten Arbeit“ endlich fertig ist und dafür, dass er der netteste Ausgleich zum Laboralltag war.