

Inhaltsverzeichnis

I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	13
1.	Chemikalien und Enzyme	13
2.	Bakterienstämme, Plasmide, Phagen und Oligonukleotide	14
3.	Nährmedien und Kultivierungsbedingungen	16
4.	Molekulargenetische Methoden	18
4.1	Allgemeine genetische und rekombinante DNA Techniken	18
4.2	Synthese und Reinigung von Oligonukleotiden	19
4.3	Amplifikation von DNA-Fragmenten durch die Polymerase Kettenreaktion	20
4.4	DNA-Sequenzierung	20
4.5	Oligonukleotid-gerichtete Mutagenese	21
5.	Bestimmung von Enzymaktivitäten	22
5.1	Herstellung zellfreier Rohextrakte	22
5.2	Bestimmung der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase-Aktivität	23
5.3	Bestimmung der Glukose Dehydrogenase-Aktivität	24
5.4	Bestimmung der Glukonolaktonase-Aktivität	24
6.	Proteinchemische Methoden	25
6.1	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese	25
6.2	Western-Blot-Analyse	25
6.3	Anreicherung der Glukonolaktonase aus <i>Rhodotorula rubra</i>	26
6.4	Zellfraktionierung von <i>Z. mobilis</i>	26
7.	'Pulse-chase'-Experimente mit <i>Z. mobilis</i>	27
8.	Import der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase in isolierte Thylakoide	28
8.1	<i>In vitro</i> Synthese von radioaktiv-markiertem GFOR-Vorstufenprotein	28
8.2	Präparation von isolierten Thylakoiden (Erbsen)	31

8.3	<i>In thylakoido</i> Importexperimente	31
III.	Ergebnisse	35
1.	Das Zwillingsarginin-Motiv der Signalsequenz ist essentiell für einen effizienten Export der GFOR in <i>Z. mobilis</i>	35
1.1	Die Zwillingsarginin-Muteine der GFOR akkumulieren als Vorstufenproteine in enzymatisch aktiver Form im Cytoplasma von <i>Z. mobilis</i>	36
1.2	Die Zwillingsarginin-Muteine der GFOR werden in „Pulse-chase“-Experimenten nicht prozessiert	39
2.	Die feste NADP-Anbindung ist Voraussetzung für einen effizienten GFOR-Export	40
2.1	Die NADP-Bindemuteine der GFOR werden über die Cytoplasmamembran transloziert	42
2.2	Die NADP-Bindemuteine werden im Vergleich zur Wildtyp-GFOR langsamer prozessiert	45
3.	Der GFOR-Export in <i>Zymomonas mobilis</i> erfolgt über einen Sec-alternativen Weg	47
3.1	Die Gegenwart eines β -Galaktosidase-GFOR-Fusionsproteins hemmt den Export der Wildtyp-GFOR	48
3.2	Das β -Galaktosidase-GFOR-Fusionsprotein hemmt nicht den Sec-vermittelten Export des OmpA-Proteins in <i>Zymomonas mobilis</i>	51
4.	Der Export der GFOR erfolgt vermutlich nach Ausbildung einer mindestens dimeren Oligomerstruktur	53
5.	Untersuchungen zum <i>in vitro</i> Transport der GFOR in Thylakoide aus Erbsenkeimlingen	57
5.1	Das bakterielle Redoxenzym GFOR wird effizient in isolierte Thylakoide importiert	58
5.2	Der Transport der GFOR in isolierte Thylakoide erfolgt über den Δ pH-Weg	61
5.3	Der Thylakoidimport der GFOR kann durch ein Δ pH-Substrat inhibiert werden	64
5.4	Das konservierte Zwillingsarginin-Motiv der GFOR ist auch für den Δ pH-Import in Thylakoide essentiell	66
5.5	Der Thylakoidimport der NADP-Bindemutante K121A ist stark gehemmt	68
IV.	Diskussion	71
1.	Rolle des Zwillingsarginin-Motives in der GFOR-Signalsequenz	72

2.	Export des Redoxkofaktors der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase	76
3.	Sec-unabhängiger Export der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase in das Periplasma von <i>Z. mobilis</i>	80
4.	Import der Glukose-Fruktose Oxidoreduktase in Thylakoide	86
5.	Ausblick	90
V.	Zusammenfassung	93
VI.	Literaturverzeichnis	95
VII.	Anhang	