

Ein ERAD-abgeleiteter
Präproteintranslokator in der
periplastidären Membran der
Chromalveolaten?

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften
Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Maik Sascha Sommer

aus Koblenz

Marburg 2007

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität
als Dissertation angenommen am:

2007

Erstgutachter: Prof. Dr. Uwe-G. Maier
Zweitgutachter: Prof. Dr. Klaus Lingelbach

Tag der Disputation am:

2007

"Um klar zu sehen, genügt oft ein Wechsel der Blickrichtung."
Antoine de St. Exupéry

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Sommer MS, Gould SB, Lehmann P, Gruber A, Przyborski JM, Maier UG. 2007. Der1-mediated pre-protein import into the periplastid compartment of chromalveolates? *Mol Biol Evol.* 24(4):918-928; doi: 10.1093/molbev/msm008.

Weitere Publikationen:

Gould SB, **Sommer MS**, Kroth PG, Gile GH, Keeling P, Maier UG. 2006. Nucleus-to-nucleus gene transfer and protein retargeting into a remnant cytoplasm of cryptophytes and diatoms. *Mol Biol Evol* 12:2413-2422.

Gould SB, **Sommer MS**, Hadfi K, Zauner S, Maier UG. 2006. Protein targeting into the complex plastid of cryptophytes. *J Mol Evol* 62:674-681.

Übersichtsartikel, Buchbeiträge:

Sommer MS, Gould SB, Kawach O, Klemme C, Voss C, Maier UG, Zauner S. 2006. Photosynthetic organelles and endosymbiosis. In *Genome Evolution in Eukaryotic Microbes*, Katz LA, Bhattacharya D (ed). Oxford: Oxford University Press:94-108.

Kawach O, **Sommer MS**, Gould SB, Voss C, Zauner S, Maier UG. 2006. Nucleomorphs: remnant nucleär genomes. In *Genome Evolution in Eukaryotic Microbes*, Katz LA, Bhattacharya D (ed). Oxford: Oxford University Press:192-200.

Hjorth E, Hadfi K, Gould SB, Kawach O, **Sommer MS**, Zauner S, Maier UG. 2005. Zero, one, two, three, and perhaps four. Endosymbiosis and the gain and loss of plastids. *Endocytobiosis Cell Res* 15:459-468.

Inhaltsübersicht

Publikationen	4
Inhaltsübersicht	5
Inhaltsverzeichnis	6
Abkürzungen und Symbole	9
Tabellen und Abbildungen	11
1 Vorbemerkungen	13
2 Einleitung	14
3 Zielsetzung	35
4 Ergebnisse	36
5 Diskussion	62
6 Zusammenfassung	78
7 Material und Methoden	80
8 Anhang	93
9 Literatur	102
Danksagung	114
Erklärung	115

Inhaltsverzeichnis

Publikationen	4
Inhaltsübersicht.	5
Inhaltsverzeichnis	6
Abkürzungen und Symbole	9
Tabellen und Abbildungen	11
1 Vorbemerkungen.	13
2 Einleitung	14
2.1 Phototrophe Eucyten	14
2.1.1 Primäre und sekundäre Plastiden	14
2.1.2 Sekundäre Plastiden der Chromalveolata	16
2.2 Plastidärer Proteinimport	19
2.2.1 Proteinimport in primäre Plastiden	19
2.2.2 Proteinimport in sekundäre Plastiden	22
2.3 ER-Proteinqualitätskontrolle	23
2.3.1 Die „ <i>Unfolded Protein Response</i> “	25
2.3.2 ER-assoziierte Degradation von Proteinen	24
2.4 <i>Guillardia theta</i> als Modellorganismus	31
3 Zielsetzung	35
4 Ergebnisse	36
4.1 Symbiontspezifische ERAD-Faktoren in Cryptophyten	36

4.1.1 GT_ORF201, ein nucleomorphcodiertes Der1-Homolog	36
4.1.2 Gt_ORF201 ist funktionell und strukturell ortholog zu Der1p	38
4.1.3 Gt_ORF201 ist ein Protein der periplastidären Membran	41
4.1.4 Weitere nucleomorphcodierte ERAD-assoziierte Faktoren	46
4.1.5 Das Genom der Cryptophyta codiert für ein zweites, wirtspezifisches ERAD-System	50
4.2 Symbiontspezifische ERAD-Faktoren in anderen Chromalveolaten	51
4.2.1 Faktoren in Heterokontophyta und Haptophyta	51
4.2.2 Faktoren in Apicomplexa und Dinophyta	54
4.2.3 Analyse der PPC- bzw. Apicoplastzielsteuerungssequenzen	58
5 Diskussion	62
5.1 sDer1 & Co.	62
5.2 ERAD als Translokator	63
5.3 sDer1 & Co., Translokator der periplastidären Membran?	66
5.3.1 Implikation für den Importmechanismus	67
5.3.2 Evolution des TPM	73
5.4 Der "ERAD" TPM - mehr als ein Modell?	77
6 Zusammenfassung	78
7 Material und Methoden	80
7.1 Chemikalien und Reagenzien	80
7.2 Medien, Puffer und Lösungen	80
7.3 Antikörper	80
7.4 Oligonucleotide	81
7.5 Vektoren	82
7.6 Organismen	82
7.7 Datenbankanalyse	83
7.8 Zellkultur und Transformation/-fektion	83
7.9 Isolation von DNA und RNA	85

7.10 Amplifikation von DNA/RNA	85
7.11 Agarosegelelektrophorese	86
7.12 Restriktion und Ligation	86
7.13 Sequenzierung	87
7.14 Expression rekombinater Proteine	87
7.15 Subfraktionierung von <i>Guillardia theta</i>	88
7.16 Herstellung von Proteinrohextrakten	88
7.17 SDS-PAGE	89
7.18 Immundetektion von Proteinen	89
7.19 <i>Pulse-Chase</i> Analyse	90
7.20 Elektronen- und Fluoreszenzmikroskopie	91
8 Anhang	93
8.1 <i>Guillardia theta</i> Subfraktionierung	93
8.2 Protein-Identifikationsnummern	95
8.3 PPC-Zielsteuerungssequenzen	97
8.4°Sequenzen	99
9 Literatur	102
Danksagung	114
Erklärung	115

Abkürzungen und Symbole

Ø	Durchmesser	ERQC	<i>ER-Quality-Control</i>
(v/v)	volume per volume	g	Gramm, 10 ⁻³ kg
(w/v)	weight per volume	GA	Golgi-Apparat
°C	Grad Celsius	GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
µl	Microliter, 10 ⁻⁶ l	Gyr	<i>Gigayears, 10⁹ Years</i>
µm	Micrometer, 10 ⁻⁶ m	h	<i>Hour(s), Stunde(n)</i>
µM	Micromolar, 10 ⁻⁶ M	HRP	<i>Horse Radish Peroxidase</i>
A	SI-Einheit Ampere	Hsp	<i>Heat Shock Protein</i>
AAA	<i>ATPase Associated With Various Cellular Activities</i>	IEM	<i>Inner Plastid Envelope Membrane</i>
BFA	Brefeldin A	IgG	Immunglobulin G
BiP	<i>(luminal) Binding Protein</i>	kDa	Kilodalton, 10 ³ Da
bp	<i>Basepair(s), Basenpaar(e)</i>	kg	SI-Einheit Kilogramm
BTS	<i>Bipartite Topogenic Signal</i>	lx	SI-Einheit Lux
Cdc	<i>Cell Division Cycle</i>	M	mol l ⁻¹
CNX	Calnexin	mA	Milliampere, 10 ⁻³ A
CP	Chloroplast	Mbp	Megabasenpaar(e), 10 ⁶ bp
CTR	Calreticulin	MI	Mitochondrien
Cue	<i>Coupling of ubiquitin conjugation to ERAD</i>	min	<i>Minute(s), Minuten(n)</i>
CYT	Cytosol	ml	Milliliter, 10 ⁻³ l
d	<i>Day(s); Tag(e)</i>	mm	Millimeter, 10 ⁻³ m
ddH ₂ O	Wasser, doppelt destiliert	mM	Millimolar, 10 ⁻³ M
ddNTP	Didesoxyribonucleotid(e)	Mns1p	<i>Mannosidase-like</i>
Der	<i>Degradation At The ER</i>	Myr	<i>Megayears, 10⁶ Years</i>
Dfm	<i>Derlin Family Member</i>	NM	Nucleomorph
DNA	Desoxyribonucleinsäure	nm	Nanometer, 10 ⁻⁹ m
EMS	Endomembransystem	NO	Nucleolus
ER	<i>Endoplasmic Reticulum, Endoplasmatisches Retikulum</i>	Npl	<i>Nuclear Protein Localisation</i>
ERAD	<i>ER-associated Degradation</i>	NU	Nucleus
ERL	ER-Lumen	OD	Optische Dichte
ERM	ER-Membran	OEM	<i>Outer Plastid Envelope Membrane</i>
		PDI	<i>Protein Disulphide Isomerase</i>

PE	<i>Plastid Evelope,</i> Plastidenhülle	TPM-R	TPM-Rezeptor
PG	Peptidoglycan	TR	Trichocysten
pM	Picomolar, 10 ⁻¹² M	u	<i>Unit</i>
PP	Protoplast	UBA	<i>Ubiquitin Activating</i>
PPC	<i>Periplastid Compartment,</i> periplastidäres Kompartiment	UBC	<i>Ubiquitin Conjugating</i>
PPM	<i>Periplastid Membran,</i> periplastidäres Membran	UBL	<i>Ubiquitin-like</i>
PS	Plastidenstroma	UBX	<i>Ubiquitin-regulatory</i>
Psb	<i>Photosystem b</i>	UFD	<i>Ubiquitin Fusion Degradation</i>
psi	<i>Pounds Per Square Inch</i>	UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
PTS	<i>Peroxisomal Targeting Signal</i>	VE	Vestibulum
PXL	<i>peroxisomal Lumen,</i> peroxisomales Lumen/Stroma	yr	<i>Year(s), Jahr(e)</i>
PXM	<i>peroxisomal Membrane,</i> peroxisomale Membran		
PY	Pyrenoid		
RER	<i>rough ER, raues ER</i>		
RING	<i>Really Interesting New Gene</i>		
RNA	Ribonucleinsäure		
RP	Rhodoplast		
rpm	<i>Revolution(s) Per Minute,</i> Umdrehung(en) pro Minute		
RT	<i>Room Temperature,</i> Raumtemperatur		
s	<i>Second(s), Sekunde(n)</i>		
S	Sedimentationskonstante, 10 ⁻¹³ s (Svedberg)		
SP	<i>Signal Peptide, Signalpeptid</i>		
SPP	SP-Peptidase		
ST	<i>Starch, Stärke</i>		
TIC	<i>Translocator Of The Inner</i> <i>Envelope Membrane Of</i> <i>Chloroplast</i>		
T _M	<i>Melting Temperature,</i> Schmelztemperatur		
TOC	<i>Translocator Of The Outer</i> <i>Envelope Membrane Of</i> <i>Chloroplast</i>		
TOM	<i>Translocator Of The Outer</i> <i>Envelope Membrane Of</i> <i>Mitochondria</i>		
TP	<i>Transit Peptide, Transitpeptid</i>		
TPM	<i>Translocator Of The</i> <i>Periplastid Membran</i>		

Tabellen und Abbildungen

Tab. 4-1: Nucleomorphcodierte ERAD-Komponenten.	50
Tab. 4-2: Wirt- bzw. Symbiontspezifische ERAD-Faktoren in Chromalveolaten.	56
Tab. 8-1: Auflistung der PPC-Zielsteuerungssequenzen identifizierter symbiontspezifischer ERAD-Komponenten.	97
Abb. 2-1: Symbiogenese der primären Plastiden.	15
Abb. 2-2: Symbiogenese der sekundären Plastiden.	17
Abb. 2-3: Präproteinimport in primäre bzw. sekundäre Rhodoplasten.	21
Abb. 2-4: Posttranslationale Prozesse im ER.	25
Abb. 2-5: Divergente Mechanismen der ER-assoziierten Degradation.	27
Abb. 2-6: Cytosolische Ubiquitylierungskaskade zum Abbau retrotranslozierter ERAD-Substrate.	30
Abb. 2-7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von <i>Guillardia theta</i>	32
Abb. 2-8: Import nucleuscodierter Präproteine.	34
Abb. 4-1: Der1p, Dfm1p und Gt_ORF201 im Vergleich.	37
Abb. 4-2: Komplementationsexperimente in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	40
Abb. 4-3: Antikörperspezifitätstest.	42
Abb. 4-4: Immundetektion von Gt_ORF201 <i>in situ</i>	43
Abb. 4-5: Vergleichende Analyse von Gt_ORF201 in <i>Guillardia theta</i> Proteinfractionen.	45
Abb. 4-6: Hrd1p und Gt_ORF477 im Vergleich.	47
Abb. 4-7: Cdc48p, Gt_sCdc48 und Gt_sCdc48-like Protein im Vergleich.	48
Abb. 4-8: Ufd1p und Gt_sUfd1 im Vergleich.	48
Abb. 4-9: Vergleich von Gt_sUbc-21kDa mit Abb. 4-9: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Ubc1p, Ubc6p und Ubc7p.	49

Abb. 4-10: Wirt- und symbiontspezifische Der1-Proteine	
Abb. 4-10: in <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	53
Abb. 4-11: Symbiontspezifische ERAD-Faktoren in Chromalveolaten mit PPM.	57
Abb. 4-12: <i>In vivo</i> Lokalisation von <i>Phaeodactylum tricornutum</i> PPC-Zielsteuerungssequenzen fusioniert an GFP.	59
Abb. 4-13: <i>In vivo</i> Lokalisation der Pf_sDer1-1 Apicoplastzielsteuerungssequenz fusioniert an GFP.	61
Abb. 5-1: ERAD als Translokator.	65
Abb. 5-2: Modell zum Import nucleuscodierter Präproteine in das periplastidäre Kompartiment von Cryptophyten.	71
Abb. 5-3: Pt_sUb und <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Polyubiquitin im Vergleich.	76
Abb. 8-1: Gradienten der Plastiden- bzw. Symbiontisolation im Vergleich.	93
Abb. 8-2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer intakten <i>Guillardia theta</i> Zelle im Vergleich zu einer isolierten Plastide bzw. dem Symbiont mit RER.	94
Abb. 8-3: Multiple Sequenzalignments PPC- bzw. Apicoplast- Zielsteuerungssequenzen in graphischer Darstellung.	98

1 Vorbemerkungen

Zum Geleit: Die in dieser Arbeit durchgeführte Datenbankanalyse zur Identifikation ERAD-homologer Proteine in den Genomen der Chromalveolaten basierte im Wesentlichen auf dem Modell von *Saccharomyces cerevisiae*. Daher erfolgte die Bezeichnung der in Kapitel 4 beschriebenen Gene bzw. Proteine in Anlehnung an die für Hefe gängige Nomenklatur. Dem eigentlichen Gen- bzw. Proteinamen wurde, ein durch einen Unterstrich getrenntes Präfix, bestehend aus den Initialen von Gattungs- und Artnamen des jeweiligen Organismus vorangestellt. Die Bezeichnung s oder h gibt zudem an, ob es sich bei dem besagten Protein um einen wirt- (*host*) oder symbiontspezifischen und -lokalisierten Faktor handelt. Gen-Namen sind *kursiv* dargestellt. Alle identifizierten Faktoren sind unter den im Kapitel 8 angegebenen Protein-Identifikationsnummern in den Genomdatenbanken der entsprechenden Organismen zu finden.

Zur Verwendung der Begriffe "sekundärer Symbiont" und "sekundäre Plastide" in dieser Arbeit: Die Bezeichnung "sekundäre Plastide" bei Chromalveolaten ist ein in der gängigen Literatur häufig verwendeter aber irreführender Begriff und meint bei Cryptophyten, Heterokontophyten, Haptophyten und Apicomplexa den sekundären Symbionten zuzüglich der ihn vom Wirt abgrenzenden (ER-)Membran. Der Bezeichnung "Symbiont" beschreibt die Gesamtheit der auf die ursprüngliche Rhodophyte zurückgehenden Kompartimente, d.h. die primäre Plastide, periplastidäres Kompartiment und periplastidäre Membran, ohne die auf den Wirt zurückzuführende äußere Membran. Als (primäre) Plastide werden die procaryotischen Kompartimente des sekundären Symbionten, d.h. der ursprüngliche Rhodoplast mit seinen beiden Hüllmembranen bezeichnet. In Dinophyten, bei der die sekundäre Plastide nur von drei Membranen begrenzt wird, können die Begriffe "Symbiont" und "Plastide" kongruent verwendet werden. Die einzelnen die sekundäre Plastide umgebenden Membranen werden von außen nach innen mit erster, zweiter, usw. Membran bezeichnet.

2 Einleitung

2.1 Phototrophe Eucyten

2.1.1 Primäre und sekundäre Plastiden

Plastiden sind die charakteristischen Organellen phototropher Eucaryoten. Sie gehen auf die Aufnahme und Integration eines ancestralen Cyanobakteriums in eine heterotrophe, prototypische Eucyte zurück. In diesem von Margulis 1970 als primäre Endosymbiose beschriebenen Ereignis Margulis, 1970; Cavalier-Smith, 2003, entstand ein intertaxonisches Konsortium, das durch sukzessive Reduktion und massiven Transfer genetischer Information vom pro- zum eucyten Genom zu einem semiautonomen Organell wurde, das von zwei Hüllmembranen umgeben ist Cavalier-Smith, 2000; Martin et al., 2002. Erste Spuren dieser primären Plastiden lassen sich anhand molekularer Uhren auf ein Alter von etwa 1.5 - 1 Gyr datieren Yoon et al., 2004. Sie finden sich heute in den Linien der Rotalgen (Rhodophyta), Grünalgen (Chlorophyta) und in sehr ursprünglicher Form auch in der kleinen Gruppe der Glaucophyta, die sich phylogenetisch vor etwa 550 Myr von den beiden ersten Gruppen abzweigte Cavalier-Smith, 2003. Diese werden, zusammen mit den aus den Grünalgen hervorgegangenen Landpflanzen heute als Archaeplastida bezeichnet Adl et al., 2005. Phylogenetische Analysen belegen einen monophyletischen Ursprung aller primär phototrophen Organismen Martin et al., 2002; Yoon et al., 2004; Rodriguez-Ezpeleta et al., 2005 [Abb. 2-1].

Im Gegensatz zu den primären Plastiden stehen die so genannten sekundären Plastiden, die aus einer sekundären Endosymbiose hervorgegangen sind. Unter sekundärer Endosymbiose versteht man die laterale Weitergabe von Plas-

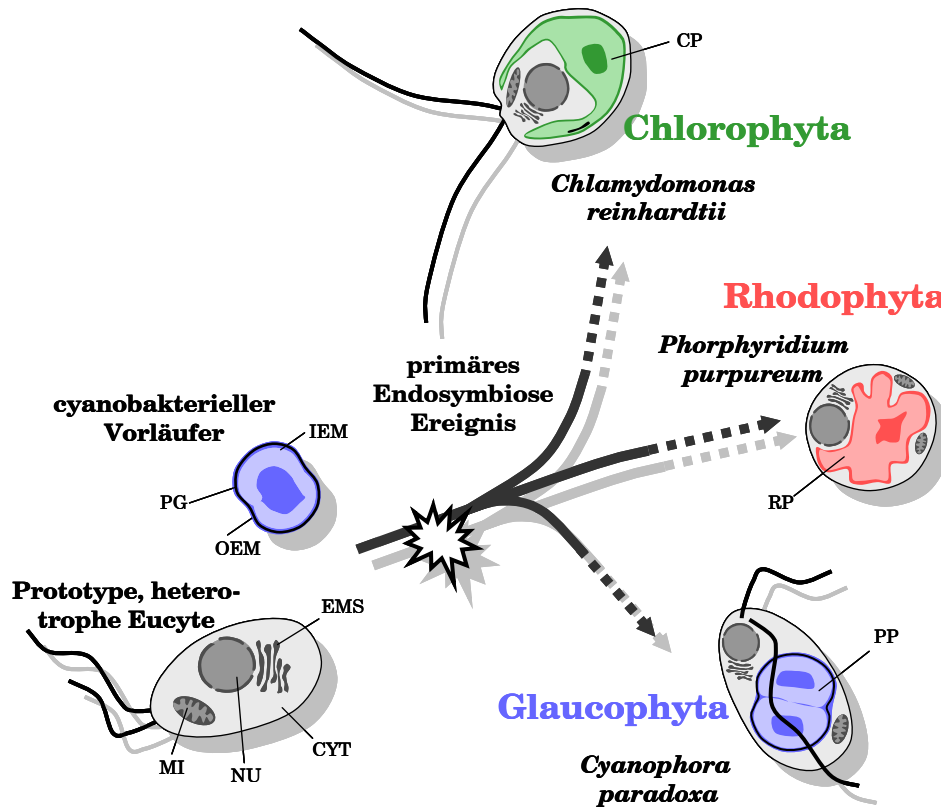


Abb. 2-1: Symbiogenese der primären Plastiden.

Aus dem monophyletischen Ereignis der primären Endosymbiose (Stern) sind drei rezente Linien hervorgegangen: die Rhodophyta, die Chlorophyta und die kleine Gruppe der Glaucophyta. Dargestellt sind morphologisch typische Vertreter dieser Gruppe. CYT, Cytosol; OEM, äußere Membran; IEM, innere Membran; MI, Mitochondrium; NU, Nucleus; PG, Peptidoglycan; EMS, Endomembransystem; CP, Chloroplast; RP, Rhodoplast; PP, Protoplastide oder Cyanell.

tiden, d.h. die Aufnahme und Integration ganzer, bereits phototropher Eucyten in andere heterotrophe Eucyten, und deren sukzessive Reduktion zu Organellen, die von drei oder vier Hüllmembranen umgeben sind (McFadden, 2001; Stoebe and Maier, 2002; Cavalier-Smith, 2003). Das Zusammentreffen zweier unterschiedlicher eu- und dreier procaryotischer Genome vermittelte diesen eucaryoten Chimeren die genetische Potenz, erfolgreich unterschiedlichste Lebensräume zu besiedeln und sich an ein breites Spektrum ökologischer Bedingungen anzupassen (Hjorth et al., 2005). Ungleich der primären war die sekundäre Endosymbiose ein

polyphyletisches Ereignis, das mehrmals unabhängig voneinander vorgekommen ist Cavalier-Smith, 2003. Klassisch werden zwei Gruppen sekundär phototropher Eucaryoten unterschieden, die „rote Linie“, deren Symbiont eine prototypische Rotalge war und die „grüne Linie“, deren Symbionten auf ancestrale Grünalgen zurückgehen McFadden, 2001; Hjorth et al., 2005 [Abb. 2-2]. Bereits Ende 1999 erkannte Cavalier-Smith die Monophylie der „roten Linie“ und gruppierte die Chromista Heterokontophyta, Haptophyta und Cryptophyta nach Cavalier-Smith, 1986 zusammen mit den Alveolata Dinophyta und Apicomplexa nach Cavalier-Smith, 1993 zu den Chromalveolata Cavalier-Smith, 1999. Dies konnte durch zahlreiche phylogenetische Analysen bestätigt werden Zhang et al., 2000; Yoon et al., 2002; Harper and Keeling, 2003; Harper et al., 2005. Im Gegensatz zur roten gehen die Euglenophyta und Chlorarachniophyta der „grünen Linie“ auf zwei voneinander unabhängige Endosymbioseereignisse zurück Rogers et al., 2006. Erste Spuren sekundär phototropher Eucyten finden sich vor etwa 850 Myr Cavalier-Smith, 2006.

2.1.2 Sekundäre Plastiden der Chromalveolata

Die hohe morphologische und physiologische Komplexität sekundär phototropher Organismen, aufgrund etwa der neuerlich entstandenen Kompartimente und der massiven Neuordnung des genetischen Materials, führte zur Prägung des Begriffes der Metaalgen Cavalier-Smith, 2003. Während die Morphologie der primären Plastiden, sowohl bei den Rot- und Grünalgen als auch bei den Glaucophyta sehr ähnlich ist, treten die sekundären Plastiden der Metaalgen und ihrer nicht photosynthetischen Verwandten in recht unterschiedlichen Erscheinungsformen auf Hjorth et al., 2005. Dies kann im Besonderen bei den Chromalveolata beobachtet werden.

Die Plastide der Cryptophyta stellt den ursprünglichsten der sekundären Plastidentypen dar. Cryptophyta sind evolutionäre Zwischenstufen, deren Plastiden noch das Relikt des ursprünglichen Rhodophytennucleus, das Nucleomorph, aufweisen, das in dem remanenten Cytoplasma der Rotalge zwischen dem inneren und äußeren Membranenpaar der Plastidenhülle (*Plastid Envelope*, PE), dem periplastidären Kompartiment (*Periplastid Compartment*, PPC), eingebettet ist Greenwood et al., 1977. Modellorganismus dieser Gruppe ist die marine Cryptophyte *Guillardia theta* [vgl. 2.4], deren Nucleomorphgenom bereits 2001 vollständig sequenziert wurde Zauner et al., 2000; Douglas et al., 2001, und deren Genomprojekt voraussichtlich 2007 beginnt. Neben den Cryptophyta

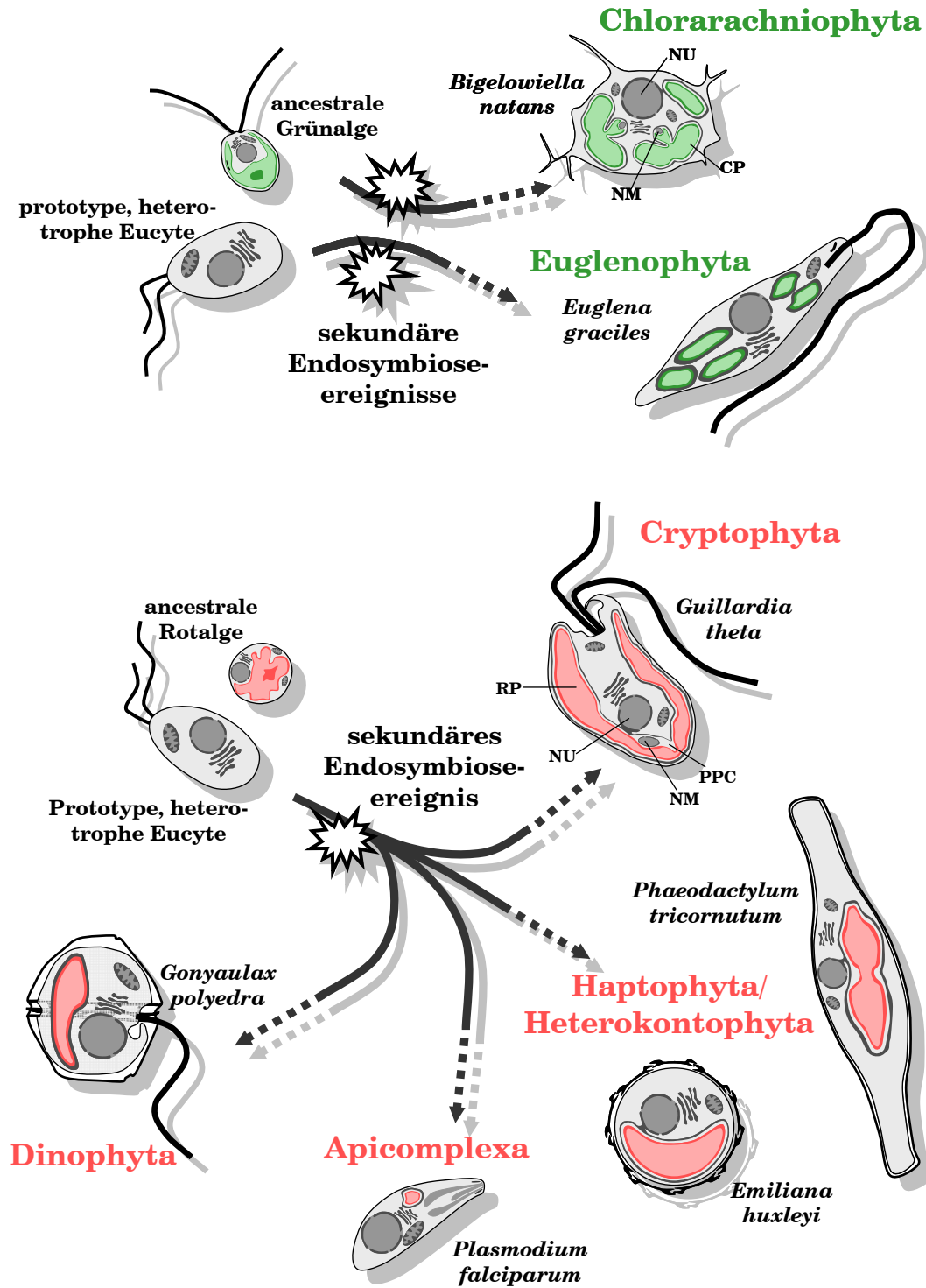


Abb. 2-2: Symbiogenese der sekundären Plastiden.

Pseudophylogenetische Darstellung der sekundären Endosymbioseereignisse (Sterne). CP, Chloroplast; RP, Rhodoplast; NM, Nucleomorph; NU, Nucleus; PPC, periplastidäres Kompartiment. Erläuterungen siehe Text.

weisen nur die Chlorarachniophyta in der grünen Linie einen Nucleomorph auf Hibberd and Norris, 1984.

Die Plastiden der Heterokontophyta und Haptophyta besitzen eine ähnliche Morphologie wie die der Cryptophyta, allerdings ist das Nucleomorph bei diesen Gruppen bereits vollständig reduziert [Abb. 2-2]. Modellorganismen der Heterokontophyta sind bislang die penete bzw. zentrale Kieselalge (Diatomeen) *Phaeodactylum tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana*, deren 26 bzw. 31 Mbp großen Genome kürzlich vollständig sequenziert wurden (PhatrDB v2.0; ThapsDB v2.0). Aufgrund ihres ubiquitären Vorkommens sind Kieselalgen verantwortlich für ca. 20 % der globalen Biosynthese. Durch ihre sie umhüllende silikatreiche Kieselchale spielen sie zudem eine wichtige Rolle im globalen Kohlendioxid- und Silikatkreislauf. Modellorganismus der Haptophyta ist die kokkale, kosmopolitische Haptophyte *Emiliana huxleyi*, deren Genomprojekt voraussichtlich 2007 zum Abschluss gebracht werden kann. Der sekundäre Symbiont der Cryptophyta, Heterokontophyta und Haptophyta liegt gewöhnlich in einer perinucleären Zisterne des endoplasmatischen Reticulums der Wirtszelle, das funktionell als Teil des rauen ER (Rough-ER, RER) betrachtet wird Cavalier-Smith, 2003. Im Gegensatz dazu sind die Plastiden der Apicomplexa und Dinophyta nicht mit dem ER assoziiert Cavalier-Smith, 2003. Ein vollständiger, sekundärer Verlust der Plastide innerhalb der Chromalveolata kann bei *Phytophthora* beobachtet werden Tyler et al., 2006.

Die Apicomplexa sind eine kleine Gruppe meist pathogener Organismen, wie zum Beispiel *Toxoplasma gondii*, Verursacher der Toxoplasmose und *Plasmodium falciparum*, Erreger der Malaria, die Ursache für jährlich Tausende von Todesfällen in ihren endemischen Gebieten sind. Aufgrund ihrer intrazellulären parasitischen Lebensweise ist die Plastide der Apicomplexa zu einem nicht mehr photosynthetisch aktiven Organell, dem Apicoplast, „verkümmert“ Delwiche and Palmer, 1997 [Abb. 2-2]. Obwohl dieser als absolut essentiell für diese Organismen gilt, da in seinem Lumen die u. a. Lipid-, Häm- und Isoprenoidbiosynthese stattfindet Wilson et al., 2003; Waller and McFadden, 2005, konnte der Apicoplast in einigen Arten, wie beispielsweise in *Cryptosporidium parvum*, Erreger der diarrhöischen Cryptosporidose, eine für nicht immunge-

schwächte Patienten vergleichsweise harmlose Durchfallerkrankung, vollständig eliminiert werden Huang et al., 2004. Mit 9 Mbp hat *Cryptosporidium parvum* im Gegensatz zu *Plasmodium falciparum* (23 Mbp) und *Toxoplasma gondii* (65 Mbp) das mit Abstand kleinste bekannte Genom dieser Gruppe (CryptoDB v3.3; PlasmoDB v5.1; ToxoDB v4.0).

Peridininhaltige Dinoflagellaten (Dinophyta) wie zum Beispiel *Gonyaulax polyedra* oder *Heterocapsa triquetra* besitzen sekundäre Plastiden, die nur von drei Membranen umhüllt sind. Dies kann sonst nur bei den Plastiden der Euglenophyta beobachtet werden. Man geht davon aus, dass auch diese Plastiden ursprünglich von vier Membranen begrenzt wurden, von denen eine im Lauf der Evolution verloren gegangen ist bzw. zwei miteinander verschmolzen sind Cavalier-Smith, 2000; 2003 [Abb. 2-2].

2.2 Plastidärer Proteinimport

Eine dauerhafte Etablierung bzw. Integration einer phototrophen Pro- oder Eucyte als intrazelluläres Organell bedingt die genetische Kontrolle der Wirtsüber die Symbiontenzelle. Ein solcher Zustand wurde bei den primären und sekundären Plastiden durch drei wesentliche Prozesse erreicht: (i) durch die Aufnahme und Adaption symbiontischer Gene in das Wirtsgenom und ihrer subsekutiven Eliminierung am Ursprunglokus, (ii) dem Verlust redundanter symbiontischer Gene und (iii) dem Zugewinn neuer den Zustand stabilisierender Gene Cavalier-Smith, 2000; Martin et al., 2002. Unabhängig vom neuen Genlokus, werden die meisten der codierten Proteinfunktionen innerhalb des Organells benötigt. Dies setzt das Vorhandensein geeigneter Transportsysteme zum Reimport dieser Genprodukte in das Organell voraus, bevor diese Gene an ihrem Ursprungsort deletiert werden können Hjorth et al., 2005.

2.2.1 Proteinimport in primäre Plastiden

Bei primären Plastiden wird das *gros* der nucleuscodierten plastidären Proteine von den sequenziell hintereinander geschalteten Translokatoren TOC/TIC (*Translocators Of The Outer/Inner Envelope Membrane Of Chloroplasts*) der äußeren und inneren Plastidenmembran importiert. Der Transport findet an Kontaktstellen zwischen äußerer und innerer Membran (*Outer/Inner Envelope*

Membrane, OEM/IEM) statt, die zu importierenden Proteine sind als Präproteine mit einer N-terminalen Zielsteuerungssequenz, dem so genannten Transitpeptid (TP), codiert Jarvis and Robinson, 2004; Soll and Schleiff, 2004, das spezifisch von Rezeptoren des TOC/TIC-Apparates erkannt und gebunden wird. Die Proteine werden im Cytosol an freien Ribosomen synthetisiert und sind zur Aufrechterhaltung ihrer transportkompetenten Konformation vor und während des Transports mit Chaperonen assoziiert (u. a. BiP, Hsp70/14-3-3), die ein vor schnelles Falten der Proteine verhindern sollen. TOC und TIC gehen auf modifizierte Translokatoren der ehemaligen Plasmamembran des procaryotischen Symbionten zurück, die dort den Transport der Proteine in umgekehrter Weise über die Plastidenmembran ermöglichen. Das Transitpeptid findet seinen Ursprung vermutlich in der für die Sekretion nötigen *Leadersequence* sekretierter Proteine Cavalier-Smith, 2000 [Abb. 2-3]. Toc75 bildet dabei den eigentlichen Kanal der äußeren Membran, das Protein Toc34 den Rezeptor. Tic22 vermittelt anschliessend den Transport über den Tic-Komplex, dessen Kanal von Tic110 und möglicherweise von Tic20 gebildet wird. Tic62 besitzt vermutlich eine regulatorische Funktion Soll and Schleiff, 2004.

In höheren Pflanzen werden einige nucleuscodierte plastidäre Proteine als Präprotein mit einem N-terminalen Signalpeptid, ähnlich dem klassischer sekretorischer Proteine codiert. Villarejo et al. konnten zeigen, dass diese Proteine cotranslational ins ER importiert, N-glycosyliert und über den sekretorischen Weg in Vesikel des Golgi-Apparates in die Plastide transportiert werden Villarejo et al., 2005.

2.2.2 Proteinimport in sekundäre Plastiden

Entsprechend ihrer morphologischen Gemeinsamkeiten ist auch die Art und Funktion des Proteinimportmechanismus bei allen primären Plastiden im Wesentlichen gleich. So kommen TOC und TIC bzw. ihre prototypischen Vorläufer ubiquitär bei Chloro-, Rhodo- und Glaucophyta vor McFadden and van Dooren, 2004; Steiner and Löffelhardt, 2005. Im Gegensatz dazu stehen die sekundären Plastiden. Sie werden von ein oder zwei zusätzlichen Membranen begrenzt und sind morphologisch komplexer und diverser als ihre procaryotischen Analoga [vgl. 2.1]. Dieser Umstand bedingt nicht nur, dass die Importmechanismen für nucleuscodierte plastidäre Proteine bei einzelnen Plastidentypen divergieren, sondern auch, dass ihre Physiologie in weiten Teilen unerforscht ist.

Nucleuscodierte plastidäre Proteine bei Organismen mit sekundären Plastiden tragen eine zweiteilige N-terminale Zielsteuerungssequenz (*Bipartite Topogenic Signal Sequence*, BTS), bestehend aus einem klassischen ER-Signalpeptid (SP) gefolgt von einem Transitpeptid, ähnlich dem nucleuscodierter Plasti-

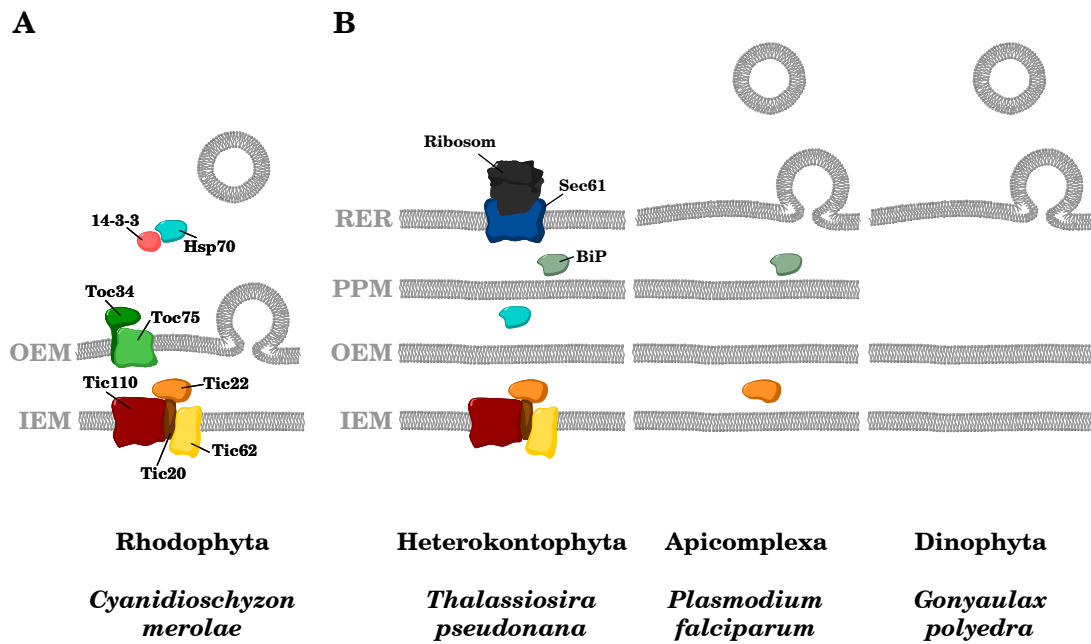


Abb. 2-3: Präproteinimport in primäre bzw. sekundäre Rhodoplasten.

A. Die primäre Plastide der Rhodophyta im Vergleich mit **B.** den verschiedenen sekundären Plastiden der Chromalveolata. **A.** Das *gros* nucleuscodierter plastidärer Proteine erreicht das Stroma der Plastide über die Translokatoren TOC und TIC der äußeren (OEM) und inneren (IEM) Plastidenmembran. Alternativ erreichen einige Proteine wie bei höheren Pflanzen die Plastide möglicherweise über den sekretorischen Weg (Vesikel) **B.** Import in Plastiden mit 3 und 4 Hüllmembranen. Die Plastide der Heterokontophyta liegt in einer perinucleären Cisterne des ER. Nucleuscodierte plastidäre Proteine gelangen cotranslational in den Raum zwischen rauer ER (RER) und periplastidärer Membran (PPM). Die Plastiden der Apicomplexa und Dinophyta sind nicht mit dem ER assoziiert. Nucleuscodierte plastidäre Proteine gelangen über einen modifizierten sekretorischen Weg zur Plastide. Zur Aufrechterhaltung der transportkompetenten Form sind sie bis zu ihrer endgültigen Faltung vor und während der Passage der Membranen chaperonassoziiert. Der Transport über die IEM sekundärer Plastiden wird vermutlich von TIC-homologen Translokatoren gewährleistet. Einzelne TIC-Komponenten wurden in den Genomen der Cryptophyta, Heterokontophyta und Apicomplexa identifiziert. Näheres siehe Text.

denproteine primärer Plastiden DeRocher et al., 2000; Wastl and Maier, 2000; Nassoury et al., 2003; Kilian and Kroth, 2005. Die BTS bzw. ihre funktionellen Analoga ist ubiquitär für alle Organismen mit sekundären Plastiden unabhängig von der Morphologie ihrer Plastide.

Die Plastide der Cryptophyta, Heterokontophyta und Haptophyta liegt innerhalb des rauen ER der Wirtszelle. Präproteine gelangen, wie sekretorische Proteine auch, über das Signalpeptid ihrer BTS cotranslational in das raue ER, von wo aus sie nach Abspaltung des Signalpeptids zur Plastide rekrutiert und über die verbleibenden drei Membranen transportiert werden. Dabei werden sie anhand ihres Transitpeptides spezifisch erkannt und von gewöhnlichen sekretorischen Proteinen getrennt Gould et al., 2006b. Die zugrunde liegenden Mechanismen sind bislang nicht bekannt, vermutlich wird der Transport über die letzten beiden Membranen, dem eigentlichen *Plastid Envelope*, über TOC- und TIC-homologe Translokatoren bewerkstelligt. Einzelne TIC-Komponenten wurden in der Tat in den Genomen der Cryptophyta und Heterokontophyta identifiziert Douglas et al., 2001; Armbrust et al., 2004. Über den Transportmechanismus der zweiten, so genannten periplastidären Membran (*Periplastid Membrane*, PPM), die vermutlich auf die ehemalige Plasmamembran des Symbionten zurückgeht, ist bislang nichts bekannt Cavalier-Smith, 2000 [vgl. Abb. 2-2].

Die stark reduzierte Plastide der Apicomplexa (Apicoplast) ist nicht mit dem ER assoziiert. Die nucleuscodierten Apicoplastproteine werden cotranslational am rauen ER synthetisiert und möglicherweise über einen modifizierten Sekretionsmechanismus in Vesikeln verpackt zum Apicoplast transportiert. Das Transitpeptid der BTS verhindert dabei die Sekretion dieser Proteine und vermittelt ihre Passage zum Apicoplast. Ob der Vesikelfluss dabei über den Golgi-Apparat oder direkt zum Apicoplast erfolgt, ist umstritten vgl. DeRocher et al., 2000; Waller et al., 2000; DeRocher et al., 2005; Tonkin et al., 2006b.

Die Plastide der Dinophyta ist nur von drei Membranen begrenzt. Cavalier-Smith postulierte einen Verlust der zweiten, ehemaligen Plasmamembran des sekundären Symbionten Cavalier-Smith, 2000. Wie bei den Apicomplexa wird der Transport initial über das raue ER bewerkstelligt. Dabei werden die Proteine direkt cotranslational über eine zweite hydrophobe Region des Signalpeptids, die als eine Art Signalanker fungiert, in die ER-Membran inseriert, von wo aus sie über Vesikel des Golgi-Apparates zur äußeren Plastidenmembran gelangen. Dort, ins Lumen zwischen äußerster Membran und Plastidenhülle entlassen, vermittelt das Transitpeptid den Transport über die verbleibenden zwei Membranen Nassoury et al., 2003.

2.3 ER-Proteinqualitätskontrolle

Das endoplasmatische Retikulum ist eines der vielseitigsten Kompartimente innerhalb der eucaryoten Zelle. Neben der Fähigkeit zur Proteinfaltung und -modifikation lumenaler sekretorischer bzw. membrangebundener Proteine, besitzt es ein Kontrollsystem zur Überwachung dieser Prozesse (ERQC, *ER-Quality-Control*). Missgefaltete Proteine aggregieren und akkumulieren im ER und rufen die *Unfolded Protein Response* (UPR) hervor, eine zelluläre Stressantwort, die diesen Prozessen entgegenwirkt. Kann dennoch die korrekte Faltung nicht erfolgen, werden die Proteine aus dem ER ins Cytosol der Zelle exportiert und degradiert. Dieser Prozess wird als *ER-Associated Degradation* (ERAD), Retrotranslokation oder Dislokation bezeichnet Tsai et al., 2002; Meusser et al., 2005. Neben der Funktion im Rahmen der ERQC besitzen UPR und ERAD auch regulatorische Aufgaben Friedlander et al., 2000; Ng et al., 2000.

2.3.1 Die „Unfolded Protein Response“

Drei Klassen von Chaperonen und Faltungsenzymen existieren im ER: Chaperone der Hsp70-Familie, u. a. das lumenale *Hsp70-like Binding Protein* (BiP) und seine Hsp40-Cochaperone, die Chaperone der Lectin-Familie Calnexin/Calreticulin und Thioloxydoreduktasen der *Protein Disulphide Isomerase* (PDI) Familie Fewell et al., 2001. Sie interagieren bereits mit der naszierenden Polypeptidkette und ermöglichen ihre Faltung, Oligomerisation, Reifung und Modifikation (z.B. Ausbildung von Disulfidbindungen, Glycosylierung). Nach Einnahme ihrer nativen Konformation werden die Proteine aus ihrer Bindung entlassen und dem sekretorischen Weg zugeführt. Liegen vermehrt un- bzw. missgefaltete Proteine im ER vor, reduziert sich durch anhaltende Chaperonbindung die Konzentration freier Faltungshelfer und die UPR wird ausgelöst. Sensor, dieser Antwort in *Saccharomyces cerevisiae* ist die membranständige Serin/Threonin-Kinase Ire1p Hampton, 2000. Sie konkurriert mit ungefalteten Proteinen um freies BiP. Kann keine Bindung erfolgen, dimerisiert Ire1p und katalysiert auf cytosolischer Seite der ER-Membran das Spleissen der *HAC1*-mRNA Sidrauski and Walter, 1997. Das daraufhin synthetisierte Protein Hac1p dient als Aktivator für eine vermehrte Expression faltungsassistierender Faktoren, sowie der vermehrten Synthese von Komponenten des ER-assoziierten Degradationssystems Travers et al., 2000.

2.3.2 ER-assoziierte Degradation von Proteinen

Entgegen früherer Annahmen, nach denen der Abbau missgefalteter Proteine durch Proteasen im ER von statten geht Klausner and Sitia, 1990, erfahren missgefaltete Proteine ihren Abbau tatsächlich im Cytosol durch das Ubiquitin/Proteasom-System Hiller et al., 1996; McCracken and Brodsky, 1996. Dies führte zur Entdeckung des heute als ERAD bezeichneten Prozesses, des selektiven Proteinexports zur proteasomalen Degradation missgefalteter lumenaler und membranständiger Proteine. Er ist heute in *Saccharomyces cerevisiae* und im Säugermodell am besten untersucht und lässt sich im Wesentlichen in die Schritte (i) Substraterkennung/-markierung, (ii) Dislokation und (iii) Polyubiquitylierung/Degradation unterteilen Tsai et al., 2002.

Schon während ihrer cotranslationalen Synthese wird die naszierende Polypeptidkette eines sekretorischen Proteins spezifisch glycosyliert. Bei der N-Glycosylierung wird ein Oligoglucan der Struktur $\text{Glc}_3\text{Mn}_9\text{GlcNAc}_2$ über sein terminales N-Acetylglucosamin auf die freie Aminogruppe des Asparagins des Aminosäuretriplets Asn-X-Ser bzw. Asn-X-Thr übertragen und durch Glucosidasen sukzessive zu $\text{Mn}_9\text{GlcNAc}_2$ reduziert Helenius and Aebi, 2001. Nur Proteine, die sowohl ihre native Konformation eingenommen haben als auch ein korrektes Glycosylierungsmuster besitzen, können das ER als sekretorisches Protein in Richtung Golgi-Apparat verlassen. Um dies zu gewährleisten, treten die modifizierten Seitenketten mit den Lectinen Calnexin/Calreticulin (CNX/CRT) in Wechselwirkung, die die Proteine im ER bis zum Erreichen ihrer nativen Struktur zurückhalten und über wiederholte Glycosylierungs- (zu $\text{GlcMn}_9\text{GlcNAc}_2$) und Bindungszyklen ähnlich wie bei Chaperonen eine Art Zeitfenster zur Ausbildung der korrekten Proteinstruktur definieren Jakob et al., 1998. Bei Überschreiten dieses „Zeitfensters“ wird ein terminaler Mannosylrest des N-Glycans ($\text{Mn}_9\text{GlcNAc}_2$ zu $\text{Mn}_8\text{GlcNAc}_2$) abgespalten und ein erneutes Reglycosylieren verhindert. Das Protein verliert seine Affinität zu CNX/CRT und kann über den reduzierten $\text{GlcNAc}_2\text{-Mn}_8$ -Rest das membranständige α -Mannosidase-like Protein Htm1p binden Jakob et al., 2001. Htm1p, ebenfalls ein Protein der Lectin-Familie, leitet die für den Abbau markierten Proteine in einem komplexen Zusammenspiel mit BiP, PDI und Yos9p zur Retrotranslokation an den ERAD-Kernkomplex weiter Tsai et al., 2001; Kabani et al., 2003. Yos9 überwacht diese Prozesse und gewährleistet die Integrität des Systems Denic et al., 2006 [Abb. 2-4].

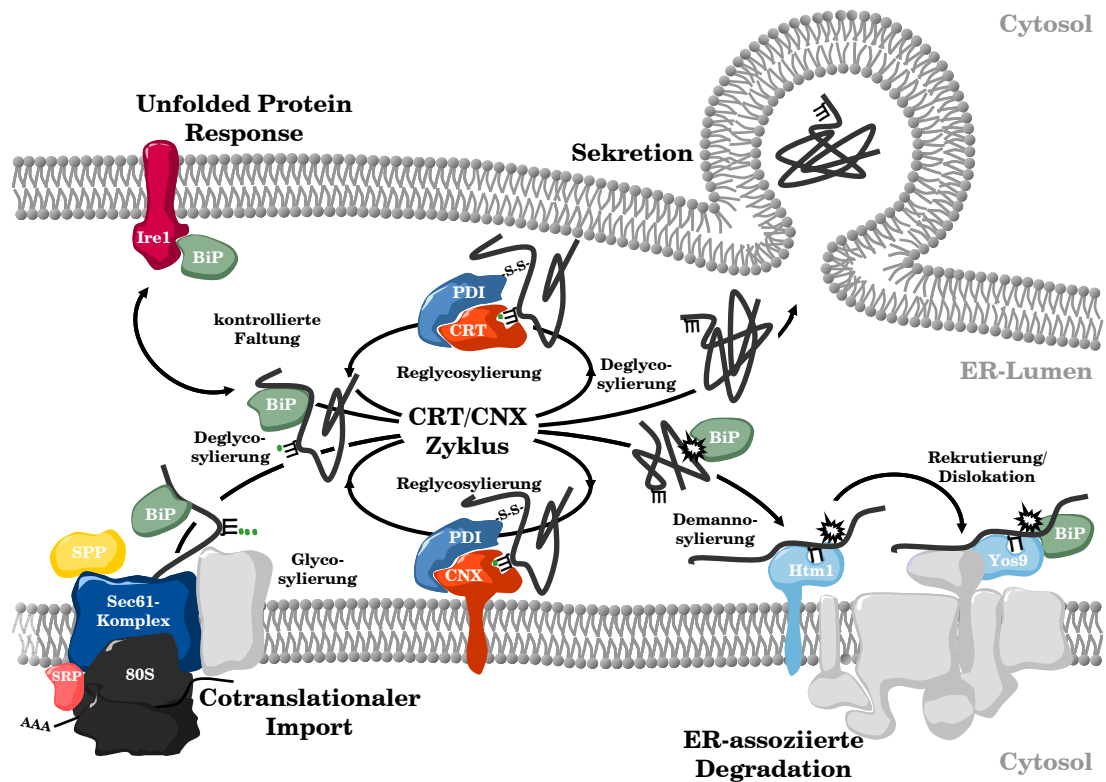


Abb. 2-4: Posttranslationale Prozesse im ER.

Bereits während der cotranslationalen Synthese sekretorischer Proteine wird auf die naszierende Peptidkette ein N-Glycan der Struktur $\text{Glc}_3\text{Mn}_9\text{GlcNAc}_2$ (E^{\dots}) übertragen und sukzessive zu $\text{GlcMn}_9\text{GlcNAc}_2$ (E^{\bullet}) deglycosyliert. In einem komplexen Zusammenspiel von BiP, PDI und CNX/CRT, werden sie dann in ihre native Konformation gebracht. Dazu binden sie an CNX/CRT, die ihnen ein Zeitfenster zur Einnahme ihrer vollständigen nativen Konformation eröffnen und somit ihre verfrühte Sekretion verhindern. Nach Abspaltung des terminalen Glucosylrestes (zu E) werden die Proteine aus ihrer Bindung entlassen und dem sekretorischen Weg zugeführt. Kann die korrekte Faltung nicht erfolgen, werden die Proteine zu $\text{GlcMn}_9\text{GlcNAc}_2$ reglycosyliert und durchlaufen eine erneute Bindung an CNX/CRT. Bei anhaltender Missfaltung, kann die Reglycosylierung durch Abspaltung eines terminalen Mannosylrestes von α -Mannosidase 1 (Mns1p) verhindert werden. In ihrer $\text{Mn}_8\text{GlcNAc}_2$ -Form (E^{III}) werden die Proteine spezifisch von Htm1p erkannt und im Zusammenspiel mit BiP und Yos9p zur ihrem Abbau ins Cytosol zurück transportiert. Akkumulieren vermehrt ungefaltete Proteine im ER, kann durch die Induktion der *Unfolded Protein Response* via Ire1p die Transkription von Chaperonen, Faltungshelfern und Komponenten der Degradationsmaschinerie erhöht werden aus Helenius and Aebi, 2004, modifiziert.

Die räumliche Trennung von Substraterkennung und -degradierung bedingt, zumindest für lösliche Substrate, die Existenz eines spezifischen Translokators. Coimmunpräzipitations- und Crosslinkingexperimente in Hefe zeigen eine enge Assoziation verschiedener ERAD-Substrate mit Komponenten des ER Proteinimportkanals Sec61 Wiertz et al., 1996; Pilon et al., 1997; Bebok et al., 1998; Plemper et al., 1998. Daher wurde eine bidirektionale Funktion postuliert, bei dem die Dislokation unter Rekrutierung spezifischer Faktoren in einem zum Import gegenläufigen Prozess von statten geht Plemper et al., 1999. Dies jedoch setzt eine völlige Entfaltung der zu translozierenden Substrate voraus. Im Gegensatz zur naszierenden Polypeptidkette, die das ER-Lumen ungefaltet erreicht, gelangen ERAD-Substrate z. T. nur teilentfaltet ins Cytosol Tirosh et al., 2003, so dass der Sec61-Kanal aufgrund seiner Größe ungeeignet für den Transport der zudem stark glycosylierten Proteine erscheint Tsai et al., 2002; Meusser et al., 2005. Zudem ist die Degradation einiger ERAD-Substrate unabhängig von Sec61p, siehe z. B. Walter et al., 2001. In Hefe bilden die Proteine Sec61p, Sbh1p/Shb2p und Sss1p den ternären Sec61-Komplex. Die Vermessung der Kristallstruktur von SecYEG, dem Archeahomolog, zeigt eine Uhrglas-förmige Struktur der Sec61-Pore, die den Transport von Proteinen mit einem Durchmesser von höchstens 10 - 12 Å ermöglichen würde. Einige künstliche ERAD-Substrate, wie beispielsweise das fassförmige GFP fusioniert an das membranständige Protein US2/11 des humanen Cytomegalovirus, besitzen im Gegensatz dazu einen geschätzten Durchmesser von etwa 24 - 40 Å Tirosh et al., 2003. Über die Flexibilität des Sec61-Kanals ist wenig bekannt jedoch sagen alternative Berechnungen einen Durchmesser der Pore von 40 - 60 Å während des cotranslationalen Proteinimports voraus Tsai et al., 2002; Meusser et al., 2005.

Aufgrund zahlreicher physikalischer Wechselwirkungen untereinander und mit anderen essentiellen ERAD-Komponenten werden alternativ die mehrfach die ER-Membran durchspannenden Proteine Der1p Hitt and Wolf, 2004; Lilley and Ploegh, 2004; Ye et al., 2004 und/oder die RING-Finger-Ubiquitin-Ligase Hrd1p Gauss et al., 2006b als potentielle Kandidaten diskutiert, entweder alleine, gemeinsam oder auch mit Sec61p einen permanenten Kanal oder eine transiente Pore zur Dislokation der löslichen ERAD-Substrate auszubilden Meusser et al., 2005.

Tatsächlich ist die Degradation löslicher bzw. membrangebundener Proteine mit lumenaler missgefalteter Domäne abhängig von Hrd1p (*HMG-CoA Reductase Degradation*) und Der1p Bordallo et al., 1998; Bays et al., 2001a. Der1p (*Degradation At The ER*, Derlin-1 in Säugern) besitzt vier Membrandurchgänge und war eines der ersten identifizierten Proteine des ERAD-Systems. Es ist es-

sentiell für die Degradation löslicher ERAD-Substrate Knop et al., 1996; Hitt and Wolf, 2004. Hrd1p bildet mit dem ebenfalls membranständigen Protein Hrd3p einen heterodimeren Komplex. Es durchspannt die ER-Membran sechs mal, wobei die C-terminale RING-H2-Domäne (*Really Interesting New Gene*) ins Cytosol ragt und für die Ubiquitin-Ligase-Funktion verantwortlich ist Deak and Wolf, 2001; Nadav et al., 2003. Das Glycoprotein Hrd3p ist C-terminal in der ER-Membran verankert und besitzt eine große lumenale Domäne zur Erkennung Mn8-markierter Proteine. Seine Interaktion mit Hrd1p stabilisiert den Komplex und verhindert eine Autoubiquitinylierung und somit Degradation des Hrd1p. Damit bildet der Hrd-Komplex zusammen mit den bereits erwähnten Proteinen Htm1p, Yos9p und Bip eine Art *Interface* zwischen ERQC und ERAD zur Überwachung und Koordination der Prozesse beidseits der ER-Membran Gardner et al., 2000; Gauss et al., 2006a. Zusammen mit Der1p und Usa1p, einem Membranprotein mit N-terminaler UBL (*Ubiquitin-like*) Domäne, bildet das Hrd1p/Hrd3p-Dimer einen nahezu stöchiometrischen Kernkomplex, der die Prozesse der Substraterkennung, -dislokation und -ubiquitinylierung löslicher Proteine zusam-

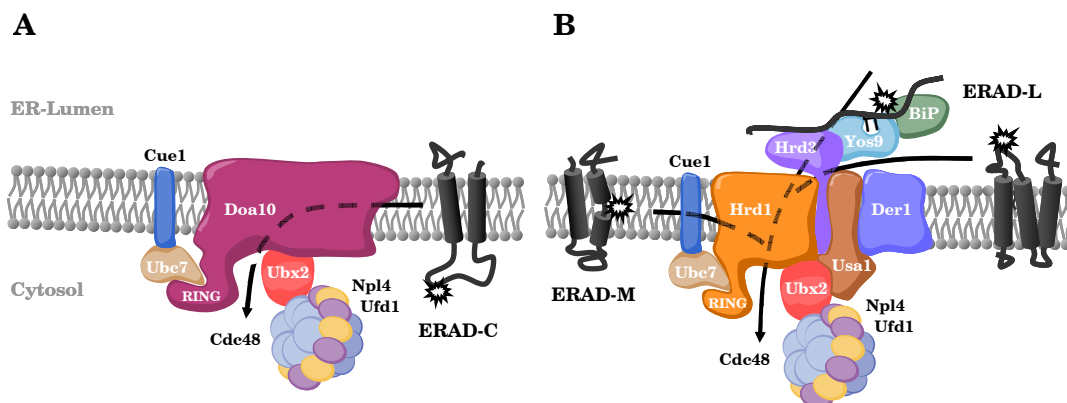


Abb. 2-5: Divergente Mechanismen der ER-assoziierten Degradation.

A. Der Doa10p-Komplex zur Extraktion membranboundener Proteine mit cytosolischen Läsionen (ERAD-C Substrate). **B.** Hrd1p-Komplex zur Extraktion Membranboundener Proteine mit missgefalteten Bereichen innerhalb der Membran (ERAD-M Substrate) bzw. missgefalteten lumenalen Domänen (ERAD-L Substrate). Mn8-glycosylierte (☞) lösliche ERAD-L Substrate werden spezifisch von Yos9 und BiP erkannt und zur Dislokation zum Hrd1p-Komplex rekrutiert. Während ERAD-M und -C Substrate direkt von Cdc48p aus der Membran gezogen werden, werden ERAD-L Substrate über einen putativen Kanal aus Hrd1p und/oder Der1p in Cytosol disloziert (in dunkelgrau, Läsionen mit Sternen markiert). Modell nach Ismail und Ng, 2006; modifiziert.

menführt Carvalho et al., 2006 [Abb. 2-5A]. Die Degradation von Proteinen mit missgefalteten Bereichen innerhalb der Membran ist im Gegensatz dazu unabhängig von Der1p und Usa1p, bedarf aber des heterodimeren Hrd1/Hrd3-Komplexes. Membranständige Proteine mit missgefalteten cytosolischen Bereichen werden in einem alternativen Weg unter Beteiligung der CH-RING-Finger-Ubiquitin-Ligase Doa10p, ein ebenfalls mehrfach die Membran durchspannendes Protein, degradiert Carvalho et al., 2006 [Abb. 2-5B].

Auf cytosolischer Seite sind unterschiedlichen Mechanismen der Substratrekrutierung und -dislokation konvergent, da die vollständige Extraktion aller ERAD-Substrate aus der ER-Membran durch die ubiquitinabhängige ATPase Cdc48p (p97 in Säugern) bewerkstelligt wird Ye et al., 2001; Jarosch et al., 2002 (Abb. 2-6). Cdc48p (*Cell Division Cycle*) besitzt eine kurze N-terminale Proteinbindedomäne gefolgt von zwei aufeinander folgenden ATPase-Domänen des Typs AAA (*ATPase Family Associated With Various Cellular Activities*). Diese bilden eine homohexamere ringförmige Struktur mit einem zentralen Kanal von 15 Å Durchmesser Huyton et al., 2003. Über die Bindung spezifischer Cofaktoren wird Cdc48p für spezielle Aufgaben innerhalb der Zelle rekrutiert. Zusammen mit Shp1p (p47 in Säugern) ist es beispielsweise an Prozessen der homotypischen Membranfusion der ER-Membran beteiligt Latterich et al., 1995. Mit Dfm1p (*Der1 Family Member*), einem weiteren Protein der Der1-Familie Hitt and Wolf, 2004, ist Cdc48p an Prozessen der ER-Homeostase beteiligt Sato and Hampton, 2006. Für die ER-assoziierte Degradation bildet jede Untereinheit einen ternären Komplex mit Ufd1p und Npl4p Bays et al., 2001b. Dabei bindet sowohl Ufd1p (*Ubiquitin-fusion Degradation*) als auch Npl4p (*Nuclear Protein Localisation*) über einen komplexen Mechanismus an die N-terminale Domäne des Cdc48p. Die Zink-Finger-Domäne des Npl4p sowie die N-terminale Domäne des Ufd1p vermittelt die Erkennung bzw. Bindung ubiquitinylierter Substratproteine Bruderer et al., 2004. Der Komplex wird über die Ubx (*Ubiquitin-regulatory X*) Domäne des Proteins Ubx2p an die ER-Membran rekrutiert Neuber et al., 2005; Schubert and Buchberger, 2005 und assistiert bei der vollständigen Extraktion der ubiquitinylierten Substratketten aus der Membran. Dies geschieht möglicherweise über strukturelle Veränderungen während einer alternierenden ATP-Hydrolyse, bei der eine Rotation der AAA-Domänen zueinander erfolgt, die ein Öffnen oder Schließen des zentralen Kanals und eine Veränderung der Konformation der flexiblen N-Domäne bewirken Rouiller et al., 2000; 2002. Lilley und Ploegh und andere konnten für Der1p/Derlin-1 und Hrd1p/Hrd1 eine direkte Interaktion mit Cdc48p/p97 nachweisen Lilley and Ploegh, 2004; Ye et al., 2004; 2005; 2005; Carvalho et al., 2006.

Noch während der Translokation werden die Proteine durch Polyubiquitylierung für ihren proteasomalen Abbau markiert [Abb. 2-6]. Die Übertragung von Ubiquitinresten auf ein Substratprotein (Ubiquitylierung) erfolgt dabei in einer Enzymkaskade unter Beteiligung der Enzyme E1, E2 und E3. In Hefe sind neben den bereits genannten Ubiquitin-Ligasen (E3) Hrd1p und Doa10p die ERAD-spezifischen ubiquitinkonjugierenden Enzyme (E2) Ubc1p, Ubc6p und Ubc7p (*Ubiquitin Conjugating*) Friedlander et al., 2000, sowie das ubiquitinaktivierende Enzym (E1) Uba1p (*Ubiquitin Activating*) McGrath et al., 1991 an der Ubiquitylierung von ERAD-Substraten beteiligt.

Ubc1p und Ubc7p sind lösliche Proteine, während Ubc6p mit seiner C-terminalen Domäne in der ER-Membran verankert ist Sommer and Jentsch, 1993. Ubc7p wird durch Interaktion mit Cue1p (*Coupling Of Ubiquitin-conjugation To Endoplasmic Reticulum Degradation*), das ebenfalls einen Membrananker besitzt, an die ER-Membran rekrutiert Biederer et al., 1997.

Uba1p aktiviert das 76 Aminosäuren große Ubiquitin unter ATP Verbrauch und bindet es über sein C-terminales Glycin in einer Thioesterbindung an einen konservierten Cysteinrest. Anschließend wird der Ubiquitinrest auf eines der ubiquitinkonjugierenden Enzyme übertragen, das wiederum einen Thioester mit dem Ubiquitinyl ausbildet. Ein E2 überträgt den Ubiquitinrest dann direkt auf das Substratprotein. Dabei wird das Ubiquitinmolekül über das C-terminale Glycin durch eine Isopeptidbindung mit der ϵ -Aminogruppe eines spezifischen Lysins des Substrat-Proteins verknüpft. Im Gegensatz zu anderen E3s wirken RING-Finger-Ubiquitin-Ligasen nur vermittelnd bei diesem Prozess und bilden lediglich eine Plattform zur Übertragung des Ubiquitinrestes auf das Substrat Jackson et al., 2000. Dies erfordert Spezifität und Affinität sowohl gegenüber dem Substratprotein als auch gegenüber dem entsprechenden E2. Die Integrität des RING-Fingers ist für die katalytische Wirkung von entscheidender Bedeutung Jackson et al., 2000; Joazeiro and Weissman, 2000.

Die ubiquitylierten Substratproteine werden dann spezifisch vom Ufd1/Npl4/Cdc48-Komplex erkannt, der unter ATP-Hydrolyse ihr vollständiges Lösen aus der ER-Membran bewirkt. Zur weiteren Ubiquitylierung und damit der Herstellung des Polyubiquitinerkennungssignals zur Degradation im 26 S Proteasom bedarf es eines weiteren Faktors. In Hefe vermittelt das Enzym Ufd2p, das eine C-terminale, zum RING-Finger-Motiv homologe U-Box-Domäne besitzt Aravind and Koonin, 2000, vermutlich die Polyubiquitylierung Koegl et al., 1999. Während der initiale Ubiquitinrest über das Lys29 des Ubiquitins mit dem Substrat verknüpft ist, erfolgt die Ufd2p-katalysierte Synthese der Polyubi-

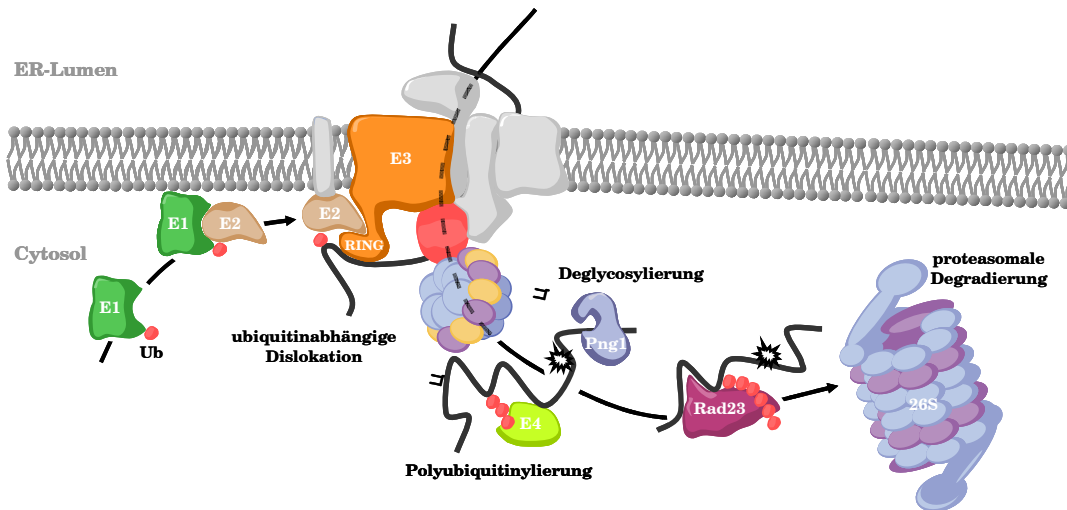


Abb. 2-6: Cytosolische Ubiquitinierungskaskade zum Abbau retrotranslozierter ERAD-Substrate.

Zusammenspiel der verschiedenen ERAD-spezifischen E1 bis E4 Enzyme des proteasomalen Ubiquitinierungssystems. Das Enzym Uba1 (E1) aktiviert Ubiquitin und überträgt es an Ubc6p bzw. Ubc7p/Cue1p (E2). Das E2 bindet Hrd1p (E3) oder Doa10p (nicht dargestellt) und überträgt den Ubiquitinrest auf dislozierende Substratproteine. Im Anschluss werden die Substrate von Ufd2p (E4) polyubiquitinyliert, von Png1p deglycosyliert und von Rad23p zur Degradation an das 26S Proteasom rekrutiert.

quitinkette (mindestens 3 - 6) über das Lys48 Koepl et al., 1999. Die Lys48-Polyubiquitinkette wird dann spezifisch von Rad23p erkannt, das das Substratprotein zur Degradation zum Proteasom eskortiert Richly et al., 2005 (Abb. 2-6). Rad23p verfügt N-terminal über eine UBL-Domäne, die eine direkte Interaktion mit dem Proteasom vermittelt, gefolgt von einer UBA (*Ubiquitin Associated*) Domäne, die die Bindung ubiquitinfusionierter Substratproteine ermöglicht Wilkinson et al., 2001; Kim et al., 2004. Von besonderer Bedeutung ist hierbei die Länge des Ubiquitinkonjugats, da die Kette ohne Polyubiquitinylierung durch Ufd2p nicht von Rad23p gebunden werden kann. Diese Längenrestriktion bildet somit das kritische Moment der Ubiquitinierungskaskade Richly et al., 2005.

2.4 *Guillardia theta* als Modellorganismus

Die Cryptophyte *Guillardia theta* ist ein mariner, heterokont begeißelter Phytoflagellat von charakteristisch dorsiventraler Form. Einer runden Rückseite liegt eine flache Bauchseite mit einer längsverlaufenden Grube gegenüber, an deren oberem Ende ein tiefer Schlund (Vestibulum, VE) mündet, neben dem ein Paar ungleich langer Flagellen entspringt. Seine Teilung erfolgt längs, durch ringförmige Invagination der Plasmamembran. Er besitzt keine echte Zellwand, sondern einen Periplast aus polygonalen Proteinplatten, der der Plasmamembran innen anliegt. Die Plasmamembran ist mit zahlreichen Trichocysten (TR) untersetzt. Im vorderen Ende der Zelle liegt die pulsierende Vacuole (PV), der Nucleus (NU) befindet sich in der hinteren Zelhälfte von den Hoek et al., 1993. Im Cytoplasma der Alge befinden sich der Golgi-Apparat (GA), Mitochondrien (MI), Speicherlipide und der becherförmige Rhodoplast (RP), der von vier Membranen umgeben wird und deren äußerste ein Kontinuum mit dem rauen ER bildet. Zwischen dem inneren und dem äußeren Membranpaar liegt das PPC mit 80S Ribosomen, dem 26S Proteasom, sowie das Nucleomorph (NM) Douglas et al., 1991; Maier et al., 1991. Hier finden sich auch feine Amylopectinkörner, die dem Pyrenoid (PY) der Plastide als Speicherstärke (ST) haubenförmig angelagert sind. Eigenständige Mitochondrien fehlen, die Nucleomorphhülle wird funktionell als periplastidäres ER (*Periplastid Reticulum*, PPR) diskutiert, das sonst nur in Form rudimentärer Membranstapel im PPC der Heterokontophyta vorzukommen scheint Gibbs, 1979; Cavalier-Smith, 2003. Als photosynthetische Pigmente der Plastide kommen Chlorophyll a, c₂ sowie Phycoerythrin vor, das bislang nur in Rotalgen gefunden wurde Cavalier-Smith, 2000 [Abb. 2-7].

Das Nucleomorph von *Guillardia theta* beinhaltet eines der kleinsten heute bekannten Eucaryotengenome Douglas et al., 2001. Im Rahmen eines internationalen Genomprojekts wurde die vollständige Sequenzierung im Jahr 2000 zum Abschluss gebracht Douglas et al., 2001. Es enthält sowohl DNA als auch RNA Maier et al., 2000. Die drei linearen Chromosomen von 196kb-, 181kb- und 174kb-Länge enthalten neben den für Eucaryoten untypischen Telomerenden mit der Sequenz $([AG]_7AAG_6A)_n$, repetitive, terminale Bereiche mit rRNA-Operons Zauner et al., 2000; Douglas et al., 2001. Das Nucleomorphgenom hat einen A/T-Gehalt von 75 % in codierenden und bis zu 90 % in nichtcodierenden Regionen. Die Gendichte außerhalb der Chromosomenenden ist extrem hoch, tRNAs überlappen teilweise mit proteincodierenden Genen und es existieren nur weni-

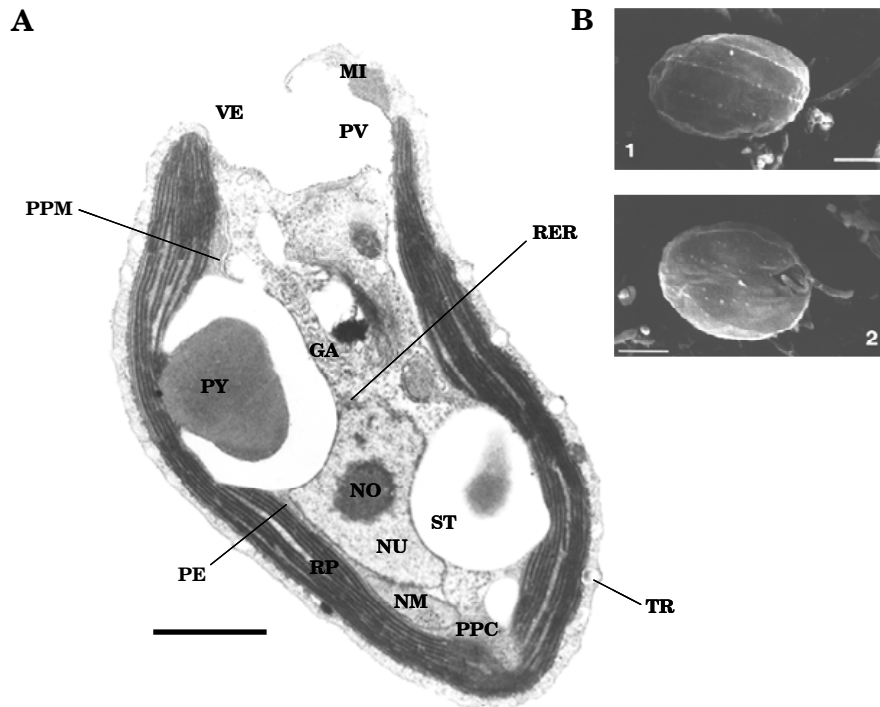


Abb. 2-7: Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Guillardia theta*.

A. Transmissionselektronen-, bzw. **B.** rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen einer *Guillardia theta* Zelle, **B1.** dorsale, **B2.** ventrale Aufsicht. Deutlich erkennbar ist die longitudinale Anordnung der Proteinplatten des Periplasten (**B1**). Oberhalb der Schlundöffnung entspringen zwei ungleich lange Flagellen. Maßstab $2\ \mu\text{M}$ aus Deane et al., 1998. **A.** Längsschnitt durch eine *Guillardia theta* Zelle. GA, Golgi-Apparat; Mitochondrien, NM, Nucleomorph; NO, Nucleolus; NU, Nucleus; PPC, periplastidäres Kompartiment; PPM, periplastidäre Membran; PE, Plastidenhülle; PV, pulsierende Vakuole; PY, Pyrenoid; RER, raues ER; RP, Rhodoplast; VE, Vestibulum; ST, Stärke; TR, Trichocyste. Maßstab $1\ \mu\text{M}$ aus Fraunholz et al., 1997.

ge, kurze spleissosomale Introns Zauner et al., 2000; Douglas et al., 2001. 56 % der codierten Proteine sind an Prozessen der Transkription, RNA-Prozessierung, Translation, Proteinfaltung und -degradation, Zellzykluskontrolle, Mitose, DNA-Verpackung, -Synthese und -Reparatur beteiligt. Das *gros* der genetischen Information wurde in den Nucleus des Wirts transferiert. Gene für die Enzyme des Grundstoffwechsels der Zelle bzw. strukturelle Gene für den Photosyntheseapparat fehlen Douglas et al., 2001. 37 % aller Gene codieren für Proteine mit unbekannter Funktion.

Das Nucleomorphgenom codiert folglich einen genetischen Apparat für die Expression weniger plastidärer Gene Zauner et al., 2000; Douglas et al., 2001, z.B. das nicht-Häm Eisenprotein Rubredoxin oder das an der Teilung der Plastide beteiligte Protein FtsZ Fraunholz et al., 1998; Wastl et al., 2000.

Die besondere Rolle der Cryptophyta innerhalb der Chromalveolata als Modellorganismus wird bei näherer Betrachtung der komplexen Morphologie der sekundären Plastide und deren Konsequenzen für den Organismus deutlich. Da weder Plastiden- noch Nucleomorphgenom die ausreichende Kapazität besitzen alle nötigen Funktionen für Plastide bzw. PPC selbst zu codieren, müssen beide mit zahlreichen Proteinfaktoren vom Nucleus versorgt werden Douglas et al., 2001; Martin et al., 2002. Somit kann einzig bei den Cryptophyta zwischen nucleuscodierten PPC- und nucleuscodierten Plastidenproteinen unterschieden werden, die entweder nur über zwei Membranen ins PPC (RER- und PP-Membran) oder aber vier Membranen ins Stroma der Plastide importiert werden müssen [vgl. 2.2]. Jüngste Arbeiten von Gould et al. konnten zeigen, dass beide Klassen von Faktoren als Präproteine mit einer BTS codiert werden und das vermutlich allein das Vorhandensein einer aromatischen Aminosäure an Position +1 der Schnittstelle zwischen Signal- und Transitpeptid (in 95 % aller Fälle Phenylalanin) entscheidet, ob zwei oder vier Membranen passiert werden Gould et al., 2006a. Ferner dient das Transitpeptid nicht nur, wie lange angenommen, als Schlüssel zur Passage der Plastidenhülle, sondern als generelles Erkennungs- und Sortierungssignal aller symbiont- bzw. plastidenspezifischer Proteine im rauen ER. Ein konserviertes Phenylalanin findet sich zudem auch N-Terminal im Transitpeptid nucleomorphcodierter plastidärer Gene von *Guildardia theta*, im Transitpeptid plastidärer Proteine von *Cyanidioschyzon merolae* (Rhodophyta), *Cyanophora paradoxa* (Glaucophyta) und an Position +1 der BTS plastidärer Proteine von *Phaeodactylum tricorutum* (Heterokontophyta) und *Heterocapsa triquetra* (Dinophyta), sowie weniger stark ausgeprägt auch bei *Toxoplasma gondii* bzw. *Plasmodium falciparum* (Apicomplexa) Steiner and Löffelhardt, 2002; Kilian and Kroth, 2005; Patron et al., 2005; Gould, 2006. Dies lässt auf einen konservierten Importmechanismus innerhalb der roten Linie und der Glaucophyta schließen.

Über den Mechanismus der initialen Erkennung und dem Transport der Präproteine an der PPM ist bislang wenig bekannt. Es existieren derzeit zwei Modelle, die alternativ zueinander diskutiert werden, das Vesikel- bzw. das Translokatormodell (Abb. 2-8). Bei dem vesikelvermittelten Import nach Gibbs, 1981; Kilian and Kroth, 2005 werden die nucleuscodierten plastidären Präproteine

nach Abspaltung ihres Signalpeptides an der PPM über das Transitpeptid ihrer BTS erkannt und in Vesikel verpackt zur OEM transportiert, von wo aus sie über TIC das Stroma der Plastide erreichen. PPC-lokalisierte plastidäre Proteine müssten nach diesem Modell über die OEM zurück ins PPC transportiert werden. Bei dem translokatorvermittelten Import nach Cavalier-Smith, 1999; Boudry, 2004 werden alle vier Membranen über sequentielle Translokatoren überquert, TOC/TIC-homologe der OEM und IEM und der so genannte *Translocator Of The Periplastidial Membrane* (TOP) der PPM, für den u. a. ein relokalisierter, duplizierter TOC postuliert wurde. Wie bereits erwähnt, wurden nur einige Homologe zu Komponenten des TIC bei *Guillardia theta* (und anderen Chromalveolaten) identifiziert, TOC-Komponenten konnten in den bereits sequenzierten Organismen bislang nicht gefunden werden. Das Translokatormodell hat gegenüber dem Vesikelmodell den Vorteil, den Transport nucleomorphcodierter Präproteine in die Plastide erklären zu können [vgl. Abb. 2-3].

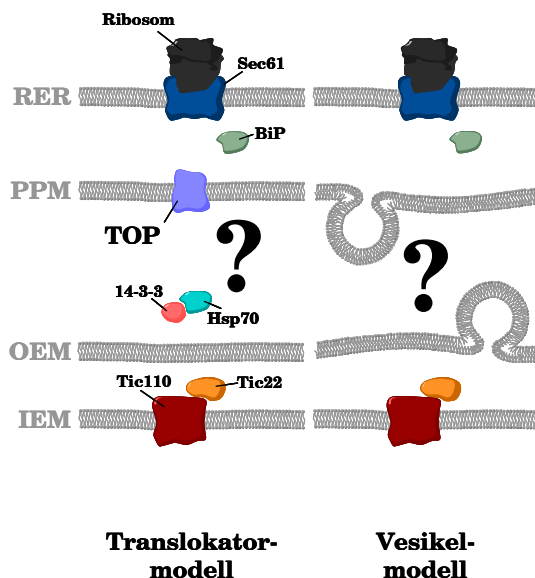


Abb. 2-8: Import nucleuscodierter Präproteine.

Schematische Darstellung derzeit diskutierter Importmodelle für die sekundäre Plastide der Cryptophyta. Links das Translokator-, rechts das Vesikelmodell. Erläuterung siehe Text.

3 Zielsetzung

Der Transfer genetischer Information vom Symbiont zum Wirt war ein wesentlicher Prozess in der Etablierung sekundärer Plastiden der Cryptophyten bzw. Chromalveolaten allgemein. Er setzt jedoch das Vorhandensein geeigneter Transportsysteme zum Reimport der Genprodukte voraus. Die Forschung der letzten zweieinhalb Jahrzehnte, den Import nucleuscodierter (peri-)plastidärer Präproteine betreffend, hat im Wesentlichen zum Verständnis der Mechanismen an der ersten bzw. der vierten die komplexen Plastiden umgebenden Membranen geführt. Darüber hinaus existieren jedoch nur Modelle, die den Import an der zweiten (und dritten) Membran zu erklären versuchen. Durch die Analyse nucleomorphcodierter Membranproteine der Cryptophyte *Guillardia theta*, die bislang keiner eindeutigen Funktion zugeordnet werden konnten, werden neue Hinweise auf die Natur dieser Mechanismen erhofft. Von besonderem Interesse ist dabei das Protein Gt_ORF201, das Homologien zu einem Protein aus *Saccharomyces cerevisiae* aufweist, welches im Rahmen der ER-Qualitätskontrolle an der Dislokation un- bzw. missgefalteter Proteine aus dem ER beteiligt ist.

Ziel war es, im Rahmen dieser Arbeit das Protein Gt_ORF201 auf eine mögliche Rolle beim Import nucleuscodierter (peri-)plastidärer Präproteine hin zu untersuchen. Eine funktionelle Charakterisierung mittels geeigneter Komplementationsexperimente in Hefe stand dabei im Vordergrund. Im Weiteren sollte das Protein mit Hilfe eines spezifisch generierten Antiserums innerhalb der sekundären Plastide von *Guillardia theta* lokalisiert werden.

Durch eine weiterführende Analyse des Nucleomorphgenoms bzw. der Analyse weiterer bekannter Chromalveolatengenome sollten weitere putativ am Präproteintransport beteiligte Faktoren identifiziert und ein Modell erarbeitet werden, das künftig die Entwicklung experimenteller Ansätze zur Klärung dieser Prozesse ermöglicht.

4 Ergebnisse

4.1 Symbiontspezifische ERAD-Faktoren in Cryptophyten

4.1.1 GT_ORF201, ein nucleomorphcodiertes Der1-Homolog

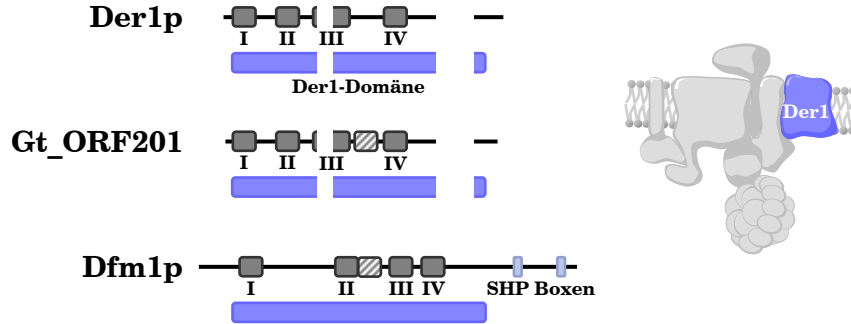
Das Gen *orf201* von Chromosom 1 des Nucleomorphgenomes codiert ein 201 Aminosäuren langes, ca. 23.5 kDa großes Protein (Gt_ORF201) unbekannter Funktion. Vergleiche zeigen eine Sequenzidentität von 21 % zu Der1p aus Hefe. Der1p ist eines der ersten identifizierten ERAD-Proteine und ist essentiell für die Degradation einer Vielzahl von missgefalteten ERAD-Modellsubstraten mit lumenaler Läsion u.a. Carvalho et al., 2006. Seine eigentliche Funktion ist bislang ungeklärt [vgl. 2.3.2]. Gt_ORF201 wird ebenso wie Der1p von PSort als Typ IIIa Membranprotein mit nicht abspaltbarem Signalpeptid klassifiziert. Durch Hydrophobizitätsanalysen (nach TMHMM v2.0) lässt sich für Gt_ORF201 und Der1p eine vergleichbare Topologie mit vier Transmembrandomänen in den

Abb. 4-1: Der1p, Dfm1p und Gt_ORF201 im Vergleich.

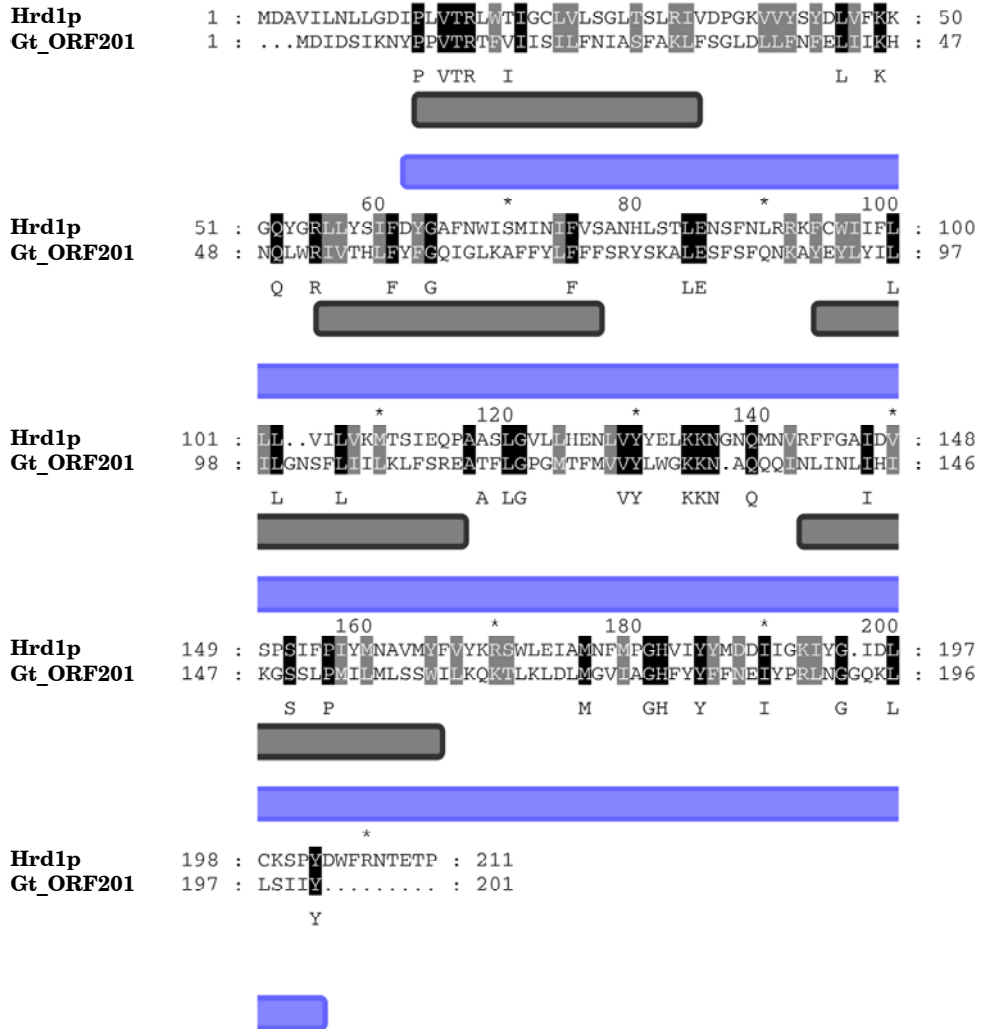
A. Schematisches Alignment von *Guillardia theta* Gt_ORF201 im Vergleich mit den *Saccharomyces cerevisiae* Proteinen Der1p und Dfm1p. Transmembrandomänen (nach TMHMM) in grau, auffällige hydrophobe Bereiche in grau/weiß. Strukturelle Ähnlichkeiten zwischen Gt_ORF201 und Der1p werden deutlich. Die Der1-Domäne ist in dunkelblau, die Cdc48-Bindedomänen des Dfm1p (SHP-Boxen) sind in hellblau dargestellt.

B. Aminosäurealignment von Der1p und Gt_ORF201. Beide weisen eine Sequenzidentität von 21 % auf.

A



B



Aminosäurebereichen 10 - 32, 53 - 75, 90 -107 und 140 - 162 bzw. 13 - 35, 55 - 77, 94 - 116 und 143 - 165 mit einer Wahrscheinlichkeit von 0.8 oder höher berechnen, N- und C-Terminus liegen dabei im Cytosol. Eine entsprechende Konformation für Der1p konnte experimentell mittels Glycosylierungs- und Microsomal-/Proteaseassays tatsächlich bestätigt werden Hitt and Wolf, 2004. Eine weitere auffällige hydrophobe Region findet sich bei Gt_ORF201 im Bereich der Aminosäuren 111 - 133. Laut TMHMM-Algorithmus beträgt die Wahrscheinlichkeit, dass es sich dabei um eine echte Transmembrandomäne handelt, allerdings nur knapp 0.6. Im Gegensatz zu Dfm1p, dem zweiten, in Hefe existierenden Protein der Der1-Familie, weisen weder Der1p noch Gt_ORF201 Cdc48-Bindemotive (so genannte SHP-Boxen, der Sequenz Phe-X-Gly-X-Gly-Gln-Arg-N, wobei X für eine nicht konservierte Aminosäureposition und N für eine nicht polare Aminosäure steht) auf Sato and Hampton, 2006 [Abb. 4-1].

4.1.2 Gt_ORF201 ist funktionell und strukturell ortholog zu Der1p

Um zu testen, ob Gt_ORF201 neben seiner strukturellen Ähnlichkeit auch funktionell ortholog zu Der1p aus *Saccharomyces cerevisiae* ist, wurden zunächst Komplementationsexperimente mit *der1ire1*-doppeldefizienten Hefezellen [vgl. 7.6] durchgeführt. Die vollständige Deletion von *der1* und *ire1* [dem UPR-Rezeptor, der ERQC, vgl. 2.3.2] ist für die Hefe Δ *der1* Δ *ire1*-Doppelmutante konditional letal und führt zu einem Wachstumsphänotyp bei restriktiven Bedingungen (37 statt 25 °C). Der Akkumulation missgefalteter Proteine im ER kann aufgrund des Ausbleibens einer adäquaten Stressantwort (Degradation der missgefalteten Proteine via ERAD oder vermehrte Expression von Chaperonen via der UPR) nicht mehr begegnet werden.

Zur episomalen Expression in *Saccharomyces cerevisiae* YRH110 wurden zunächst die codierenden Bereiche von Gt_ORF201 und Der1p (als Kontrolle) mit Primerpaaren orf201 fw/ orf201 rv und der1 fw/der1 rv [siehe 7.4] mittels PCR nach 7.10 amplifiziert und über die eingebrachten *EcoRI*- bzw. *XhoI*-Restriktionsschnittstellen in pRS424-TDH [vgl. 7.5] mit pGemT als Zwischenvektor kloniert. Die Richtigkeit der amplifizierten Gensequenzen wurde nach 7.13 bestätigt. Die Transformation in *Saccharomyces cerevisiae* YRH110 erfolgte nach 7.8. Die Validität der erhaltenen Transformanden (Selektion auf SD/-Trp -Ura Kan4XR) wurde durch Reisolieren der eingebrachten Plasmid-DNA [nach

7.9] und Kolonie-PCR [vgl. 7.10] mit den vektorspezifischen Primern M13 uni/M13 rev geprüft (nicht dargestellt). Das Plasmid pRS424-THD trägt einen 2 μ -Replikationsursprung und liegt in mehreren Kopien pro Zelle vor. Abb. 4-2A zeigt das Wachstumsverhalten der temperatursensitiven *Δder1Δire1* Doppelmutante nach Überexpression von *der1* (2 μ *DER1*) und *Gt_orf201* (2 μ *201*), pRS424-THD als Kontrolle, bei normalen bzw. restriktiven Bedingungen nach 3 - 5 Tagen. Deutlich zu erkennen ist, dass die Expression von *Gt_orf201* die konditionale Letalität der *der1ire1*-Defizienz komplementieren kann.

Um diese Ergebnisse zu bestätigen wurde eine Degradationskinetik eines löslichen ERAD-Modellsubstrates (CPY*) in *der1*-defizienten Hefezellen (*Saccharomyces cerevisiae* W303-CD) bei Überexpression von *gt_orf201* im Vergleich zu *der1* erstellt. Dazu wurden die bereits verwendeten Konstrukte nach 7.6 in *Saccharomyces cerevisiae* W303-CD eingebracht (Selektion auf SD/-Trp-Ura) und nach 7.19 im *Pulse-Chase* Experiment die Abbaurate von neu synthetisiertem, radioaktivmarkiertem CPY* zeitabhängig ermittelt.

CPY* bezeichnet eine mutierte Form der Carboxypeptidase Y (*Proteinase C*, *Pre1p*) aus *Saccharomyces cerevisiae*, codiert durch das Gen *prc1*. Ein Basenaustausch an Position 763 des Gens (GGG zu AGG) führt zur Änderung der Aminosäure Gly255 zu Arg255 (Allel *pr1-1*). Dieses mutierte Glycin ist eng mit dem katalytischen Ser257 des aktiven Zentrums des Enzyms assoziiert und ist in allen bekannten Serinproteasen hoch konserviert. CPY wird gewöhnlich als Präproprotein mit einem Molekulargewicht von 61 kDa cotranslational ins ER synthetisiert, wo es nach Abspaltung des Signalpeptids und N-Glycosylierung an vier Asparaginresten als Proprotein mit 67 kDa vorliegt. Nach dem Weitertransport über den Golgi-Apparat zur Vakuole wird die Prosequenz durch Proteinase A abgespalten, so dass CPY in seiner reifen Form mit einem Molekulargewicht von 61 kDa vorliegt Finger et al., 1993. CPY* kann aufgrund des Aminosäureaustausches seine native Konformation nicht mehr einnehmen und nicht weiter zum Golgi-Apparat transportiert werden. Mit einer Halbwertszeit von 20 min wird es im Rahmen der ER-Qualitätskontrolle via ERAD abgebaut, dabei ist *Der1p* von essentieller Bedeutung. In *der1*-defizienten Hefezellen akkumuliert CPY* im ER und kann nicht ins Cytosol zur Degradation im 26S Proteasom disloziert werden Knop et al., 1996. Abb. 4-2B zeigt, dass CPY* in *der1*-defizienten Zellen akkumuliert (pRS424), wohingegen die episomale Expression von *der1* (2 μ *DER1*) und *Gt_orf201* (2 μ *ORF201*) zu einer deutlichen Abnahme des radioaktiv markierten CPY* führt. Die digitale Quantifizierung der der Autoradiogramme ergab eine Degradationsrate von 60 bzw. 28 % in 100 min nach dem

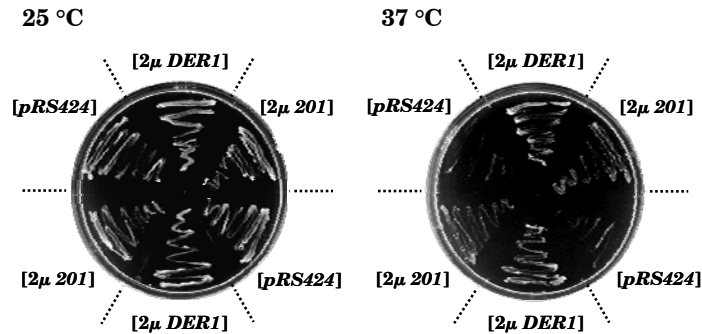
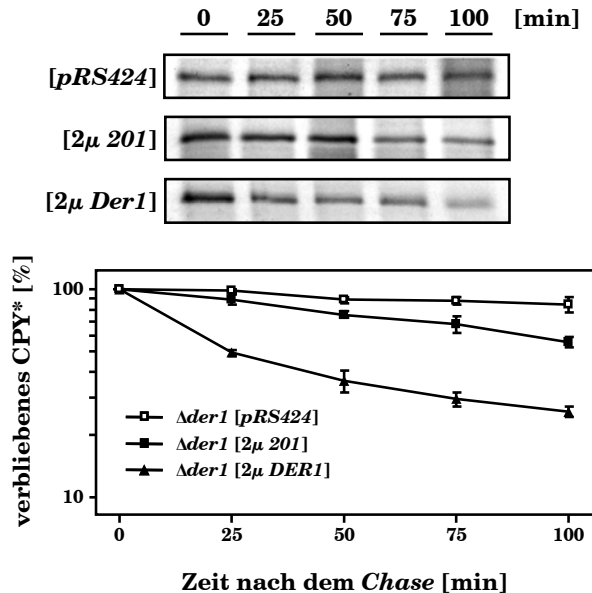
A. $\Delta der1 \Delta ire1$ B. $\Delta der1$ 

Abb. 4-2: Komplementationsexperimente in *Saccharomyces cerevisiae*.

A. Wachstum der temperatursensitiven *der1ire1*-Doppelmutante (YRH110) bei Überexpression von pRS424, Der1p (2 μ DER1) bzw. Gt_ORF201 (2 μ 201) bei 25 bzw. 37 °C auf SD/-Trp-Ura Kan4XR. Gt_ORF201 kann die konditionale Letalität der *der1ire1*-Defizienz komplementieren. **B.** CPY* Pulse-Chase Analyse der *der1*-Mutante (W3030CD) bei Expression der Konstrukte aus A. Mitte, Autoradiogramme der verschiedenen Messreihen, unten Degradationskinetik. Gt_ORF201 vermittelt partiell die Dislokation von CPY* aus dem ER aus Sommer et al., 2007.

Chase. Dies entspricht in etwa der ermittelten Rate von 18 % in 90 min für das Der1p-homologe Protein R151.6 aus *Caenorhabditis elegans* Hitt and Wolf, 2004.

Gt_ORF201 von *Guillardia theta* kann Der1p in *Saccharomyces cerevisiae* partiell komplementieren. Somit konnte gezeigt werden, dass (i) Gt_ORF201 ein funktionelles Ortholog von Der1p ist, das die Dislokation löslicher ERAD-Modellsubstrate (am Beispiel von CPY*) aus dem ER vermitteln kann, dass (ii) Gt_ORF201 und Der1p eine vergleichbare Topologie besitzen und dass (iii) sich die erste Transmembrandomäne von Gt_ORF201 in Hefe als Signalanker zur Insertion in die ER-Membran eignet.

4.1.3 Gt_ORF201 ist ein Protein der periplastidären Membran

Als membrangebundenes bzw. -assoziiertes System existieren für ein nucleomorphcodiertes Gt_ORF201-basiertes symbiontspezifisches ERAD-System theoretisch drei mögliche Lokalisationen innerhalb des periplastidären Kompartimentes und seiner es begrenzenden Membranen: (i) Die Nucleomorphhülle (NE), die evolutiv als remanentes ER der symbiontischen Rhodophyte betrachtet werden kann und damit die ursprüngliche Lokalisation darstellt Cavalier-Smith, 2003, (ii) die äußere Membran der Plastidenhülle (OEM) die sowohl eu- als auch procaryote Züge besitzt Bolter et al., 1998 und (iii) die periplastidäre Membran (PPM), die die Kompartimente des Symbionten von denen des Wirtes abgrenzt und die ehemalige Plasmamembran des Symbionten darstellt Cavalier-Smith, 2003.

Um die genaue Lokalisation von Gt_ORF201 innerhalb der pro- bzw. eucaryoten Kompartimente des Symbionten von *Guillardia theta* bestimmen zu können, wurde zunächst ein rekombinantes Gt_ORF201 GST-Fusionsprotein (ORF201ab) zur Gewinnung eines spezifischen Antiserums exprimiert. Dazu wurde die die ER-lumenale Domäne Ser111 bis Leu140 von Gt_ORF201 [vgl. 4.1.1] codierende Region dreimal mittels PCR nach 7.10 aus gDNA unter Verwendung der Primerpaare orf201ab-*Bam*HI fw/orf201ab-*Pst*I rv, orf201ab-*Pst*I fw/ orf201ab-*Eco*RI rv und orf201ab-*Eco*RI fw/orf201ab-*Xho*I rv [vgl. 7.4] amplifiziert und über die eingebrachten Schnittstellen *Bam*HI/*Pst*I, *Pst*I/*Eco*RI bzw. *Eco*RI/*Xho*I sequenziell (mit pBlueScript II KS +/- als Zwischenvektor) in

den pGEX-5x-3 kloniert. Das nach 7.13 auf Validität geprüfte Konstrukt wurde nach 7.8 in *Escherichia coli* BL21-Codon Plus® eingebracht. Die Expression des GST-Fusionsproteins und seine affinitätschromatographische und präparative Aufreinigung erfolgte nach 7.14. Abb. 4-3A zeigt die elektrophoretische Auftrennung des zur Immunisierung verwendeten ORF201ab-GST-Fusionsproteins (Elektroeluat) im SDS-Gel (links) sowie im Westernblot nach Immundetektion mit anti-GST Antikörper. Deutlich ist zu erkennen, dass es sich bei dem aufgereinigten Protein um ein GST-Protein entsprechend der Masse des erwarteten Fusionsproteins (MW ~38 kDa, davon GST 26 kDa) handelt.

Das aus der Immunisierung eines Kaninchens gewonnene polyklonale Antiserum (anti-ORF201ab) wurde zunächst auf seine Spezifität geprüft. Abb. 4-3B zeigt die Immundetektion von *Guillardia theta* Proteinrohextrakt mit Präimmun- bzw. anti-ORF201ab Antiserum. Das gewonnene Antiserum spezifiziert eine Bande der dem nativen Gt_ORF201-Proteins entsprechenden Masse.

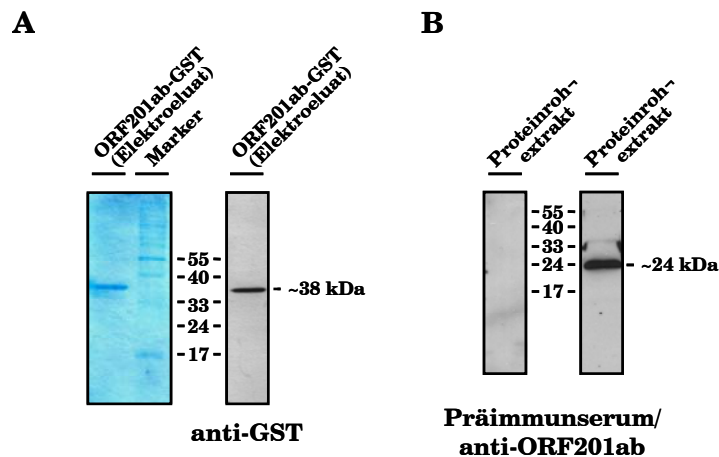


Abb. 4-3: Antikörperspezifitätstest.

A. Immundetektion von rekombinantem ORF201ab-GST-Fusionsprotein (~38 kDa) mit anti-GST Antikörper (15 % (v/v) SDS-Gel nach Färbung mit Coomassie links, Western blot rechts), **B.** von Gt_ORF201 in *Guillardia theta* Proteinrohextrakt nach elektrophoretischer Auftrennung und Transfer auf Nitrocellulose mit anti-ORF201ab Antiserum (rechts, 23,5 kDa erwartet), Präimmunserum als Kontrolle (links).

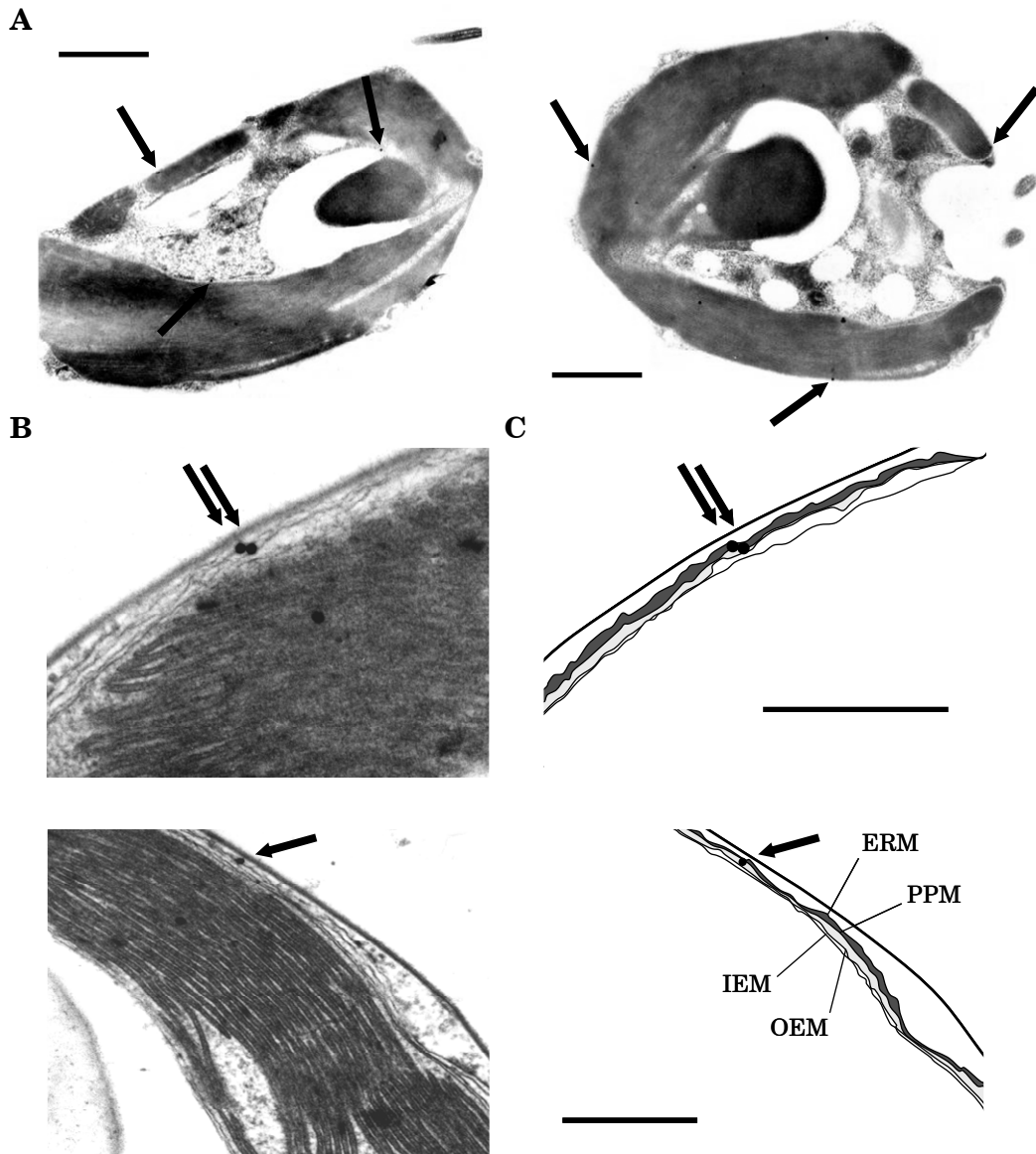


Abb. 4-4: Immundetektion von Gt_ORF201 *in situ*.

Elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Guillardia theta* Ultradünnschnitten **A.** nach Einbettung in *Lowicryl*, **B.** nach Behandlung mit Brefeldin A (BFA) und Einbettung in *Epon*, die Pfeile zeigen ausgewählte Goldmarkierungen. Gt_ORF201 ist im den Symbionten umgebenden Membranstapel (in PPM oder OEM) lokalisiert. Die Signale auf den Thylakoiden der Plastide sind schnittbedingt zu erklären. Maßstab in A. 1 μm , in B. 0,5 μm . **C.** schematisches Modell von B. ERM, ER-Membran; PPM, periplastidäre Membran; OEM/IEM, äußere/innere Plastidenhüllmembran.

Mit Hilfe des spezifischen Antiserums gegen Gt_ORF201 konnte die Lokalisation von Gt_ORF201 immunologisch nach 7.20 auf Ultradünnschnitten lowricyleingebetteter *Guillardia theta* Zellen bestimmt werden. Dazu wurde das Antiserum zunächst über ORF201ab spezifisch aufgereinigt. Abb. 4-4A zeigt elektronenmikroskopische Aufnahmen von *Guillardia theta* Zellen nach Inkubation mit anti-ORF201ab* bzw. goldgekoppeltem, Zweitantikörper [siehe 7.3]. Die 30nm-Goldpartikel des Zweitantikörpers wurden im Mikroskop als elektrorendichte schwarze Punkte sichtbar. Gt_ORF201 ist in dem die sekundäre Plastide umgebenden Membranstapel (in PPM oder OEM) lokalisiert.

Zur Erhöhung der Auflösung der einzelnen Membranen wurden *Guillardia theta* Zellen alternativ in *Epon 812* eingebettet [vgl. 7.20]. Der Raum zwischen rauer ER und periplastidärer Membran wurde zuvor durch eine Behandlung der Zellen mit $10 \mu\text{g ml}^{-1}$ BFA für 105 min 2.5 h vor dem Nacht/Tag-Wechsel [vgl. 7.8] und anschließender sofortiger Fixierung der Zellen aufgeweitet Wastl et al., 2000 [Abb. 4-4B].

Um die Lokalisation in RER- oder PP-Membran von Gt_ORF201 genauer bestimmen zu können, wurden Westernblotanalysen mit Proteinextrakten geeigneter Subfraktion von *Guillardia theta* durchgeführt [vgl. 7.16 - 7.18]. Dazu wurden funktionelle Plastiden nach Wastl und Maier isoliert [vgl. 7.15], die nur von der eigentlichen Plastidenhülle (PE) begrenzt werden Wastl and Maier, 2000. Zudem wurde für diese und anderen Arbeiten eine Methode entwickelt siehe Gould, 2006 [vgl. 7.15], um die sekundären Plastide von *Guillardia theta* anzureichern [vgl. 8.1]. Vergleichende Analysen dieser Proteinfractionen [Abb. 4-5A] zeigen kein Signal (MW, theoretisch 23.5 kDa) bei Verwendung des anti-ORF201ab Antiserums in der Fraktion der Plastiden, wohl aber in der des Symbionten bzw. der intakter Zellen. Mangels Antikörper gegen geeignete Markerproteine bzw. der Markerproteine selbst, wurde die Validität der eingesetzten Proteinextraktes durch die analoge Verwendung eines Peptidantikörpers gegen das Protein PsbB/CP47 geprüft. Erwartungsgemäß konnte PsbB (~55 kDa) in allen drei eingesetzten Extrakten nachgewiesen werden [Abb. 4-5B]. PsbB ist ein Bestandteil des Kernkomplexes des Photosystems II und an der Übertragung der Exitationsenergie auf das Reaktionszentrum beteiligt. Es ist ein integrales Protein der Thylakoidmembran und besitzt sechs Transmembrandomänen in *Synechocystis* sp. PCC 6803. PsbB ist in *Guillardia theta* als Apoprotein mit einer theoretischen Masse von ~56 kDa im Plastom codiert. Der zu beobachtende Massenshift im Gesamtrohextrakt geht vermutlich auf die bleibende Assoziation des Proteins mit seinen prosthetischen Gruppen aufgrund einer unzu-

reichenden Denaturierung der Proteine zurück. Das Holoenzym bindet 15 Chlorophyllmoleküle (Chl a, $C_{55}H_{72}MgN_4O_5$, MW theoretisch ~0,9 kDa). Das des Öffteren im Plastidenextrakt beobachtete Signal bei ~16 kDa (mit Stern gekennzeichnet) stellt möglicherweise ein Degradationsprodukt von PsbB dar. Eine präparationsbedingte proteolytische Degradation von Gt_ORF201, die ein Ausbleiben des Signals des anti-ORF201ab Antikörpers in der Spur des Plastidenproteinextraktes alternativ erklären könnte, ist aufgrund der funktionellen Integrität der isolierten Plastiden auszuschließen.

Gt_ORF201 zeigte je nach Präparation im SDS-Gel das Laufverhalten eines ~33kDa-Proteins (nicht dargestellt). Es bleibt unklar, ob dies methodische Ursachen hat oder auf eine nicht auflösbare Modifikation des Proteins zurückgeht. Unabhängig der Laufrhöhe im SDS-Gel konnten nie Signale in Proteinextrakten von Plastiden detektiert werden.

Die durchgeführten immunologischen Nachweise zur Lokalisation von GT_ORF201 innerhalb des PPC bzw. der PPC-angrenzenden Membranen des Symbionten von *Guillardia theta*, sprechen für eine Lokalisation des Proteins in

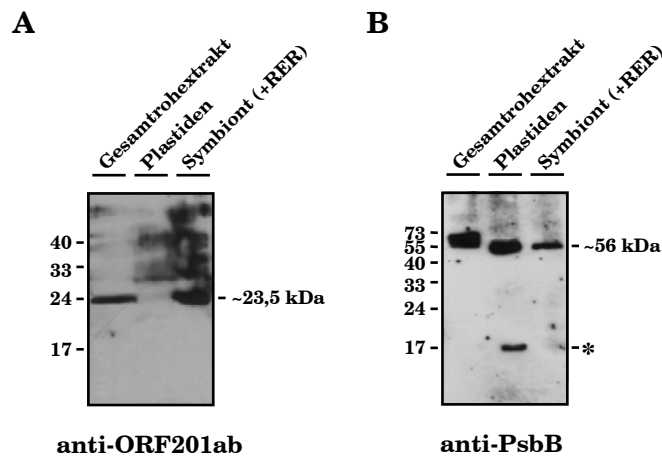


Abb. 4-5: Vergleichende Analyse von Gt_ORF201 in *Guillardia theta* Proteinfraktionen.

A. Immundetektion Gt_ORF201 in *Guillardia theta* Plastiden- bzw. Symbiontproteinextrakt mit anti-ORF201ab Antiserum, bzw. **B.** mit anti-PsbB Peptidantikörper. *Guillardia theta* Gesamtproteinextrakt als Kontrolle. Der Vergleich der einzelnen Fraktion zeigt kein Signal des anti-ORF201ab Antikörper in der Spur der Plastiden.

der PPM. Gt_ORF201 ist somit das erste beschriebene Protein dieser Membran. Da die PPM das *Interface* zwischen Wirt und Symbiont darstellt, liefert diese Lokalisation neue Möglichkeiten für die Funktion dieses Proteins.

4.1.4 Weitere nucleomorphcodierte ERAD-assoziierte Faktoren

Neben dem Membranprotein Gt_ORF201 werden eine Reihe weiterer membranboundener und löslicher Faktoren auf dem Nucleomorphgenom von *Guillardia theta* codiert, die homolog zu ERAD-Komponenten aus *Saccharomyces cerevisiae* sind. Dies sind Homologe zur RING-Finger-Ubiquitin-Ligase Hrd1p, zur ATPase Cdc48p, zum Cdc48-Cofaktor Ufd1p, sowie ein Ubcc-21kDa Protein mit Homologie zum ERAD-assoziierten ubiquitinkonjugierenden Enzym Ubc1p.

Das auf Chromosom 2 des Nucleomorphgenoms von *Guillardia theta* codierte Protein Gt_ORF477 weist Homologie zur ERAD-spezifischen Ubiquitin-Ligase Hrd1p (E3) auf Bordallo et al., 1998. Diese bildet mit dem ebenfalls membranständigen Protein Hrd3p den Hrd-Komplex zur Koordination der Prozesse der Substratrekrutierung und -ubiquitylierung an der ER-Membran [vgl. 2.3.2]. Gt_ORF477 und Hrd1p besitzen eine Sequenzidentität von 34 % und werden ebenfalls als Typ IIIa Membranproteine mit nicht abspaltbarem Signalpeptid (Signalanker) klassifiziert. Obwohl für Hrd1p eine Topologie mit sechs Transmembrandomänen ermittelt wurde Deak and Wolf, 2001, bei der der kurze N- und der lange C-Terminus mit seiner konservierten H2-RING-Finger-Domäne im Cytosol lokalisiert sind, lassen sich mittels TMHMM für Hrd1p bzw. Gt_ORF477 nur vier bzw. fünf der sechs Transmembrandomänen in den Bereichen der Aminosäuren 7 - 29, 49 - 71, 117 -139, 158 -180 und 225 - 247 bzw. 8 - 30, 47 - 69, 103 - 125 und 145 - 167 vorhersagen. Allerdings werden für Hrd1p eine und für Gt_ORF477 zwei weitere schwach hydrophobe Bereiche ermittelt [Abb. 4-6A]. Die höchste Sequenzidentität zwischen Gt_ORF477 und Hrd1p liegt im Bereich der Zn²⁺-bindenden H2-RING-Finger Domäne. Der H2-RING-Finger von Gt_ORF477 weist gegenüber dem von Hrd1p eine elf Aminosäure große Deletion auf, die jedoch weder die Integrität, noch die Funktionalität der Domäne beeinflussen sollte, da die acht essentiellen Aminosäuren (Cys-X_n-Cys-X_n-Cys-X_n-His-X_n-His-X_n-Cys-X_n-Cys-X_n-Cys) vorhanden sind [Abb. 4-6B].

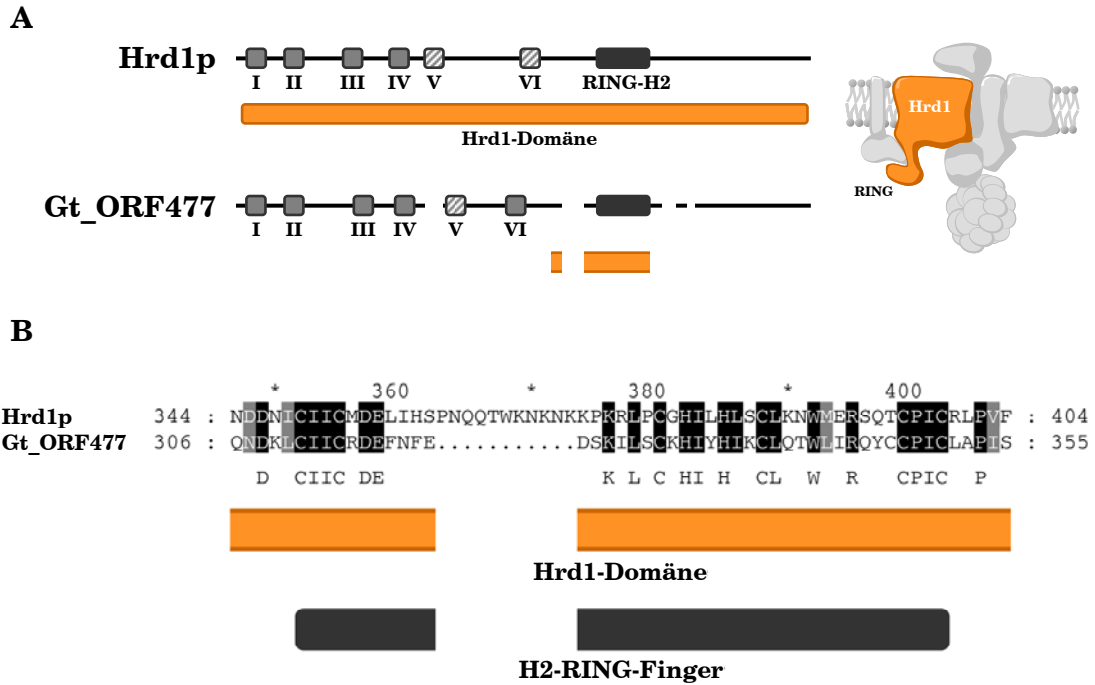


Abb. 4-6: Hrd1p und Gt_ORF477 im Vergleich.

Schematisches Alignment von *Guillardia theta* Gt_ORF477 und *Saccharomyces cerevisiae* Hrd1p. Transmembrandomänen (nach TMHMM) in hellgrau, auffällige hydrophobe Bereiche in hellgrau/weiß. Die Hrd1-Domäne ist in orange, die konservierte H2-RING-Fingerdomäne in dunkelgrau dargestellt. Schematischer Aufbau beider Proteine in **A**, des H2-RING-Finger-Motivs in **B**. Erläuterung siehe Text.

Gt_sCdc48 ist auf Chromosom 3 des Nucleomorphgenoms codiert und weist eine 60 % Sequenzidentität zu Cdc48p aus *Saccharomyces cerevisiae* auf. Das Protein ist mit 752 Aminosäuren (ca. 96 kDa) 84 Aminosäuren kürzer als sein Pendant aus Hefe. Neben Gt_Cdc48 codiert das Nucleomorphgenom auf Chromosom 1 noch eine weitere ATPase des AAA-Typs, das Gt_sCdc48-like Protein, von 606 Aminosäuren Länge [vgl. Abb. 4-7]. Letzteres weist im Gegensatz zu Cdc48p und Gt_sCdc48 nur die beiden für diese Proteinfamilie typischen AAA-Domänen auf, nicht aber die N-terminale Cdc48N-Domäne, die strukturell homolog zur $\alpha\psi\beta$ Barrel- bzw. $\alpha\beta$ Roll-Domäne von Ufd1p ist, und die Interaktion zu den jeweiligen für spezifische Aufgaben rekrutierenden Cofaktoren vermittelt Bruderer et al., 2004; Sato and Hampton, 2006.

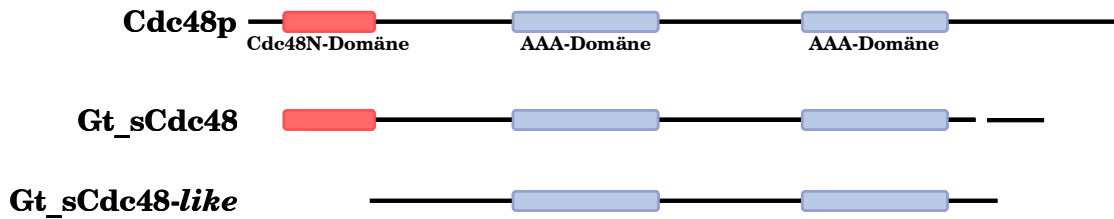
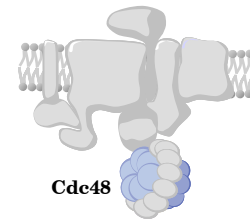


Abb. 4-7: Cdc48p, Gt_sCdc48 und Gt_sCdc48-like Protein im Vergleich.

Schematisches Alignment von *Guillardia theta* Gt_sCdc48, Gt_sCdc48-like Protein und *Saccharomyces cerevisiae* Cdc48p. Die AAA-Domänen sind in hellblau, die Cdc48N-Domäne in rot dargestellt.



Auf Chromosom 3 ist neben Gt_sCdc48 mit Gt_sUfd1 auch ein verkürztes Homolog des Ufd1p aus *Saccharomyces cerevisiae* codiert, das mit Npl4p einen heterodimeren Cdc48-Cofaktor ausbildet. Beide weisen eine Sequenzidentität von 35 % auf. Wie der schematische Sequenzvergleich zeigt [Abb. 4-8], ist die C-Domäne des 175 Aminosäure langen Proteins (361 Aminosäuren bei Ufd1p) deletiert, so dass Gt_sUfd1 nur die N-Domäne (bestehend aus je einer $\alpha\beta$ Barrel- bzw. $\alpha\beta$ Roll-Domäne) besitzt, die für die Bindung ubiquitinylierter ERAD-Substrate notwendig ist [vgl. 2.3.2]. Die die Interaktion mit Cdc48 vermittelnde SHP-Box bzw. die C-terminal der SHP-Box sitzende Npl4-Bindedomäne [in Abb. 4-8 nicht dargestellt] fehlt bei Gt_sUfd1.

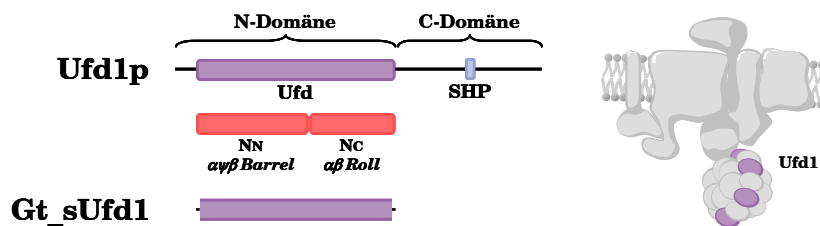


Abb. 4-8: Ufd1p und Gt_sUfd1 im Vergleich.

Schematischer Vergleich von *Guillardia theta* Gt_sUfd1 und *Saccharomyces cerevisiae* Ufd1p. Die ubiquitininfusionsproteinbindende N-Domäne ist in violett bzw. rot, die SHP-Box in hellblau dargestellt. Es ist deutlich erkennbar, dass Gt_sUfd1 gegenüber Ufd1p stark verkürzt ist.

Weit über zehn verschiedene ubiquitinkonjugierende Enzyme (E2) existieren allein in *Saccharomyces cerevisiae*, von denen im Wesentlichen bislang nur drei mit ERAD in Verbindung gebracht wurden: Ubc1p, Ubc6p und Ubc7p (Friedlander et al., 2000). Das Nucleomorphgenom von *Guillardia theta* codiert für drei verschiedene E2-Enzyme (Douglas et al., 2001 [Abb. 4-9]). Gt_sUbc4 ist in fünf der sechs terminalen *Repeats* der drei Nucleomorphchromosomen codiert. Sein Pendant in Hefe, Ubc4p, spielt eine essentielle Rolle im Rahmen der Zellzykluskontrolle und der zellulären Stressantwort und ist am *Turnover* kurzlebiger, regulatorischer Proteine beteiligt (Jentsch et al., 1990). Gt_Ubc-17kDa besitzt eine Sequenzidentität von 34 % zu Rad6p aus *Saccharomyces cerevisiae*, das eine Rolle in postreplikativen DNA-Reparaturmechanismen spielt. Gt_Ubc-21kDa, weist eine Sequenzidentität von 42 % zu *Saccharomyces cerevisiae* Ubc1p auf, welches neben Funktionen während der Vesikelbiogenese auch an der Ubiquitynylierung von ERAD-Substraten beteiligt ist (Friedlander et al., 2000).

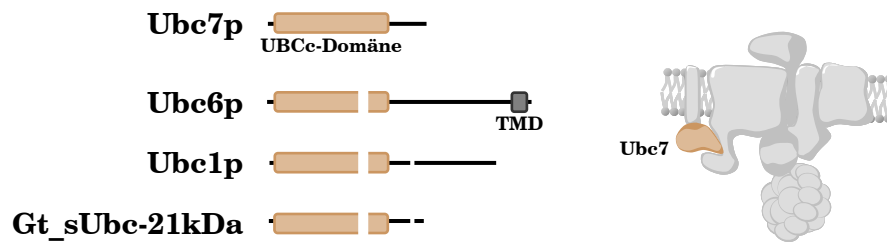


Abb. 4-9: Vergleich von Gt_sUbc-21kDa mit *Saccharomyces cerevisiae* Ubc1p, Ubc6p und Ubc7p.

Schematischer Vergleich von Gt_sUbc-21kDa mit den in *Saccharomyces cerevisiae* ERAD-assoziierten E2-Enzymen. Die Ubc-Domäne ist in braun, die Transmembrandomäne von Ubc6p in grau dargestellt.

Die Ergebnisse der Datenbankanalyse sind in Tab. 4-1 zusammengefasst. Gt_ORF477 (und Gt_ORF201) konnten auf Transkriptebene als partielle cDNA in einer *Guillardia theta* EST-Bibliothek (Gould et al., 2006b) identifiziert werden (EST sg-p-007_a02 bzw. sg-p-009_c08). Folglich codiert und exprimiert das Nucleomorphgenom von *Guillardia theta* eine Reihe löslicher bzw. membrangebundener Proteinfaktoren mit Homologie zu Komponenten der ER-assoziierten Degradationsmaschinerie zum Abbau missgefalteter Proteine im Rahmen der ER-Proteinqualitätskontrolle aus *Saccharomyces cerevisiae*. Dabei ist auffällig, dass

(i) die identifizierten Nucleomorphproteine ausschließlich am Prozess der Substratdislokation, nicht aber an prädislokativen Prozessen der Substraterkennung/-rekrutierung oder aber postdislokativen, degradationsvorbereitenden Prozessen beteiligt sind und (ii) die identifizierten Membranproteine im Besonderen mit der Vermittlung der Dislokation löslicher bzw. membrangebundener ERAD-Substrate assoziiert werden Carvalho et al., 2006 [vgl. 2.3.2].

Tab. 4-1: Nucleomorphcodierte ERAD-Komponenten.

Protein- bezeichnung	Chr.-Nr.	Homolog aus Hefe	spezifische bzw. assoziierte Funktion in ERQC/ ERAD
Gt_ORF201	1	Der1p	CDC48-Rezeptor, putatives Translokon
Gt_ORF477	2	Hrd1p/	RING-Finger-Ubiquitin-Ligase (E3)
Gt_sUbc-21kDa	2	Ubc1p	ERAD-assoziiertes E2
Gt_sCdc48	3	Cdc48p	Ubiquitin-abhängige AAA-Typ ATPase
Gt_sUfd1	3	Ufd1p	Cdc48-Cofaktor

4.1.5 Das Genom der Cryptophyta codiert für ein zweites, wirtsspezifisches ERAD-System

Aufgrund der begrenzten Kapazität des Nucleomorphgenoms ist das *gros* der im PPC-benötigten Proteine im Nucleus codiert Douglas et al., 2001; Gould et al., 2006a. Auf der Suche nach weiteren symbiontlokalisierten ERAD-Komponenten im Genom von *Guillardia theta* wurde in der EST-Datenbank Gould et al., 2006b ein weiteres Protein der Der1-Familie identifiziert, Gt_hDer1 (EST sg_p_021_c12). Dieses Protein, Gt_hDer1, zeichnet sich jedoch nicht durch den Besitz PPC-relevanter Zielsteuerungssequenzen und muss somit als wirtsspezifisches Protein klassifiziert werden. Da die entsprechende cDNA 5' vom Startmethionin ein Stopcodon aufweist, muss es sich um ein vollständiges Transkript handeln. Gt_hDer1 gilt damit als Indiz für die Existenz eines zweiten, wahrscheinlich wirtsspezifischen, ER-lokalisierten ERAD-Systems in Cryptophyten. Neben Gt_hDer1 konnte aufgrund der eingeschränkten Datenlage lediglich ein partielles Transkripte der ERAD-assoziierten ATPase Cdc48 (Gt_hCdc48, EST GT_17.q1ca_A07, gt_027_h05 und ÉST3648) identifiziert werden.

Im Hinblick auf die Lokalisation beider ERAD-Systeme wird die nucleomorphcodierte ORF201-basierte Maschinerie als symbiontspezifisch bezeichnet. Sie steht damit der zweiten, wirtspezifischen gegenüber.

4.2 Symbiontspezifische ERAD-Faktoren in anderen Chromalveolaten

Um festzustellen, ob die Existenz der symbiontspezifischen ERAD-Maschinerie in Cryptophyten eine Konsequenz der besonderen Morphologie des sekundären Symbionten ist [vgl. 2.4] oder aber ubiquitär in allen Organismen der roten Linie vorkommt [vgl. 2.1.2], wurden die Genomdatenbanken bislang sequenzierter Chromalveolaten [vgl. 7.7] nach entsprechenden Genen durchsucht. Dabei wurden die jüngsten Erkenntnisse von Gould et al. zugrunde gelegt, wonach nucleuscodierte PPC-lokalisierte Proteinfaktoren in Cryptophyten durch eine zweiteilige Zielsteuerungssequenz, bestehend aus einem funktionellen Signalpeptid und einer transitpeptidähnlichen Extension (ohne aromatische Aminosäure an Position +1 der Schnittstelle zwischen diesen), identifiziert werden können Gould et al., 2006a; 2006b [vgl. 2.4].

4.2.1 Faktoren in Heterokontophyta und Haptophyta

Die Heterokontophyta und Haptophyta werden nach Cavalier-Smith als Chromobiota bezeichnet und bilden zusammen mit den Cryptophyta die Gruppe der Chromista Cavalier-Smith, 1986; 2003; Adl et al., 2005. Neben dem Nucleomorphgenom von *Guillardia theta* sind bislang nur die beiden Heterokontophytengenome der penaten bzw. zentralen Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* und *Thalassiosira pseudonana* vollständig sequenziert und assembliert. Ein weiteres Genom dieser Gruppe, das der Haptophyte *Emiliana huxleyi*, wird in Kürze folgen, Sequenzrohdaten sind bereits in der NCBI-Datenbank verfügbar.

In *Phaeodactylum tricornutum* konnten vier Proteine mit Homologie zu Der1p/Dfm1p aus *Saccharomyces cerevisiae* bzw. Gt_ORF201 identifiziert werden. Hydrophobizitätsanalysen zeigen zumeist jeweils vier mehr oder weniger stark ausgeprägte Bereiche, die als putative Transmembrandomänen klassifi-

ziert werden können. Zwei der vier werden als Präproteine mit N-terminaler Extension codiert, die mit SignalP und TargetP als putative PPC-Zielsteuerungssequenz bestimmt wurden und sie als symbiontspezifische Faktoren ausweisen (Pt_*sder1-1*, codiert auf Chromosom. 1, Pt_*sder1-2* auf Chromosom 9). In keinem Fall konnten C-terminal der Der1-Domäne SHP-Bindedomänen nachgewiesen werden, die die Proteine als Der1p- oder Dfm1p-Homolog charakterisieren könnten [vgl. 4.1.1].

Nur ein Gen in *Phaeodactylum tricornutum* konnte eindeutig als *hrd1*-homolog identifiziert werden (Pt_*hhrd1* auf Chromosom 24, 100 % EST-Abdeckung), das keine PPC-Zielsteuerungssequenz aufweist. Da auch das *Guillardia theta* Homolog GT_*orf477* nur im Bereich der konservierten RING-Finger-Domäne Homologie zu Hrd1p besitzt [vgl. Abb. 4-6], ist es möglich, dass ein weiteres symbiontspezifisches *hrd1*-Homolog existiert, das mit den angewendeten Suchkriterien bislang nicht identifiziert werden konnte. Eine Reihe weiterer hypothetische Proteine mit RING-Finger-Domänen finden sich jedoch im Genom codiert.

Phaeodactylum tricornutum weist wirt- und symbiontspezifische Homologe zu *cdc48* und *ufd1* auf. Pt_*hc48* auf Chromosom 10 ist im Gegensatz zu Pt_*sc48* auf Chromosom 11 (jeweils 100 % EST-Abdeckung) durch zwei Exons codiert. Beide Proteine weisen die für Cdc48 typische N-, sowie die beiden für alle ATPasen dieser Familie typischen AAA-Domänen auf [vgl. Abb 4-7]. Pt_*hufd1* bzw. Pt_*sufd1* ist auf Chromosom 4 bzw. 21 codiert (jeweils 100 % EST-Abdeckung). Wiederum zeichnet sich Pt_*sUfd1* durch den Besitz einer N-terminalen putativen PPC-Zielsteuerungssequenz aus. Ähnlich dem nucleomorphcodierten Ufd1-Homolog von *Guillardia theta* (Gt_*sUfd1*), ist es zudem C-terminal verkürzt, so dass die bei den wirtsspezifischen Ufd1-Homologen (Pt_*hUfd*) vorhandene Npl4- und Cdc48-Bindedomäne fehlt. Npl4 selbst ist nur als wirtsspezifischer Faktor im Genom beider Organismen codiert (Pt_*hnpl4*).

Unter den vielen in *Phaeodactylum tricornutum* vorkommenden ubiquitin-konjugierenden Enzymen finden sich auch wirtsspezifische Homologe zu den *Saccharomyces cerevisiae* Ubc-Proteinen Ubc1p, Ubc6p und Ubc7p (Pt_*hUbc1*, Pt_*hUbc6* und Pt_*hUbc7*). Zudem konnte auf Chromosom 25 ein symbiontspezifisches Ubc6p-Homolog (Pt_*sUbc6*) mit N-terminaler PPC-Zielsteuerungssequenz identifiziert werden. Hydrophobizitätsanalysen weisen die für Ubc6 typische stark hydrophobe Region am C-Terminus des Proteins aus, die als α -helikale Transmembrandomäne voraus gesagt wird [vgl. Abb. 4-9]. Neben diesen, in *Saccharomyces cerevisiae* vornehmlich an ERAD beteiligten Ubc-Proteinen, findet sich ein Homolog des in *Guillardia theta* identifizierten, nucleomorphcodier-

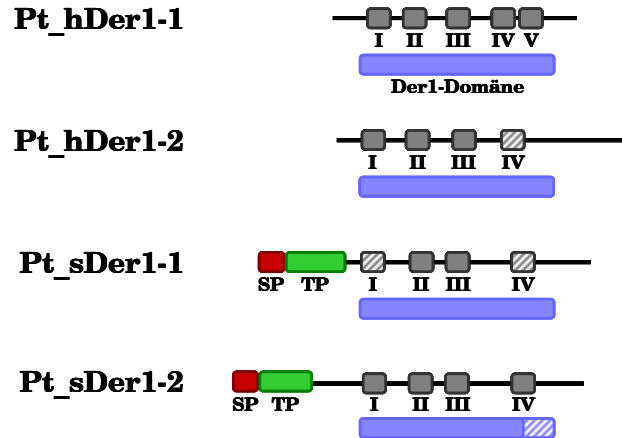


Abb. 4-10: Wirt- und symbiontspezifische Der1-Proteine in *Phaeodactylum tricorutum*.

Schematische Gegenüberstellung der vier in *Phaeodactylum tricorutum* identifizierten Der1-Proteine. Die symbiontspezifischen Proteine Pt_sDer1-1 und Pt_sDer1-2 besitzen gegenüber den wirtsspezifischen Pt_hDer1-1 und Pt_hDer1-2 eine N-terminale Extension die als zweiteilige PPC-Zielsteuerungssequenz bestehend aus Signal- (rot) und Transitpeptid (grün). Die Der1-Domäne in blau, Transmembrandomänen (nach TMHMM) in grau, auffällige hydrophobe Bereiche in grau/weiß.

ten Gt_sUbc4 (Pt_sUbc4 auf Chromosom 4), das als Präprotein mit PPC-Zielsteuerungssequenz codiert wird.

Weiterhin identifizierte symbiontspezifische ERAD-Komponenten in den *Phaeodactylum tricorutum* sind Homologe zum ubiquitinkonjugierenden Enzym Uba1 (Pt_suba1 auf Chromosom 7) und Ubiquitin (Pt_sub auf Chromosom 5), die parallel zu den wirtsspezifischen Faktoren existieren (Pt_huba1, Pt_hub).

Alle in *Phaeodactylum tricorutum* identifizierten Wirt- und symbiontspezifischen Faktoren konnten auch in der Genomdatenbank der zweiten sequenzierten Heterokontophyte *Thalassiosira pseudonana* identifiziert werden. Zusätzlich wurden Gene für ein drittes wirtsspezifisches Der1 (Tp_hder1-3), sowie für ein zweites wirtsspezifisches Cdc48 (Tp_hcdc48-2) identifiziert.

Bei Auswertung der bisher erhältlichen Sequenzrohdaten der Haptophyte *Emiliana huxleyi* konnten bislang nur zwei der vier in Heterokontophyten identifizierten Der1-homologen Gene gefunden werden (*Eh_hder1-2*, *Eh_sder1-1*), von denen letzteres ein symbiontspezifisches Präprotein mit N-terminaler PPC-Zielsteuerungssequenz darstellt.

Ferner ist Cdc48 in mindestens 2 Kopien auf dem Haptophytengenom codiert, von dem wiederum eines als Präprotein mit BTS vorliegt (*Eh_hCdc48* bzw. *Eh_sCdc48*).

4.2.2 Faktoren in Apicomplexa und Dinophyta

Die Apicomplexa und Dinophyta bilden mit den Ciliophora die Gruppe der Alveolata Adl et al., 2005. Sekundäre Plastiden können jedoch nur in den ersten beiden Gruppen gefunden werden. Aus der Reihe der Apicomplexa sind bislang die Genome von *Cryptosporidium parvum*, *Plasmodium falciparum* und *Toxoplasma gondii* vollständig sequenziert und assembliert [vgl. 4.1.2]. Die Sequenzierung eines Dinophytengenoms steht noch aus, es existieren aber eine Reihe kleiner EST-Projekte z.B. von *Heterocapsa triquetra*.

In *Plasmodium falciparum* konnten wie in *Phaodactylum tricornutum* je zwei wirt- bzw. symbiontspezifische Der1-homologe Gene identifiziert werden. *Pf_sder1-1* und *Pf_sder1-2* (codiert auf Chromosom 14 bzw. 3) sind in der Datenbank als hypothetische Apicoplastproteine annotiert. Ein symbiontspezifisches Homolog von Cdc48 (*Pf_sCdc48*, Chromosom 7) und das C-terminal verkürzte Ufd1 (*Pf_sUfd1*, Chromosom 9) konnten ebenfalls neben den wirtsspezifischen Faktoren identifiziert werden. Alle besitzen eine N-terminale Extension, die mittels PlasmoAP eindeutig als Apicoplastzielsteuerungssequenz vorhergesagt wird. Ein symbiontspezifisches Homolog zu Hrd1, Ubc6 oder Ubiquitin konnte nicht identifiziert werden. Allerdings finden sich erneut symbiontspezifische Homologe zu Ubc4 (*Pf_sUbc4*) und Uba1 (*Pf_sUba1*).

Ebenso wie in *Plasmodium falciparum* konnten auch in *Toxoplasma gondii* eine Reihe von ERAD-Komponenten identifiziert werden. Allerdings ist das Genom von *Toxoplasma gondii* gegenüber dem von *Plasmodium falciparum* stark fragmentiert. Die codierenden Bereiche der entsprechenden Gene sind von einer höheren Anzahl zum Teil sehr großer Introns (11 in *Tg_scDC48*, mit einer Größe bis zu 832 bp) inseriert, was ihre Zuordnung zu einem wirt- oder symbiontspezifischen System schwieriger macht. So finden sich auch im *Toxoplasma gondii* Genom vier Gene, die putative Der1-Proteine codieren, von denen wiederum

zwei eine N-terminale Extension aufweisen, die im Fall von Tg_sDer1-1 mit SignalP und TargetP auch eindeutig als potentielle Apicoplastzielsteuerungssequenz klassifiziert werden konnte. Ein putatives Singalpeptid für Tg_sDer1-2 konnte bislang nicht in der flankierenden 5'-Regionen gefunden werden. Über einen Sequenzvergleich mittels BlastP lässt sich das Protein jedoch eindeutig dem symbiontspezifischen Der1-2 von *Plasmodium falciparum* zuordnen. Ähnlich stellt sich die Situation für Ufd1 dar, zu dem ebenfalls zwei Homologe in *Toxoplasma gondii* identifiziert werden konnten, von denen wiederum eines typisch verkürzt ist und eine N-terminale Extension aufweist. Für Cdc48 konnten ebenfalls zwei homologe Proteine identifiziert werden, von denen sich je eines einem wirt- bzw. symbiontspezifischen ERAD-System zuordnen lässt. So ist Tg_scdc48 zwar in 12 Exons codiert, jedoch ist die Apicoplastzielsteuerungssequenz direkt mit dem der ersten Hälfte der Cdc48-typischen N-Domäne auf Exon 1 fusioniert.

Cryptosporidium parvum besitzt im Gegensatz zu *Plasmodium falciparum* und *Toxoplasma gondii* keinen Apicoplast [vgl. 4.1.2]. Erwartungsgemäß konnten im *Cryptosporidium parvum* Genom auch nur die wirtspezifischen ERAD-Faktoren gefunden werden. Die Analyse der bislang zugänglichen EST-Daten der verschiedenen Dinophyten Genome erbrachte keinerlei Hinweise auf Komponenten eines symbiontspezifischen ERAD-Systems.

Die Ergebnisse der Datenbankanalyse wurden abschließend in Tab. 4.2 bzw. Abb. 4-11 zusammengefasst. Putative Komponenten eines symbiontspezifischen ERAD-Systems konnten in allen Chromalveolaten nachgewiesen werden, deren sekundäre Plastide von vier Membranen umgeben ist, selbst im extrem reduzierten Apicoplast der Apicomplexa. Die Konservation dieses Systems, das nach den durchgeführten Analysen [vgl. 4.1.3] zumindest in Cryptophyten in der periplastidären Membran des Symbionten zu suchen ist, ist somit nicht durch dessen besondere Morphologie begründet, sondern evoziert eine generelle Funktion dieses Systems für diese Organismen. Die Ausnahme bildet scheinbar die Gruppe der Dinophyta, deren sekundäre Plastide nur von drei Membranen begrenzt wird. Dies erscheint sinnvoll, da angenommen wird, dass im Laufe der Evolution die periplastidäre Membran des Symbionten verloren ging Cavalier-Smith, 2003. Allerdings muss die schlechte Datenlage diesbezüglich berücksichtigt werden.

Eine mögliche Funktion dieses Systems wird basierend auf den in 4.1.2 und 4.1.3 durchgeführten Analysen in Kapitel 5 diskutiert.

Tabelle 4.2: Wirt- bzw. Symbiontspezifische ERAD-Faktoren in Chromalveolaten

Protein	<i>C. me- rolae</i>		<i>G. theta</i>		<i>P. tri- cornutum</i>		<i>T. pseu- donana</i>		<i>E. huxleyi</i>		<i>C. parvum</i>		<i>P. fal- ciparum</i>		<i>T. gondii</i>	
	h	s	h	s	h	s	h	s	h	s	h	s	h	s	h	s
Sec61	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
BiP	+	(+)	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
Hrd3 (E3)	(+)	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	(+)	-
Hrd1	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
Uba1 (E1)	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
Ubc1 (E2)	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
Ubc4 (E2)	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+
Ubc6 (E2)	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
Ubc7 (E2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-
Ub	+	(+)	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-
Der1-1	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+
Der1-2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	(+)	+	(+)
Npl4	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
Ufd1	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)
Cdc48	+	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ufd2 (E4)	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
Png1	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Rad23	+	-	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-
Hsp70	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Rhodo phyta Crypto-phyta Heterokonto-phyta Hapto-phyta Apicomplexa																

h, wirt- (*host*) spezifisch; s, symbiontspezifisch; Nu, nucleus-, Nm, nucleomorphcodiert. +, detektiert; (+), unvollständiges oder unsicherer Genmodell; +, vollständige bzw. partielle EST-Abdeckung; -, nicht detektiert.

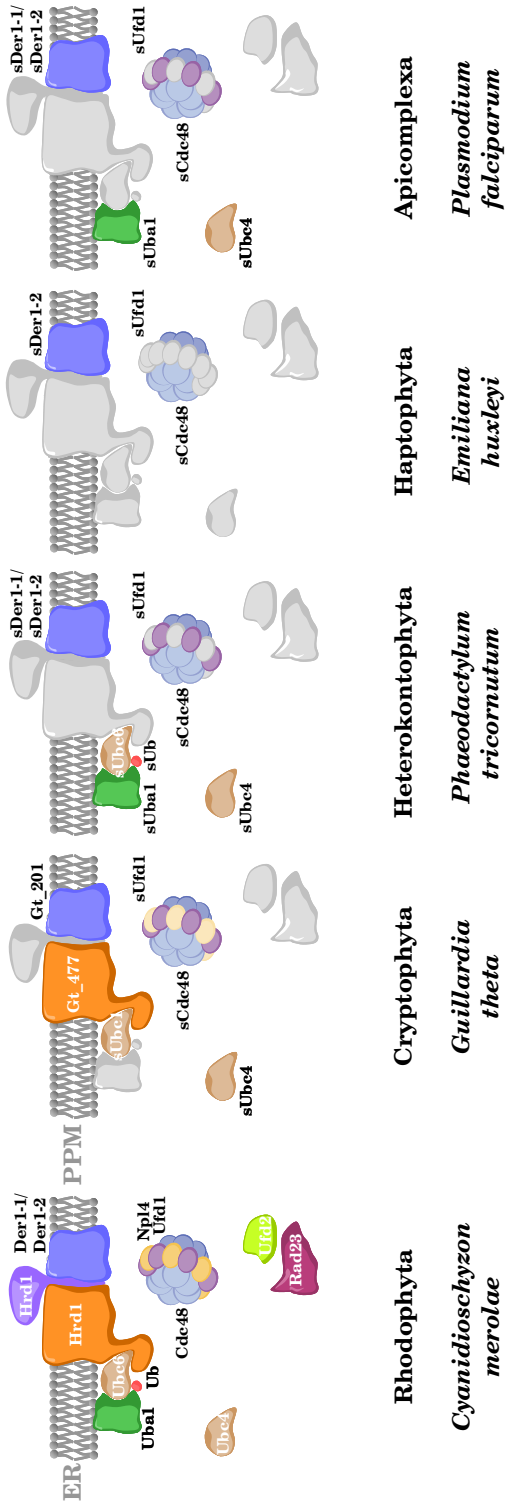


Abb. 4-11: Symbiontspezifische ERAD-Faktoren in Chromalveolaten mit PPM. Schematische Darstellung der durch Datenbankanalyse bislang identifizierten symbiontspezifischen ERAD-Komponenten basierend auf dem Modell von *Saccharomyces cerevisiae* [vgl. 2.3.2]. Die Rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae* im Vergleich. Nicht identifizierte Faktoren sind grau dargestellt.

4.2.3 Analyse der PPC- bzw. Apicoplastzielsteuerungssequenzen

Die Zielsteuerungssequenzen aller identifizierten symbiontspezifischen Proteine sind in Tab. 8-1 aufgelistet, multiple Alignments der Zielsteuerungssequenzen (als Sequenzlogo bzw. Frequenzplot) finden sich in Abb. 8-3.

Die Aminosäurekomposition der Signalpeptide (Positionen -20 bis -1) der PPC-Zielsteuerungssequenzen der Heterokontophyten und Haptophyten zeigten die Zusammensetzung typischer Signalpeptide sekretorischer Proteine mit einem kurzen variablen hydrophilen N-Terminus, einem leucinreichen hydrophoben Mittelteil und einem kurzen polaren C-Terminus Martoglio and Dobberstein, 1998. Das Erkennungsmotiv für die Signalpeptidase zwischen Signal- und Transitpeptid (ab Position +1) entspricht mit Ala-X-Ala (X, beliebige Aminosäure; Aminosäuren mit kurzen ungeladenen Seitenketten bevorzugt) ebenfalls den Erwartungen. Die Position +1 des Transitpeptides ist nicht konserviert und wird nicht wie bei nucleuscodierten plastidären Proteinen von einer aromatischen Aminosäure eingenommen Kilian and Kroth, 2005. Die Aminosäurekomposition der Transitpeptide selbst scheint variabel und nicht konserviert, basische (besonders Arginin) und phosphorylierbare Aminosäuren häufen sich jedoch. Damit entsprechen die PPC-Zielsteuerungssequenzen der Heterokontophyta (und bedingt auch der Haptophyta) tatsächlich denen der Cryptophyta Gould et al., 2006b. Ein vergleichbares Bild zeigt sich auch für die Apicoplastzielsteuerungssequenzen der Apicomplexa. Aufgrund der geringen Anzahl zur Verfügung stehender Sequenzen sind die Merkmale im Sequenzlogo jedoch weit weniger stark ausgeprägt. Charakteristische Positionen werden hier von Aminosäuren gleicher Eigenschaften ersetzt, die durch A/T-reichere Codons codiert werden (Phenylalanin statt Leucin, Lysin statt Arginin).

Um die Funktionalität der *in silico* vorhergesagten topogenen Signale der symbiontspezifischen ERAD-Komponenten exemplarisch für *Phaeodactylum tricornerutum* zu ermitteln, wurden die PPC-Zielsteuerungssequenzen der identifizierten Faktoren als GFP-Fusionsprotein in *Phaeodactylum tricornerutum* exprimiert und die Lokalisation der Proteine fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Dazu wurden die entsprechenden Genregionen (Pt_sder1-1, Basen 1 - 282; Pt_sder1-2, Basen 1 - 348; Pt_scdc48, Basen 1 - 345, Pt_sufd1 1 - 323; Pt_suba1; Basen 1 - 477 und Pt_sub, Basen 1 - 162) aus gRNA bzw. gDNA nach 7.10 unter Verwendung der in 7.5 angegebenen Primer und Einfügen terminaler

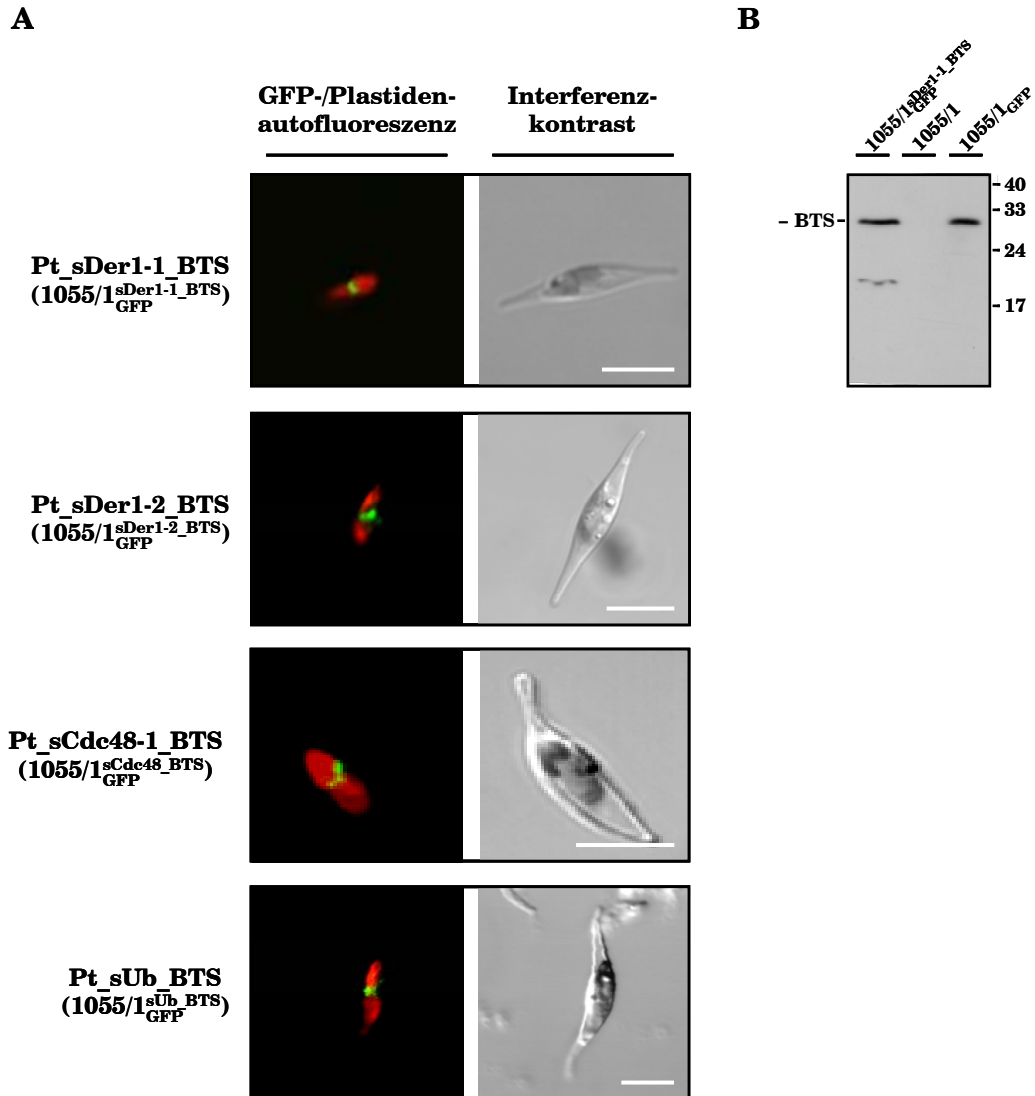


Abb. 4-12: *In vivo* Lokalisation von *Phaeodactylum tricornutum* PPC-Zielsteuerungssequenzen fusioniert an GFP.

A. Die Zielsteuerungssequenzen (BTS) der symbiontspezifischen ERAD-Faktoren sDer1-1 (1055/1^{sDer1-1_BTS}_{GFP}), sDer1-2 (1055/1^{sDer1-2_BTS}_{GFP}), sCdc48 (1055/1^{sCdc48_BTS}_{GFP}) und Ubiquitin (Pt_sUb, 1055/1^{sUb_BTS}_{GFP}) von *Phaeodactylum tricornutum* CCAP1055/1 dirigieren GFP in die dem periplastidären Kompartiment homologe Region des sekundären Symbionten, GFP-Fluoreszenz in grün, Plastidenautofluoreszenz in rot. Der Maßstab beträgt 5 μ m. **B.** Die Zielsteuerungssequenz (37 kDa inkl. GFP) wird nach dem Import in das PPC der Heterokontophyte prozessiert (28 kDa). 1055/1, Wildtyp; 1055/1_{GFP}, cytosolisch exprimiertes GFP (~27 kDa) als Kontrollen aus Sommer et al., 2007.

EcoRI- bzw. *NcoI*-Restriktionsschnittstellen amplifiziert, restringiert und zusammen mit *egfp* mit *NcoI* und *HindIII*-kompatiblen Schnittstellenüberhängen in den *EcoRI/HindIII* geöffneten Vektor pPhaT1 kloniert. Die Validität wurde durch Sequenzieren der Konstrukte nach 7.13 überprüft. Die Transfektion von *Phaeodactylum tricornutum* erfolgte gemäß 7.8. Abb. 4-12A zeigt fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen positiver Transfektanden. Erwartungsgemäß wurde die GFP-Fluoreszenz in einer punktförmigen Struktur, dem sogenannten "Blob" nach Kilian and Kroth, 2005, der eng assoziiert mit der Plastidenautofluoreszenz vorliegt, beobachtet. Gould et al. konnten zeigen, dass diese Lokalisation stets in der Mitte der beiden lanzettförmigen Plastidenhälften zu beobachten ist und dem PPC des sekundären Symbionten der Cryptophyta entspricht Gould et al., 2006b. Auch nach mehrmaliger Transfektion konnten für Pt_sUfd1 keine positiven, fluoreszierenden Klone ermittelt werden. Die Funktionalität der PPC-Zielsteuerungssequenz von Pt_sUba1 konnte in weiterführenden Experimenten inzwischen ebenfalls nachgewiesen werden (nicht dargestellt).

Die Westernblotanalyse mit anti-GFP Antikörper zeigt zudem eine Prozessierung des Pt_sDer1-1_BTS-GFP-Konstruktes [Abb. 4-12B].

Exemplarisch wurde im Anschluss die Apicoplastzielsteuerungssequenz des symbiontspezifischen Pt_sDer1-1 als GFP-Fusionsprotein episomal in *Plasmodium falciparum* exprimiert und durch fluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Lokalisation die Funktionalität des topogenen Signals ermittelt. Dazu wurde die entsprechende Genregion (Basen 1 - 416) aus gDNA nach 7.10 unter Verwendung der Primer Pf_sDer1 fw/Pf_sDer1 rv amplifiziert und mittels der eingebrachten *XhoI*-/*AvrII*-Restriktionsschnittstellen in den entsprechend geöffneten Vektor pARL-GFP kloniert. Die Validität des Konstruktes wurde nach 7.13 überprüft. Die Transfektion von *Plasmodium falciparum* erfolgte nach 7.8. Wie erwartet konnte eine punktförmige GFP-Fluoreszenz im Apicoplast beobachtet werden [Abb. 4-13A]. Eine zusätzliche Behandlung der Parasiten mit *MitoTrackerOrange CMTMRos* und *Hoechst33342* [vgl. 7.20] macht deutlich, dass es sich hierbei nicht um eine nucleäre oder mitochondriale Lokalisation handelt. Westernblotanalysen mit anti-GFP Antikörper zeigen zudem, dass das BTS-GFP-Konstrukt prozessiert wird [Abb. 4-13B]. In weiterführenden Experimenten konnte inzwischen auch die Funktionalität der Zielsteuerungssequenzen der Proteine Pf_sCdc48 und Pf_sUba1 gezeigt werden (nicht dargestellt).

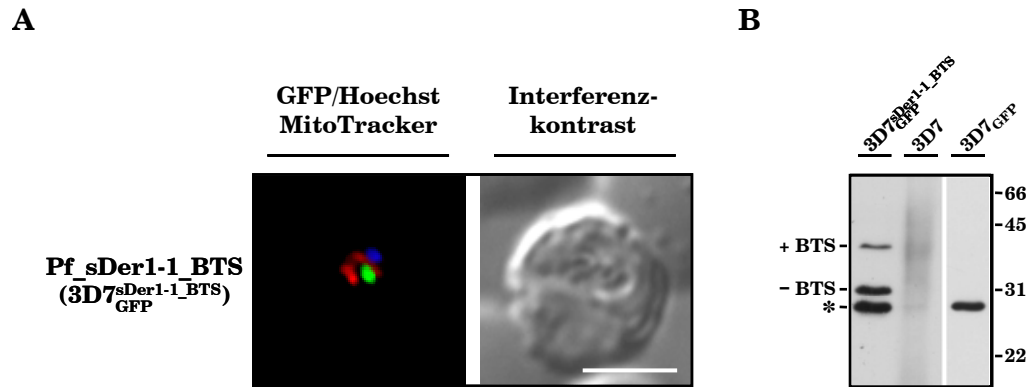


Abb. 4-13: *In vivo* Lokalisation der Pf_sDer1-1 Apicoplastzielsteuerungssequenz fusioniert an GFP.

A. Die Apicoplastzielsteuerungssequenz (BTS) des symbiontspezifischen sDer1-1 ($3D7_{GFP}^{sDer1-1_BTS}$) dirigiert GFP in den Apicoplast von *Plasmodium falciparum* 3D7, GFP-Fluoreszenz in grün, MitoTracker in rot und Hoechst in blau. Der Maßstab beträgt 4 μm . Die typische punktförmige Apicoplastlokalisierung ist evident.

B. Das *Plasmodium falciparum* sDer1-1_BTS-Konstrukt (+BTS; ~43 kDa) wird nach dem Import in den Symbionten prozessiert (-BTS, ~30 kDa). *, GFP-Degradationsprodukt; 3D7, Wildtyp; 3D7_{GFP}, GFP cytosolisch (~27 kDa) aus Sommer et al., 2007.

5 Diskussion

5.1 sDer1 & Co.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, dass die Cryptophyte *Guillardia theta* eine Reihe nucleomorphcodierter, symbiontspezifischer Proteine besitzt, die Homologien zu Komponenten des ERAD-Systems aus *Saccharomyces cerevisiae* aufweisen. Exemplarisch wurde in dieser Arbeit Gt_ORF201, das zu Der1p homolog ist, funktionell und strukturell charakterisiert. Durch Komplementation zweier *Saccharomyces cerevisiae* Δ der-Deletionsmutanten wurde gezeigt, dass Gt_ORF201 tatsächlich ein funktionelles Ortholog zu Der1p ist [vgl. 4.1.2] und partiell den Export missgefalteter löslicher Proteine in Hefe aus dem ER vermitteln kann. Mittels eines spezifisch gegen Gt_ORF201 generierten Antikörpers konnte eine Lokalisation des Proteins in der PPM des Symbionten nachgewiesen werden [vgl. 4.1.3]. Weiterhin konnten Gt_ORF477, ein Homolog zu Hrd1p, Gt_sCdc48, ein Homolog zur ERAD-assoziierten ATPase Cdc48, ein verkürztes Ufd1 (Gt_sUfd1, ein Cdc48-Cofaktor) und Gt_sUbc-21kDa, ein putatives Homolog zum ERAD-assoziierten Ubc-Protein Ubc1p aus *Saccharomyces cerevisiae*, in *Guillardia theta* identifiziert werden [vgl. Tab. 4-1]. Die *in silico* Analyse ergab, dass mit Einschränkungen für Gt_Ufd1 alle strukturellen Voraussetzungen für eine orthologe Funktion dieser Proteine gegeben sind [siehe 4.1.4].

Mit den nucleuscodierten Proteinen Gt_hDer1-2 und Gt_hCdc48 konnten bislang zwei wirtsspezifische, ERAD(-assoziierte) Faktoren identifiziert werden [vgl. 4.1.5], die parallel zu den nucleomorphcodierten, PPM-residenten bzw. assoziierten Faktoren in *Guillardia theta* existieren und Bestandteile einer eigenständigen Wirtsmaschinerie darstellen. Eine Rolle des symbiontischen "ERAD"-Systems bei der Degradation missgefalteter sekretorischer Wirtspoteine im Rahmen der ER-Qualitätskontrolle ist daher unwahrscheinlich. Jedoch codiert das Nucleomorphgenom von *Guillardia theta* insgesamt über 20 Gene für Unter-

einheiten des PPC-residenten 26S Proteasoms Douglas et al., 2001. Degradierete Wirtsproteine als Bezugsquelle von Aminosäuren für katabolische Prozesse innerhalb des PPC könnten damit eine Existenz der Maschinerie nahe legen.

Neuere Arbeiten, nach denen das Der1-Protein Dfm1p aus *Saccharomyces cerevisiae* zusammen mit Cdc48p unabhängig von ERAD in Prozessen der ER-Homoöstase eine Rolle spielt Sato and Hampton, 2006, und Arbeiten, nach denen Cdc48p in Prozessen der homotypischen Fusion der ER-Membran fungiert Latterich et al., 1995, eröffnen die Möglichkeit zur Argumentation in Richtung genereller Funktionen, z.B. im Rahmen der Biogenese der PPM.

Die Existenz der symbiontischen "ERAD"-Faktoren ist nicht cryptophyten-spezifisch, wie aufgrund der besonderen Morphologie des sekundären Symbionten angenommen werden könnte, sondern ein bei Chromalveolaten nahezu ubiquitär vorkommendes Merkmal. So wurden Homologe zu Der1p, Cdc48p und Ufd1p (und andere) in den Genomen aller bislang sequenzierten Chromalveolaten identifiziert [vgl. Abb. 4-11 bzw. Tab. 4-2], die als Präproteine mit einer funktionellen zweiteiligen Zielsteuerungssequenz zum Erreichen der PPC-homologen Region innerhalb des Symbionten codiert sind. Die Ausnahme innerhalb der Chromalveolaten bilden scheinbar die Dinophyta, deren sekundäre Plastide als einzige nur von drei Membranen begrenzt wird bzw. Vertreter anderer Gruppen, deren sekundäre Plastide sekundär "verloren" gegangen ist [vgl. 4.2.2.]. Allerdings erlaubt die schlechte Datenlage im Fall der Dinophyta keine sicheren Aussagen.

5.2 ERAD als Translokator

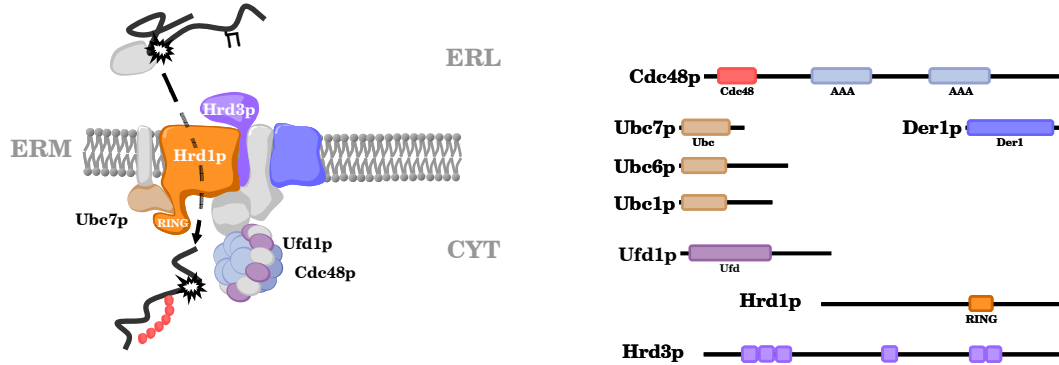
Wie in 3.3 dargelegt, beschreibt der Prozess der ER-assoziierten Degradation die Erkennung, Isolierung und subsequente Degradation aberanter Proteinspezies im Rahmen der ER-Qualitätskontrolle. Der Abbau der Proteine erfolgt dabei nicht im ER selbst, sondern im Cytosol durch das Ubiquitin-Proteasom-System. Die ERAD-Maschinerie bildet daher primär einen heteromeren Proteinkomplex zur Dislokation missgefalteter lumenaler bzw. membranständiger Polypeptide aus dem ER bzw. der ER-Membran in das Cytosol. Der hohen Varianz möglicher Substrate wird dabei mit divergenten Mechanismen der Translokation begegnet, die jedoch alle in ihrer Abhängigkeit von Cdc48p (und ihren Cofaktoren) konvergieren vgl. Ismail and Ng, 2006. Lumenale ERAD-Substrate werden in *Saccharomyces cerevisiae* nach Erkennung durch Hrd3p unter Betei-

ligung der Proteine Hrd1p und Der1p (möglicherweise durch Ausbildung einer transienten oder permanenten Pore) über die ER-Membran transloziert. Die initiale Ubiquitinylierung durch Hrd1p (E3), Ubc1p/6p oder 7p (E2) und Uba1p (E1) erfolgt noch während der Membranpassage auf cytosolischer Seite und dient der vollständigen Extraktion der Substratproteine aus der Membran durch Bindung an Cdc48p [vgl. Abb. 5-1A] Ye et al., 2001; Jarosch et al., 2002.

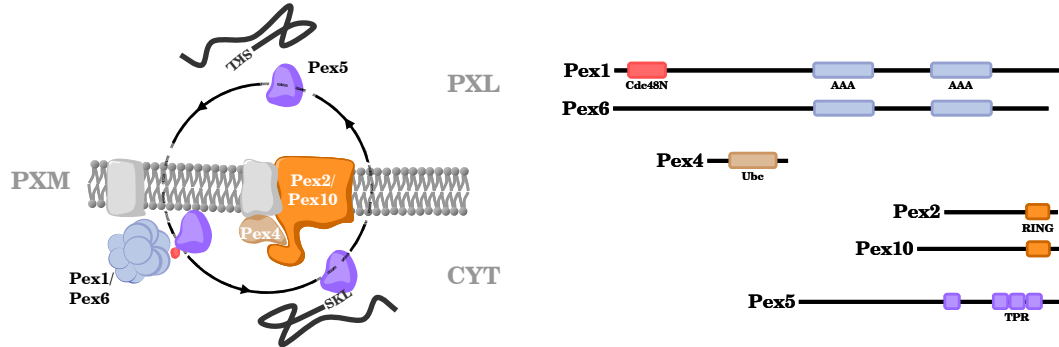
Ein ERAD-abgeleitetes System zur Translokation löslicher Proteine kann, wenn auch in umgekehrter Richtung, vom Cytosol ins Lumen transportierend, bei der peroxisomalen Pex5-Maschinerie beobachtet werden. Gabaldon et al. konnten zeigen Gabaldon et al., 2006, dass die Pex-Proteine 1, 2, 4, 5, 6, und 10 (*Saccharomyces cerevisiae*) Homologien zu Komponenten des ERAD-Systems besitzen. Um den Transport in umgekehrter Richtung über die peroxisomale Membran zu gewährleisten, wird der Importrezeptor Pex5 (Homolog zu Hrd3p) selbst zum Pseudocargo. Der Mechanismus ist eine Art "Antiport", bei dem zunächst in einem energieabhängigen Schritt (vermittelt durch die Cdc48-homologen ATPasen Pex1 und Pex6) der unbeladene Importrezeptor von der peroxisomalen Membran (PXM) bzw. dem peroxisomalen Lumen (PXL) ins Cytosol disloziert wird. Er wird dabei kurzzeitig integraler Bestandteil des Proteintranslokons Transient Pore Hypothesis, vgl. Erdmann and Schliebs, 2005. Seine vollständige Extraktion aus der Membran erfolgt nach Ubiquitinylierung, die vermutlich durch die Hrd1p-, bzw. Ubc1p-homologen Faktoren Pex2 und/ oder Pex10 und Pex4 im Zusammenspiel mit einem ubiquitinaktivierenden Enzym (möglicherweise Uba1p) erfolgt [vgl. Abb. 5-1B]. Im Gegenzug wird cytoplasmatisch lokalisierter Rezeptor, an den ein Cargoprotein über sein PTS1-Erkennungssignal (mit dem Motiv Ser-Leu-Lys) gebunden ist, in die PXM integriert und das Cargo und möglicherweise auch der Rezeptor in das PXL entlassen Shuttling Receptor Model, vgl. Dammai and Subramani, 2001. Die Integrität des Systems wird vermutlich über eine regulationsbedingte Degradation des Pex5 gewährleistet, das dazu an der PXM polyubiquitinyliert werden kann.

Mit den im Rahmen dieser Arbeiten beschriebenen symbiontspezifischen Faktoren in Cryptophyten ist ein drittes ERAD bzw. zweites ERAD-abgeleitetes System identifiziert, dessen Funktion möglicherweise ebenfalls in dem primären Aspekt der Proteintranslokation zu suchen ist [siehe 5.3].

A ERAD



B Pex5 Shuttle



C TPM

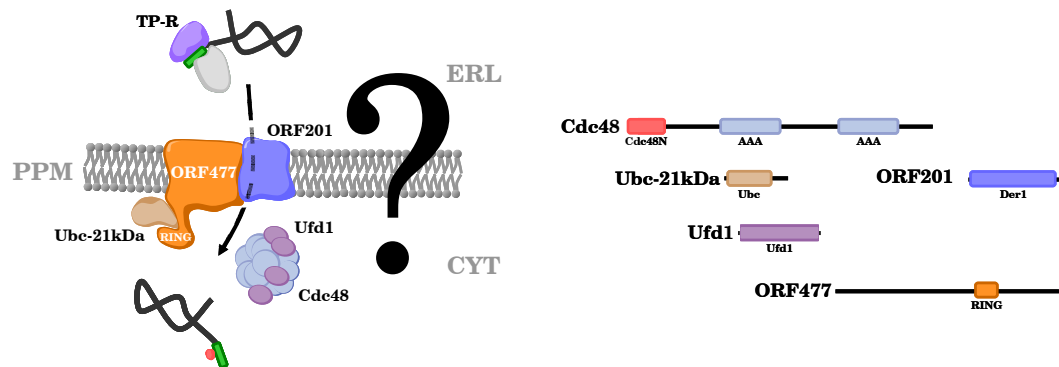


Abb. 5-1: ERAD als Translokator.

A. ERAD- und **B.** Pex5-Maschinerie (nach dem Modell von *Saccharomyces cerevisiae*) im Vergleich mit **C.** dem postulierten TPM (*Guillardia theta*). Homologe Faktoren sind in gleichen Farben dargestellt, nicht näher beschriebene Faktoren in grau. CYT, Cytosol; ERL, ER-Lumen; ERM, ER-Membran; PPM, periplastidäre Membran; PXL, peroxisomales Lumen; PXM, peroxisomale Membran nach Gabaldon et al., 2006. Näheres siehe Text.

5.3 sDer1 & Co., Translokator der periplastidären Membran?

Aufgrund der restriktiven Kapazität ihrer Genome müssen primäre Plastide und PPC der Cryptophyta mit Tausenden von Proteinfaktoren vom Wirt versorgt werden. Diese werden als Präproteine im Wirtsgenom codiert und wie sekretorische Proteine cotranslational ins ER importiert Gould et al., 2006a; 2006b. Ähnliches gilt für die sekundären Plastiden anderer Chromalveolaten Cavalier-Smith, 2003; Kilian and Kroth, 2005. In den Chromobioten liegt der sekundäre Symbiont in einer perinucleären Zisterne des rauen ER. (Peri-)plastidäre Proteine müssen wie in 2.4 dargestellt von den sekretorischen getrennt und über die PPM in das PPC transportiert werden. Bei den Alveolaten ist die sekundäre Plastide (Apicoplast) nicht mit dem Wirts-ER assoziiert. Da die Proteine in diesen Organismen jedoch auch über den sekretorischen Weg zum Apicoplast transportiert werden [vgl. 2.2.2], liegt es nahe zu vermuten, dass es sich dabei um ein sekundäres Merkmal handelt. Der monophyletische Ursprung der Chromalveolaten evoziert einen generellen Importmechanismus für die Präproteine an der PPM, der bereits im prototypischen Vorläufer der Chromalveolaten angelegt war Cavalier-Smith, 1999.

Die Substratdislokation in ERAD ist der bislang einzig bekannte Mechanismus der Zelle zum Export miss- bzw. teilgefalteter Proteine aus dem ER-Lumen zurück ins Cytosol und damit der einzige Prozess, der dem Weitertransport ungefalteter Polypeptide (peri-)plastidärer Präproteine aus dem ER ins PPC mechanistisch und direktional gleich kommt. Da die hier identifizierten membranständigen symbiontspezifischen ERAD-Faktoren Der1 und Hrd1 (letzteres bislang nur bei Cryptophyten identifiziert) im Besonderen an der Dislokation lumenaler ERAD-Substrate beteiligt sind, und die in dieser Arbeit durchgeführten Studien eine PPM-Lokalisation von Gt_ORF201 und damit der gesamten Maschinerie nahe legen, wird eine Funktion als TPM (*Translocator Of The Peri-plastid Membrane*) postuliert [vgl. Abb. 5-1C].

5.3.1 Implikation für den Importmechanismus

Basierend auf den Prinzipien der Substratdislokation in ERAD wird im Folgenden versucht, ein Modell für den Präproteinimport an der periplastidären Membran zu erarbeiten.

Präproteinerkennung und -rekrutierung im ER

Da wie bereits zuvor erwähnt der Symbiont der Chromobiota in einer perinucleären ER-Cisterne des Wirtes lokalisiert ist, und ERAD und TPM (wenn auch in verschiedenen Membranen) nebeneinander existieren, müssen zumindest für die initialen Schritte der Substrat- bzw. Cargoerkennung und -rekrutierung signifikante Unterschiede beider Systeme postuliert werden. Während beim klassischen ERAD Substrate in einem komplexen Zusammenspiel von Rezeptoren, Chaperonen und Faltungsenzyme aufgrund ihrer Missfaltung und/oder der Modifikation ihrer N-Glycane erkannt werden [vgl. 2.3.1] Tsai et al., 2001; Kabani et al., 2003; Helenius and Aebi, 2004, muss für die Erkennung der Zielsteuerungssequenzen (peri-)plastidärer Präproteine ein eigener, unabhängiger Rezeptor postuliert werden. Gould et al. konnten zeigen, dass das Transitpeptid der Zielsteuerungssequenzen nach Abspaltung des Signalpeptides ausreichend für den Import der Proteine in das PPC-homologe Kompartiment des sekundären Symbionten ist Gould et al., 2006a; 2006b. Daher scheint das Transitpeptid (TP) als Ligand für einen Import-Rezeptor (TPM-Rezeptor, TPM-R) zu fungieren, der die initialen Transportvorgänge am TPM einleitet. Bei den Rezeptoren von TOC und TOM (Toc34 und Tom70), den Präproteintanslokatoren der äußeren Plastiden- bzw. Mitochondrienmembran, wird die Interaktion mit den Cargo- bzw. Substratproteinen über assoziierte Chaperone (Hsp90) vermittelt Fan et al., 2006; Qbadou et al., 2006. Sowohl Toc34 als auch Tom70 sind Proteine der TPR-Familie (*Tetratricopeptide Repeats*), zu denen auch Hrd1p gehört, das mit den TPRs verwandte *Sel1-Repeats* besitzt. Ein TPR besteht aus einem 34 Aminosäuren langen *Helix-Turn-Helix* Motiv, das wiederum mit benachbarten TPRs eine Spirale antiparaller Helices ausbildet. Die Anzahl der TPRs innerhalb der Mitglieder dieser Proteinsuperfamilie variiert. TPR-Proteine vermitteln Protein-Protein-Interaktion als auch die Assemblierung von Multiproteinkomplexen in diversen zellulären Prozessen D'Andrea and Regan, 2003. Damit bildet die TPR-Proteinfamilie eine mögliche Kandidatengruppe für den postulierten TPM-R. Pex5, der Rezeptor der peroxisomalen Proteinimportmachi-

nerie, zählt ebenfalls zu dieser Familie [vgl. 5.2]. Bei den durchgeführten *in silico* Analysen zur Identifikation der symbiontspezifischen ERAD-Faktoren wurden jedoch weder symbiontspezifische Hrd3-Homologe, noch andere konservierte TPR-Proteine mit PPM-Zielsteuerungssequenz identifiziert.

Bislang ließen sich durch die Sequenzanalyse bekannter (peri-)plastidärer Proteine keine konservierten Motive oder Sekundärstrukturen ableiten, die dem TPM-R möglicherweise zur Erkennung dienen. Die Arbeiten von Gould et al. zeigen jedoch, dass das Transitpeptid als Signal ausreichend für die Passage der PPM zu sein scheint Gould et al., 2006a; Gould et al., 2006b. Hinweise auf die Beschaffenheit des TPM-R-Erkennungssignals liefern Arbeiten von Foth bzw. Tonkin et al., die eine auffällige Häufung positivgeladener Aminosäuren (Lys bzw. Arg) in TPs nucleuscodierter Apicoplastproteine von *Plasmodium falciparum* bzw. *Toxoplasma gondii* beobachten, und ihren Einfluss auf die Intergrität des Signals demonstrieren Foth et al., 2003; Tonkin et al., 2006a. So ist das Vorkommen, nicht aber die genaue Position dieser Aminosäuren innerhalb des TP von Bedeutung. Die Substitution N-terminal gelegener Lysine bzw. Arginine durch negativgeladene Aminosäuren (z.B. Glutamat, Aspartat) führt zum *Mistargeting* der untersuchten GFP-Fusionsproteine, die über den sekretorischen Weg der parasitophoren Vakuole zugeführt werden Foth et al., 2003; Tonkin et al., 2006a. Eine ähnliche Häufung positivgeladener Aminosäuren finden sich auch in den TP der Zielsteuerungssequenzen PPC-/PPM-lokalisierter Präproteine von *Guillardia theta* und *Phaeodactylum tricornutum* Kilian and Kroth, 2005; Gould, 2006 wie auch bei den TPs der in dieser Arbeit identifizierten symbiontspezifischen ERAD-Komponenten [vgl. 4.2.3].

Um zu verhindern, dass (peri-)plastidäre Proteine dem sekretorischen Weg zugeführt werden, erfolgt die Erkennung der Cargoproteine wahrscheinlich kurz nach oder während ihrer cotranslationalen Synthese an der ER-Membran. Der TPM-R ist daher vermutlich ein ER-residenter, lumenaler Faktor, der das TP unmittelbar nach Abspaltung des SP bindet und die Polypeptide gemeinsam mit Chaperonen die die Aufrechterhaltung der Transportkompetenz gewährleisten, an den TPM rekrutiert. Eine Interaktion von BiP mit Zielsteuerungssequenzen apicoplastlokalisierter nucleuscodierter Proteine in *Plasmodium falciparum* und *Toxoplasma gondii* konnte von Foth et al. bzw. Yung et al. nachgewiesen werden Foth et al., 2003; Yung et al., 2003. Eine Deletion der BiP/Hsp70-Bindestelle(n) im TP führt, wie auch die Substitution positivgeladener Aminosäuren, zum *Mistargeting* der untersuchten GFP-Fusionsproteine.

Translokation über die periplastidäre Membran

Die Dislokationsmechanismen der verschiedenen ERAD-Substrate aus dem ER variieren je nach Art und Lage der Läsionen innerhalb der Proteine vgl. Ismail and Ng, 2006. Für den Export lumenaler Substrate wird eine bidirektionale Funktion des Sec61-Komplex postuliert, bei dem die Dislokation der Proteine unter Rekrutierung spezifischer Faktoren in einem zum Import gegenläufigen Prozess von statten geht. Eine tatsächliche Beteiligung von Sec61 wird kontrovers diskutiert [vgl. 2.3.2]. Jüngere Forschungsergebnisse evozieren zunehmend eine essentielle Funktion von Der1p und Hrd1p bei der Dislokation membranständiger bzw. lumenaler ERAD-Substrate Carvalho et al., 2006.

In den hier durchgeführten Genomanalysen konnten keine Hinweise auf die Existenz symbiontspezifischer Sec-Komponenten gewonnen werden. Auch das in *Thalassiosira pseudonana* identifizierte zweite Sec61 weist nicht die für das Erreichen bzw. die Insertion der PPM zu postulierenden topogenen Signale (BTS) auf [vgl. 6.1]. Basierend auf den in dieser Arbeit identifizierten sDer1- und sHrd1-Homologen erscheint daher ein Sec-unabhängiger Importmechanismus des TPM möglich bzw. wahrscheinlich. Der1 oder/und Hrd1 könnten als mehrfach die Membran durchspannende Proteine einen homo- bzw. heteromeren Komplex bilden, der als Kanal oder transiente Pore die Präproteintanslokation über die PPM vermitteln könnte. Analog zum Hrd-Komplex bei ERAD könnte das symbiontspezifische sHrd1-Homolog, dessen Existenz für alle sekundären Plastiden mit 4 Hüllmembranen zu postulieren ist, die Prozesse der Präproteinerkennung und -translokation koordinieren.

Fraglich bleibt, wie sDer1 bzw. sHrd1 in die PPM inserieren. Die erfolgreiche Komplementation von Der1p in Hefe lässt vermuten, dass die erste Transmembrandomäne von Gt_ORF201 funktionell dem ER-Signalanker von Der1p entspricht, was für eine SRP-vermittelte, Sec61-abhängige cotranslationale Insertion des Hefeproteins in die ER-Membran spricht. Wie zuvor beschrieben konnten keine symbiontspezifischen Sec61-Komponenten in Chromalveolaten identifiziert werden, die den Einbau der Proteine in die PPM vermitteln könnten. Ein Sec61-unabhängiger, möglicherweise spontaner Mechanismus, wie man ihn von einigen Proteinen der Thylakoidmembran bei primären Plastiden kennt Jarvis and Robinson, 2004, mag daher vorliegen. Ein dualer Zielsteuerungsmechanismus von Sec61 für Wirt und Symbiont ist jedoch nicht auszuschließen. Auch die Frage, ob Gt_ORF201 die PPM direkt oder indirekt über die Nucleomorphhülle, die als remanentes periplastidäres Reticulum des Symbionten diskutiert wird Cavalier-Smith, 2003, inseriert, bleibt offen.

Ubiquitin

Die vollständige Extraktion der ERAD-Substrate aus der ER-Membran während ihrer Dislokation erfolgt durch den cytosolisch lokalisierten Cdc48-Komplex, gebildet von der ATPase Cdc48 und ihrem heterodimeren Cofaktor Ufd1/Npl4 Ye et al., 2001; Jarosch et al., 2002. Zu diesem Zweck werden die Substrate während der Passage der Membran auf cytosolischer Seite im Zusammenspiel von Hrd1 oder Doa10 (E3), Uba1 (E1) und Ubc6/7 (E2) oligoubiquitinyliert und über Ufd1/Npl4 an Cdc48 gebunden [vgl. 2.3.2]. Via Ubx2 und/oder Der1 wird der Komplex an die ER-Membran rekrutiert und in einem ATP-abhängigen Schritt die Extraktion der Substratproteine aus der Membran bzw. dem Translokation bewerkstelligt.

Die Summe der in den einzelnen Chromalveolaten identifizierten symbiontspezifischen "ERAD"-Faktoren (u.a. Homologe zu Cdc48, Ufd1, Uba1, Ubiquitin, Ubc1/4/6 und Hrd1) legt nahe, dass der terminale Schritt der Präproteintranslokation über einen vergleichbaren Mechanismus von statten geht. Wie in Kapitel 4 dargelegt, sind alle sUfd1-Homologe C-terminal verkürzt (Cdc48- und Npl4-Bindedomäne fehlen) und ein sNpl4-Homolog konnte bei keinem der untersuchten Organismen identifiziert werden. Die Ausbildung eines funktionellen Cdc48-Komplexes erscheint somit nicht möglich, ohne dass ein spezifischer Faktor postuliert wird, der die Funktion von Npl4 ersetzt und die Interaktion von Cdc48 mit den Ufd1-assoziierten Präproteinen vermittelt.

Da eine Ubiquitinylierung (peri-)plastidärer Proteine bislang in keinem der untersuchten Systeme beobachtet werden konnte, sofern eine Ubiquitinylierung der Cargoproteine tatsächlich vorliegt, muss eine symbiontspezifische Ubiquitinhydrolase postuliert werden, die die Proteine nach vollständigem Import deubiquitinyliert. Alternativ ist denkbar, dass eine Ubiquitinylierung des Transitpeptides ausreichend ist, um die vollständige Translokation der Proteine über die PPM zu gewährleisten. Da Ubiquitinylierung von ERAD-Substraten nicht zwangsläufig an spezifischen Lysinen innerhalb der Substratproteine erfolgt Pickart, 2001, wäre das Vorkommen einzelner Lysinreste innerhalb des TP ausreichend. Eine Entfernung der Modifikation könnte dann im Rahmen des *Transit Peptide Processing* im PPC- bzw. Plastidenstroma von statten gehen. In diesem Sinne können vielleicht auch alte Arbeiten interpretiert werden, bei denen mit einem spezifischen Antiserum gegen Ubiquitin auf Ultradünnschnitten von *Guillardia theta* im Elektronenmikroskop bislang nicht zu erklärende Signale in der Plastide detektiert werden konnten (Uwe Maier, persönliche Kommunikation). Eine anders geartete Funktion der Ubiquitinylierung, wie sie bei-

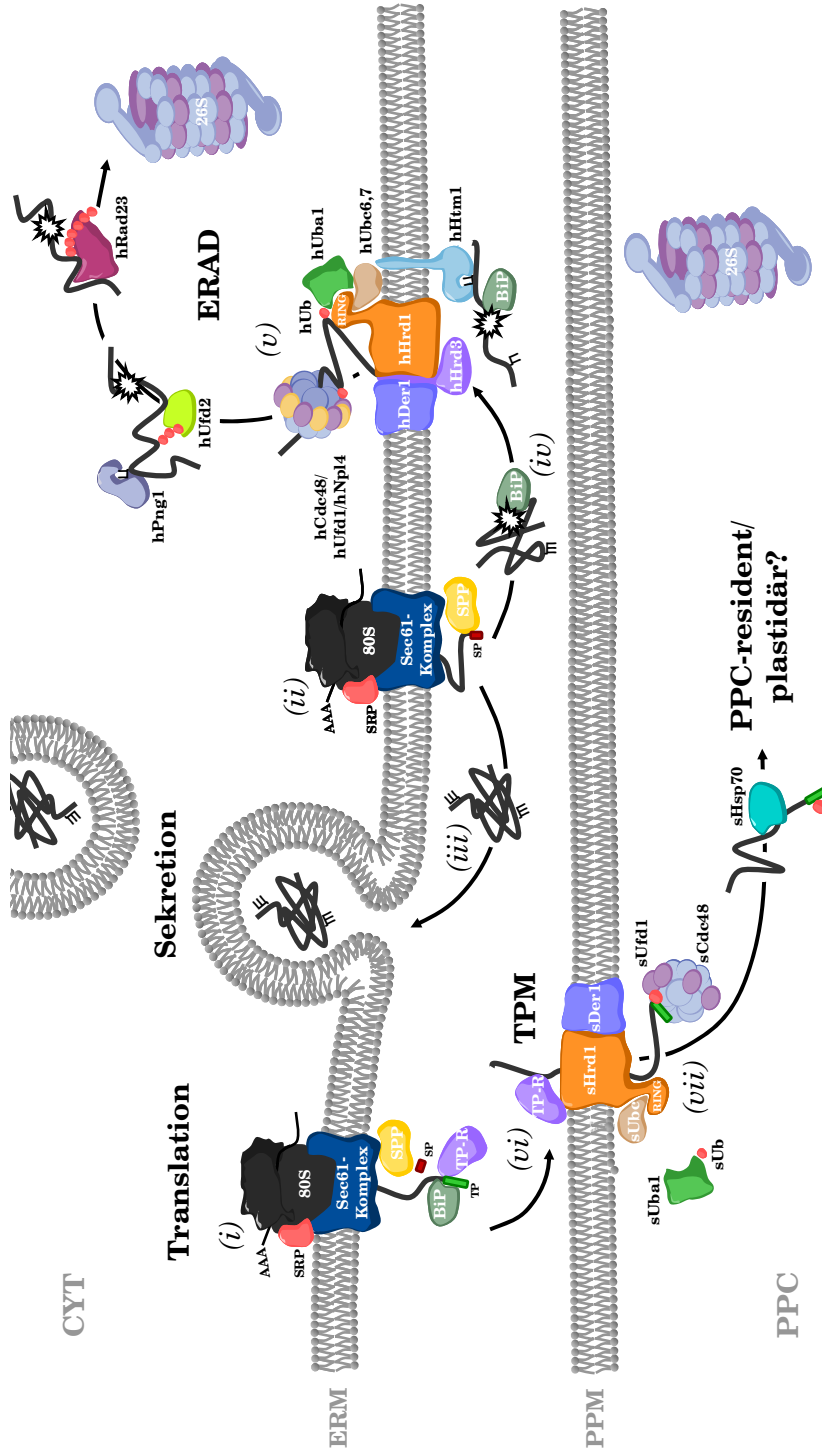


Abb. 5-2: Modell zum Präproteinimport in das periplastidäre Kompartiment der Cryptophyta. Nucleuscodierte (i) sekretorische bzw. (ii) (peri-)plastidäre Präproteine werden cotranslational ins raue ER-Lumen importiert. Sekretorische Proteine werden (iii) gefaltet, modifiziert und in Vesikeln verpackt dem Golgi-Apparat zugeführt. Missgefaltete Proteine werden (iv) spezifisch erkannt, markiert und (v) zu ihrer Degradation ins Cytosol zurücktransportiert. (Peri-)plastidäre Proteine werden (vi) über das TP ihrer zweiseitigen Zielsteuerungssequenz zum TPM rekrutiert und (vii) ins PPC importiert. CYT, Cytosol; ERM, ER-Membran; PPC, periplastidäres Kompartiment; PPM, periplastidäre Membran; SP, Signalpeptid; SPP, SP-Peptidase; TP, Transpeptidase; TP-R, TPM-Rezeptor. Siehe Text.

spielsweise bei der Rezeptorubiquitylierung peroxisomalen Importmaschinerie zu beobachten ist, wäre ebenfalls denkbar.

Noch während ihrer Dislokation werden ERAD-Substrate durch Ufd2 (E4) polyubiquityliert und damit der Degradation am Proteasom zugänglich gemacht Richly et al., 2005. Anders als die initialen Ubiquitinreste, werden Ufd2-verknüpfte Ubiquitinreste auf Lys48 des vorangehen Ubiquitins gekoppelt. Diese Lys48-Polyubiquitinkette wird dann spezifisch von Rad23 erkannt, das die Substratproteine nach ihrer Deglycosylierung zum Proteasom leitet [vgl. 3.3.2].

Bei dem ERAD-abgeleiteten TPM ist die Abschirmung der dislozierten Proteine vor der Degradationsmaschinerie, die rezent zumindest noch in Cryptophyten präsent ist, essentiell. Richley et al. konnten zeigen, dass Ufd2 sowohl Cdc48 als auch Rad23 bindet, und dass die Bindung zu Cdc48 ebenfalls über den heterodimeren Cofaktor Ufd1/Npl4 erfolgt Richly et al., 2005. Ubiquitylierte Substratproteine werden daher möglicherweise direkt von Cdc48/Ufd1/Npl4 via Ufd2 an Rad23 und damit an das Proteasom übergeben. Es ist daher nicht verwunderlich, dass bislang weder Ufd2 noch Rad23 als symbiontspezifische Faktoren in den analysierten Genomen identifiziert werden konnten. Auch das Fehlen von sNpl4 (siehe oben) könnte sich so erklärt lassen. Bezeichnend in diesem Zusammenhang ist zudem, dass das bislang nur in Heterokontophyten identifizierte sUb zwar das zur Oligoubiquitylierung notwendige konservierte Lysin an Position 29, nicht aber das zur Polyubiquitylierung benötigte konservierte Lysin an Position 48 trägt [vgl. Abb. 5-3].

Nachgeschaltete Prozesse

Nach dem vollständigen Import ins PPC bzw. die PPC-homologe Region des Symbionten, müssen residente Proteine prozessiert und gefaltet werden, während plastidäre Proteine, deren Transitpeptid mit einer aromatischen Aminosäure beginnt, über einen unbekanntes aber konservierten Mechanismus in die Plastide transportiert werden müssen [vgl. 2.4]. In beiden Fällen werden die Proteine zunächst möglicherweise von Hsp70 in Empfang genommen, das sowohl auf dem Nucleomorph der Cryptophyte als auch in den Genomen der Heterokontophyten als symbiontspezifisches Präprotein codiert ist. Plastidäre Proteine könnten dann über eine Art *Guidance Complex*, bestehend aus Hsp70 und 14-3-3, wie er für primäre Plastiden höherer Pflanzen postuliert wird, zur OEM rekrutiert werden Jarvis and Soll, 2002.

5.3.2 Evolution des TPM

Ursprung der periplastidären Membran

Zelluläre Membranen sind bezüglich ihrer Lipidzusammensetzung und Proteinkomposition hoch konserviert Prinzip der Membranheredität nach Cavalier-Smith, 2000. Die Charktersierung der PPM könnte sowohl Aufschluss über ihre Entstehung, als auch Hinweise über die Abfolge evolutiver Ereignisse während der sekundären Endosymbiose liefern. Die Entstehung der sekundären Plastide durch ein phagocytotisches Ereignis, wie von Cavalier-Smith postuliert, spräche für einen Ursprung der PPM in der Plasmamembran (PM) des sekundären Symbionten vgl. Cavalier-Smith, 2003. Der Import nucleuscodierter Präproteine verlief dann direktional in einem zur Sekretion gegenläufigen Prozess.

Ein alternatives Konzept zur Entstehung der PPM bzw. der sekundären Plastiden lieferte Melkonian Mitte der Neunziger Jahre, indem er die erste und zweite Membran auf eine Art autophagosomale ER-Cisterne des sekundären Wirtes zurückführte, wie es möglicherweise bei den bakteriellen Endosymbionten der picoplanctonischen Heterokontophyte *Symbiomonas scintillans* beobachtet werden kann Melkonian, 1996; Guillou et al., 1999. Ein solcher Prozess müsste jedoch den Verlust der PM oder aber eine Fusion der PM mit der inneren autophagosomalen Membran als Konsequenz gehabt haben. Bei einem autophagosomalen Ursprung der sekundären Plastide würde das Plastiden-/ER-Kontinuum evolutiv wohl als Relikt dieser Entwicklung gelten.

Rekonstruktion der evolutiven Ereignisse

Für die Rekostruktion der initialen Ereignisse der TPM-Entstehung ist der Ursprung der PPM von immanenter Bedeutung. Abgeleitet von den in dieser Arbeit durchgeführten Komplementationsexperimenten in *Saccharomyces cerevisiae* scheint die Insertion der PPM mechanistisch der Insertion von Membranproteinen in die ERM zu gleichen. Daher existieren im Prinzip nur zwei mögliche Szenarien, wie symbiontische ERAD-Faktoren die PPM erreichen können. Im Falle eines PM-Ursprungs der PPM, muss ein modifizierter Sekretionsmechanismus den symbiontischen ERAD-Faktoren Zugang zur heutigen PPM ermöglicht haben. Dies zieht jedoch die Konservation eines solches Mechanismus nach sich, der sich in der Existenz eines periplastidären Reticulums (PPR, als remanentes ER des Symbionten) in allen sekundären Plastiden rezenter Chromalveolaten (mit Ausnahme der Dinophyta) widerspiegeln sollte. Über ein

solches PPR könnten PPM und Kernhülle auch mit neuen Membranlipiden für ihr Wachstum versorgt werden Cavalier-Smith, 2003. Wie in 2.4 beschrieben, wird die Nucleomorphhülle der Cryptophyta als PPR diskutiert. Rudimentäre Membranstapel, wie sie in der PPC-homologen Regionen sekundärer Plastiden der Heterokontophyten beobachtet wurden Gibbs, 1979, werden funktionell in dieser Richtung gedeutet, während es bei Apicomplexa bislang keine Hinweise auf die Existenz eines PPR gibt Cavalier-Smith, 2003.

Im Falle eines ER-Ursprungs könnten nach Verlust oder Fusion der Plasmamembran mit der ERM des Wirtes symbiotische ERAD-Faktoren direkten Zugang zur der PPM finden, die dann topologisch und funktionell der symbiotischen ERM entspräche. Eine Entwicklung zusätzlicher PPM-relevanter topogener Signale wäre somit nicht notwendig. Zudem wäre das symbiotische ER redundant zum Wirts-ER und könnte von der Zelle eliminiert werden. Die Synthese der Membranlipide für PPM und Nucleomorphhülle (nur bei Cryptophyten) könnte von symbiontspezifischen Faktoren am Wirts-ER bewerkstelligt werden.

PPM-resident hat der Import der ersten nucleuscodierten plastidären Proteine über die symbiotischen ERAD-Faktoren wahrscheinlich tatsächlich im Rahmen der ER-Qualitätskontrolle stattgefunden. Da die meisten Proteine vermutlich bereits als Präproteine (mit TP) im Kerngenom des primären Wirtes codiert waren, mussten diese Proteine für ihren cotranslationen Import in das Wirts-ER zunächst nur ein funktionelles SP aquirieren (möglicherweise durch mutationsbedingte Anhäufung SP-relevanter Aminosäuren). Die Häufung dieser für das ER-überantigenen Proteine im Wirts-ER (mit deren Handhabung die Zelle wahrscheinlich überfordert war) könnte im Rahmen der UPR der ERQC zunächst die Dislokation dieser Proteine sowohl ins Cytosol als auch ins (heutige) PPC bewirkt haben. Wie in 5.3.1 angedeutet, könnte bereits eine einzige Mutation im symbiontspezifischen Ubiquitin-Gen die Polyubiquitylierung der dislozierten plastidären Proteine (und damit ihre Degradation) verhindert haben. Mit diesem prototypischen Importmechanismus wäre der initiale Mechanismus zum Import nucleuscodierter Präproteine ins heutige PPC der sekundären Plastiden geschaffen. Die weiteren Prozesse, wie u.a. der Verlust der symbiotischen *npl4*, *ufd2* und *rad23* Gene wird wahrscheinlich der Optimierung und Abgrenzung dieses Systems von der ERAD-Maschinerie des Wirtes gedient haben. Durch die Ausbildung spezifischer Faktoren wie einem TPM-Rezeptor zur Erkennung der Transitpeptide, könnte die zu fordernde Effizienz und Spezifität des TPM erreicht worden sein. Trotzdem wäre es, wenn auch diese initiale

Versorgung des Symbionten vielleicht eher "mager" war, bereits in diesem frühen Stadium möglich, die Versorgung des Symbionten allmählig auf den Wirt zu "übertragen". Im Rahmen dessen werden dann auch bereits erste Komponenten des TPM selber in das Genom des Wirtes transferiert worden sein, von wo sie nach Aquisition der zweiteiligen PPC-Zielsteuerungssequenz ihre symbiontcodierten Pendants verdrängt haben.

Aquisition PPC-relevanter topogener Signale

Die Entwicklung geeigneter Rückführungsmechanismen für nucleuscodierte (peri-)plastidäre Präproteine in die Plastide bzw. den Symbiont beinhaltet nicht nur das Relokalisieren und Adaptieren bestehender Proteintransportsysteme für den TPM, sondern auch die Evolution geeigneter topogener Signale. Die Analyse sogenannter "indikativer Introns" hat zu der Annahme geführt, dass Zielsteuerungssequenzen unter anderem über den Prozess des *Exon Shuffling* entstanden sind Kilian and Kroth, 2004. Dieser Begriff beschreibt die These, dass neue Proteine durch die modulare Kombination von Exons bestehender Gene entstehen und verdankt seinen Ursprung dem Umstand, dass Proteindomänen in eucaryotischen Genomen häufig mit Exons korrelieren Liu and Grigoriev, 2004. Ein ähnliches Phänomen konnte bei Zielsteuerungssequenzen nucleuscodierter (peri-)plastidärer Gene von Cryptophyten und Heterokontophyten beobachtet werden Kilian and Kroth, 2004; Gould, 2006, bei denen Introns häufig in den Grenzregionen von SP- und TP bzw. TP und maturem Protein vorkommen.

Ein alternativer Mechanismus zur Entstehung topogener Signale ist die gezielte Mutagenese genflankierender 5' Regionen bzw. der Gene selber. Ein Beispiel für diesen Prozess liefert das in *Phaeodactylum tricornutum* identifizierte symbiontspezifische Ubiquitin. Abb. 5-3 zeigt ein Aminosäurealignment von Pt_sUb mit Polyubiquitin aus *Saccharomyces cerevisiae* (consensus). Anhand der markierten Ubiquitineinheiten ist deutlich zu erkennen, dass Pt_sUb auf ein tetrameres Ubiquitin zurückgeht. Während beide Sequenzen im Bereich des zweiten Ubiquitins eine Identität von nahezu 65 % aufweisen, sind Homologien im C-terminalen Bereich nur im direkten Vergleich beider Sequenzen zu erkennen. Die Homologien im Bereich des N-Terminus legen nahe, dass die Zielsteuerungssequenz von Pt_sUb ebenfalls auf Ubiquitin zurückgeht, welches durch Deletionen und Anhäufung relevanter Aminosäurespezies [vgl. 4.2.3] in ein Signal- und ein mit 26 Aminosäuren ungewöhnlich kurzes Transitpeptid [siehe Tab. 8.1] transformiert wurde.

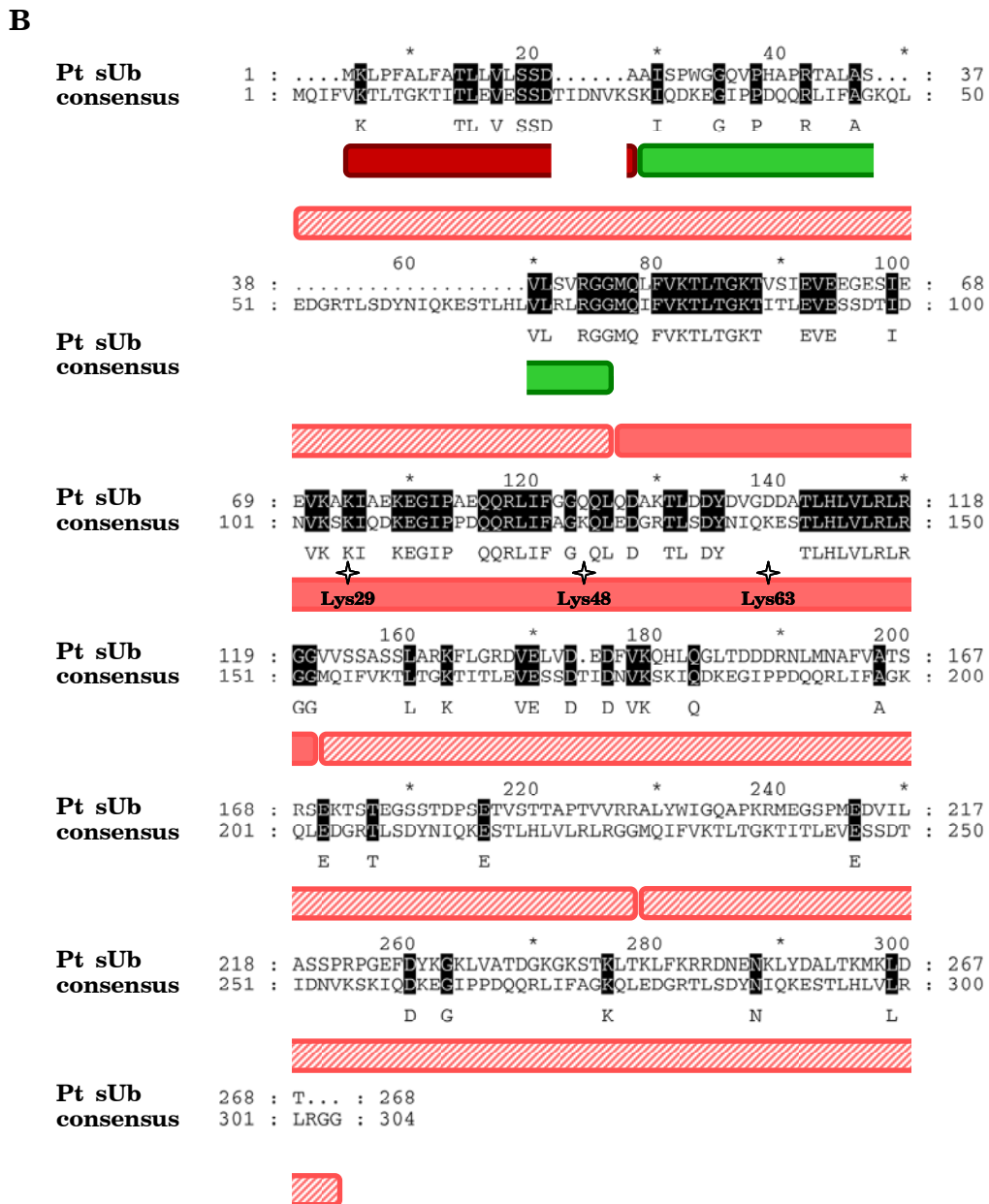
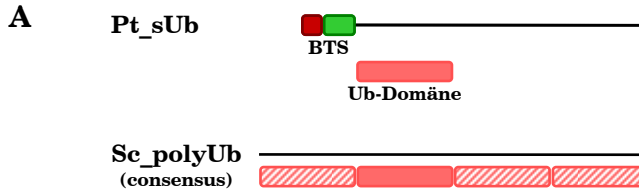


Abb. 5-3: Pt_sUb und *Saccharomyces cerevisiae* Polyubiquitin im Vergleich.

A. Schematische Gegenüberstellung, **B.** Aminosäurealignment von Pt_sUb und Polyubiquitin. Die Ubiquitin-Domäne ist in hell-, Signal- bzw Transitpeptid des Pt_sUb in dunkelrot bzw. grün dargestellt. Konservierte Lysine sind mit Stern markiert. Siehe Text.

5.4 Der "ERAD" TPM - mehr als ein Modell?

In den letzten zweieinhalb Jahrzehnten wurden eine Reihe verschiedener Modelle entwickelt, um den Import nucleuscodierter Präproteine an der PPM der sekundären Plastiden der Chromalveolaten erklären zu können. Mit dem hier vorgestellten Modell eines ERAD-abgeleiteten TPM konnte jedoch zum ersten Mal ein experimentell nachprüfbares Modell erarbeitet werden, das sich im Gegensatz zu den vorangehenden nicht nur auf die Abstraktion und Interpretation bestehenden Wissens stützt, sondern molekulare Daten zur Grundlage hat. Die Attraktivität dieses Modells liegt aber vor allem in der Tatsache, dass die identifizierte symbiontische "ERAD"-Maschinerie die erste bekannte symbiontspezifische Proteinimportmaschinerie darstellt, die eine scheinbare Konservierung in nahezu allen Chromalveolaten aufweist. Eine Adaption von ERAD-Komponenten für neue Aufgaben innerhalb der Zelle wurde zudem bereits bei der peroxisomalen Proteinimportmaschinerie beobachtet.

In wie weit es sich nur um ein weiteres Modell handelt, oder ob der Präproteinimport an der PPM tatsächlich auf dem hier vorgeschlagenen Mechanismus beruhen kann, muss in weiterführenden Arbeiten beantwortet werden. Erste Indizien können die in dieser Arbeit durchgeführten Komplementationsexperimente in *Saccharomyces cerevisiae* liefern, die zeigen, dass Gt_ORF201 in der Lage ist, die Dislokation ungefalteter Proteine aus dem ER in Hefe zu vermitteln. Zudem entspricht die Häufigkeit der in den *Immunogold-Labeling* Experimenten detektieren Gt_ORF201-Spots im elektronenmikroskopischen Schnitt mit 4 - 5 pro Plastide etwa dem, was für Proteine mit gleicher Abundanz (TIC/TOC-Komponenten) bei Plastiden höherer Pflanzen zu beobachten ist (Enriko Schleiff, persönliche Kommunikation).

Ungeachtet seiner tatsächlichen Funktion, ist das in dieser Arbeit identifizierte symbiontische "ERAD"-System evolutiv von hohem Interesse, da seine Konservierung ein weiteres Argument für die Monophylie der Chromalveolaten liefert. Sollte sich dies in phylogenetischen Berechnungen bestätigen lassen, könnten die identifizierten Faktoren möglicherweise auch als molekulare Uhren zur Bestimmung der Verwandtschaftsverhältnisse innerhalb der Gruppe dienen.

6 Zusammenfassung

Die sekundären Plastiden der Chromalveolaten sind von drei oder vier Hüllmembranen umgeben. Sie lassen damit ihren (sekundär) symbiogenetischen Ursprung aus einer ehemals frei lebenden phototrophen Eucyte (einer ancestralen Rhodophyte) erkennen. In Cryptophyten, den Vertretern mit den ursprünglichsten Plastiden dieser Gruppe, zeugt der remanente Nucleus im periplastidären Kompartiment (PPC) des Symbionten, das Nucleomorph, zusätzlich von dieser Herkunft.

Ein wesentlicher Bestandteil in der Etablierung der sekundären Symbiose war der Transfer von genetischem Material von den Genomen des Symbionten in das Genom des Wirtes und dessen subsequente Eliminierung am Ursprungsort. Dies jedoch setzte die Entwicklung geeigneter Mechanismen zum Reimport der nun nucleuscodierten Proteine voraus. Konkrete Hinweise auf die Natur dieser Mechanismen gibt es nur von der äußersten bzw. innersten der vier Hüllmembranen der Plastide. Für die weiteren Transportvorgänge der Proteine, vor allem über die zweite, periplastidäre Membran (PPM), werden bislang nur alternative Modelle kontrovers diskutiert.

Ausgehend von der Analyse des nucleomorphcodierten Proteins Gt_ORF201 der Cryptophyte *Guillardia theta*, wurden eine Reihe von Faktoren identifiziert, die Homologien zu Komponenten des ER-assoziierten Degradations Systems (ERAD) aus *Saccharomyces cerevisiae* aufweisen, deren Kern eine Maschinerie zur Dislokation missgefalteter sekretorischer Proteine aus dem ER bildet. Dies waren u.a. Homologe zu den Membranproteinen Der1p und Hrd1p, zur ATPase Cdc48p und ein Homolog zum Cdc48-Cofaktor Ufd1p. Exemplarisch wurde gezeigt, dass Gt_ORF201 funktionell ortholog zu seinem Homolog Der1p aus Hefe ist und sich in *Guillardia theta* in der periplastidären Membran des Symbionten befindet.

Durch eingehende Datenbank Analysen bereits vollständig sequenzierter Chromalveolatengenome (u.a. von *Phaeodactylum tricornutum*, *Plasmodium falciparum*) wurde eine Konservierung der identifizierten symbiontspezifischen Faktoren (hier im Nucleus als Präprotein mit PPC/PPM-relevanter Zielsteuerungssequenz codiert) innerhalb der Gruppe der Chromalveolaten gezeigt.

Da das symbiontische "ERAD-System" in allen untersuchten Organismen parallel zur ERAD-Maschinerie des Wirtes existiert, und die homologen Faktoren in *Saccharomyces cerevisiae* vornehmlich an den prädegradativen Prozessen der Substratdislokation aus dem ER beteiligt sind, wurde für die symbiontischen Faktoren eine neue, ERAD-unabhängige Funktion beim Transport nucleuscodierter (peri-)plastidärer Präproteine über die PPM postuliert.

Basierend auf den Prinzipien der Substratdislokation in ERAD wurde in dieser Arbeit erstmalig ein experimentell nachprüfbares Modell für den Präproteinimport an der periplastidären Membran erarbeitet.

7 Material und Methoden

7.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien wurden, soweit nicht anders angegeben, von den Firmen Roth und Sigma bezogen; Ihre Verwendung und Lagerung erfolgte nach Herstellerangaben.

7.2 Medien, Puffer und Lösungen

Standardpuffer wurden nach Sambrook et al hergestellt Sambrook et al., 1989, die Zusammensetzung sonstiger Puffer ist im Kapitel des jeweiligen Versuchs beschrieben. Alle verwendeten Puffer und Medien wurden vor Gebrauch autoklaviert bzw. sterilfiltriert.

7.3 Antikörper

Folgende Erst- und Zweitantikörper wurden anwendungsspezifisch in den angegebenen Verdünnungen verwendet: Ziege anti-GST, 1:2500 (GE Healthcare), Maus anti-GFP, 1:2500 (Rockland), Kaninchen anti-PsbB, 1:1000 (Agrisera), Maus anti-CPY, monoclonal (Molecular Probes), Kaninchen anti-Ziege bzw. Ziege anti-Kaninchen IgG, HRP-gekoppelt 1:25.000 (Sigma), Ziege anti-Maus IgG 1:10.000 (GE Healthcare), sowie Ziege anti-Kaninchen IgG, 30 nm goldgekoppelt 1:50 (Plano). Zudem wurde ein anti-Gt_ORF201 Antikörper 1:1000 (Eurogentec) eingesetzt, der als polyconales Serum aus der Immunisierung eines Kaninchens mit rekombinantem ORF201ab-Protein gewonnen wurde.

7.4 Oligonucleotide

Oligonucleotide wurden von der Firma MWG bezogen und in einer Verdünnung von 5 pM eingesetzt. Schnittstellen für Restriktionsendonucleasen wurden unterstrichen. Sequenzierprimer waren mit dem fluoreszierenden Farbstoff Cyr5-IRD700 bzw. Cyr5-IRD800 markiert.

Als Sequenzierprimer für pGemT, pBlueSkript und pGEX wurden verwendet: M13 uni700/800 (5'-tgtaaacgacggccagt-5') und M13 rev700/800 (5'-caggaaacagctatgacc-3'), für pPhat1 pPhat1 fw/700 (5'-cagactggcctagcaagagtgcctcg-3') und pPhat1 rv/800 (5'-gagcaaggatgccatttggccg-3'), für pARL1+ pARL fw/ 700 (5'-cgtaataataatacacgcag-3') und pARL rv/800 (5'-cagttataataacaatcaattgg-3').

Zur Konstruktion des ORF201-Antikörperepitops wurden die Primer 201ab-*Bam*HI fw (5'-ggatcctatttagtagagaagcaacc-3'), 201ab-*Pst*I rv (5'-ctgcagattgatttggtgggagc-3'), 201ab-*Pst*I fw (5'-ctgcagttatttagtagagaagcaacc-3'), 201ab-*Eco*RI rv (5'-attaggattgaattcttggagc-3'), 201ab-*Eco*RI fw (5'-gaattctttagtagagaagcaacc-3') und 201ab-*Xho*I rv (5'-ctcgagattgatttggagc-3') benötigt.

Zur Amplifikation der codierenden Bereiche von Der1p und Gt_ORF201 wurden die Primer der1 fw (5'-gaattcatggatgctgtaatactg-3') der1 rv (5'-ctcgagttt-agggtgttctcagtg-3'), orf201 fw (5'-gaattcatggatgctgtagatg-3') und orf201 rv (5'-ctcgagatataacttaactg-3') verwendet.

Die Primer für die Amplifikation der Zielsteuerungssequenzen aus *Phaeodactylum tricornutum* waren: Pt_sUbi fw (5'-aagaattcatgaagcttccgtttgctctc-3'), Pt_sUbi rv (5'-aacatgggtcaagggttttacgaacagc-3'), Pt_sDer1-1 fw (5'-aagaattcatgagtcgtcaaccttagtg-3'), Pt_sDer1-1 rv (5'-ttccatggtatctgagagagcagacttc-3'), Pt_sDer1-2 fw (5'-aagaattcatgagtacattctatagtttgc-3'), Pt_sDer1-2 rv (5'-aacatgggatcaacggattgtcttcggc-3'), Pt_sUba1 fw (5'-aagaattcatgaattactgctggcgattttg-3'), Pt_sUba1 rv (5'-aacatggatattcttcatcggatacatc-3'), Pt_sUfd1 fw (5'-aagaattcatggctgttcgacgtcatg-3'), Pt_sUfd1 rv (5'-ttccatgggtggatcgaaccatccg-3'), Pt_sCdc48 fw (5'-aagaattcatggtcttttcgagaccatgc-3'), Pt_sCdc48 rv (5'-ttccatgggtggatccgcaaagggtgagg-3'). Zur Amplifikation der *Plasmodium falciparum* sDer1-BTS wurden die Primer Pf_sDer1 fw (5'-ggctcgagatgaatttattctttatagc-3') und Pf_sDer1 rv (5'-ggcctaggcaaaattattaaatattgtgcaagta-3') eingesetzt.

7.5 Vektoren

Die Analyse und Vermehrung von PCR-Produkten erfolgte im Plasmid pGEM-T der Firma Promega, die Konstruktion des Gt_ORF201 Antikörperepitops in pBlueScript II KS +/- von Stratagene.

Zur Expression von rekombinantem Gt_ORF201 Protein (ORF201ab) wurde der Vektor pGEX-5x-3 von GE Healthcare benutzt.

Die episomale Überexpression von Gt_orf201 und Gt_hder1 in *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte mit dem modifizierten pRS-Plasmid Sikorski and Hieter, 1989 pRS424-TDH (amp^r , 2μ , $trp1$, P_{TDH3} T_{CYC1}) Funk et al., 2002.

Zur Expression von GFP-Fusionsproteinen in *Phaeodactylum tricorutum* wurde das Plasmid pPhaT1 ($pSP73$, P_{fcpA} , amp^r , zeo^r), zur Expression in *Plasmodium falciparum* pARL1+ ($pGemT$, P_{cg10} , P_{bDT3} , P_{Pfcam5} , $hDhfr^r$, P_{HSP33}) verwendet Zaslavkaia et al., 2000; Crabb et al., 2004.

7.6 Organismen

Guillardia theta CCMP327 wurde 1957 vor der Küste von Milford, Connecticut (Long Island Sound) aus dem Nordatlantik von Guillard isoliert. Die penate Kieselalge *Phaeodactylum tricorutum* CCAP1055/1 (ein Derivat von *Phaeodactylum tricorutum* CCMP632) wurde 1956 vor der Küste von Blackpool (Nordatlantik) von Coughlan gefunden. *Plasmodium falciparum* 3D7 ist ein Derivat von *Plasmodium falciparum* NF54 und wurde aus einem Niederländischen Malaria Patient isoliert Delemarre and van der Kaay, 1979.

Die beiden *Escherichia coli* Stämme BL21-CodonPlus® (DER)-RIL und XL1-blue MRF' sind Produkte der Firma Stratagene.

Saccharomyces cerevisiae W303-CD (Mata ade2-1 ura3-1 his2-11, 15 leu2-3, 112 trp1-1, [can1-100, prc1-1], der1::URA3) und YRH110 (W303-1C [ire::kan^r]) wurden erstmalig in Knop et al. bzw. Hitt und Wolf beschrieben Knop et al., 1996; Hitt and Wolf, 2004.

7.7 Datenbankanalyse

Basierend auf den Genmodellen von *Saccharomyces cerevisiae* SGDTM [1], Hong et al., 2006 bzw. der Nucleomorphgenom- und EST-Daten von *Guillardia theta* NCBI [2], Douglas et al., 2001; Gould et al., 2006b wurden die Genom- und EST-Datenbanken von *Cyanidioschyzon merolae* 10D CyanidioDB [3], Matsuzaki et al., 2004, *Cryptosporidium parvum* CryptoDB v3.3 [4], Puiu et al., 2004, *Plasmodium falciparum* PlasmoDB v5.1 [5], Bahl et al., 2003, *Toxoplasma gondii* ToxoDB v4.0 [6], Kissinger et al., 2003, *Phaeodactylum tricornutum* (PhatrDB v2.0 [7], Bowler, et al., in Vorb.), *Thalassiosira pseudonana* ThapsDB v3.0 [8], Armbrust et al., 2004 und *Emiliana huxleyi* (NCBI-TraceFileRecords [9]) nach Proteinen mit Homologien zu Komponenten des Hefe ERAD-Systems unter Verwendung des BLAST-Algorithmus NCBI-BLAST [10], Altschul et al., 1997 durchsucht. Sequenzalignments wurden mit den Programmen *ClustalX v1.8* Jeanmougin et al., 1998 und *GeneDoc v2.6.002* [11] Nicholas et al., 1997 erstellt.

Die Vorhersage topogener Signale wurde mit den Algorithmen SignalP v3.0 [12] Bendtsen et al., 2004, bzw. PSort [13], ChloroP v1.1 [14] Emanuelsson et al., 1999, TargetP v1.1 [15] Emanuelsson et al., 2000 und PlasmoAP [16] Foth et al., 2003 vorgenommen. Die Hydrophobizitätsanalyse zur Vorhersage putativer Transmembrandomänen erfolgte mittels TMHMM v2.0 [17] Sonnhammer et al., 1998. Sequenzalignments wurden mit dem Programm WebLogo v2.8.2 [18] Crooks et al., 2004 erstellt.

7.8 Zellkultur und Transformation/-fektion

Die in dieser Arbeit verwendeten Hefen- und Bakterienstämme sind unter 7.6 aufgeführt, ihre Kulturhaltung erfolgte nach Herstellerangaben bzw. Sambrook et al. Sambrook et al., 1989 bei 30 °C, 150 rpm in SD-Medium (5 % (w/v) Glucose, 0.67 % (w/v) Yeast Nitrogen Base w/o AA, 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 6.0, Supplemente nach Bedarf) bzw. 37 °C, 225 rpm in LB-Medium. Zur Anzucht auf Platten wurden die Medien mit 1.5 % Agar versetzt. Die Stammhaltung erfolgt als Glycerinkultur bei -80 °C.

Die Transformation von *Escherichia coli* *XL1-blue MRF'* Zellen mit Plasmid-DNA wurde mit dem *TransformAID*TM Kit der Firma MBI-Fermentas nach Herstellerangaben durchgeführt. Das Einbringen von pGex-5x-3 in *BL21-Codon Plus*[®] Zellen erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers (Stratagene). Die

Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* mittels LiAC wurde nach Gietz et al. durchgeführt Gietz et al., 1992. Die Selektion der Transformanden (nach 3 - 5 Tagen sichtbar) erfolgte entsprechend der Auxotrophiemarker des eingebrachten Vektors bzw. des verwendeten Hefestammes auf SD-Agarplatten.

Guillardia theta und *Phaeodactylum tricornutum* wurden in f/2-Meerwassermedium mit 3 bzw. 1.5 (w/w) „Tropic Marine“ nach Guillard Guillard, 1975 bei 20 °C in einem 12 h/12 h Tag/Nacht-Rhythmus mit Fluoreszenzlicht „warm white“ ruhend bzw. im 24 h Dauerlicht bei ca. 10.000 lx und 150 rpm in einer *Versatile Environmental Test Chamber* (MLR-350 der Firma Sanyo) kultiviert. Zur Kultivierung auf Platten wurde dem Medium 1.5 % (w/v) Agar hinzugesetzt. Die Dilatation des Lumens zwischen RER- und periplastidärer Membran der komplexen Platide von *Guillardia theta* erfolgte durch Zugabe von 10 µg ml⁻¹ BFA in MeOH (MeOH als Kontrolle) 2.5 h vor dem Nacht/Tag-Wechsel.

Die stabile Integration von DNA in *Phaeodactylum tricornutum* erfolgte nach Apt et al. Apt et al., 1996, mit dem *Biolistic PDS - 1000/He Particle Delivery System* der Firma BioRAD unter Verwendung von M10 Wolframpartikel und 1350 psi *Rupture Discs* (BioRAD). Pro Transformationsansatz wurden 1x 10⁸ Zellen mit 5 - 10 µg DNA beschossen. Die Selektion nach Transfektanden begann 24 h post Transfektion mit 75 µg ml⁻¹ Zeozin (Duchefa). Erste Kolonien erschienen nach ca. 14 Tagen Inkubation im Dauerlicht.

Plasmodium falciparum wurde nach Trager und Jensen in Erythrocyten der Blutgruppe 0 Rhesus +ve in RPMI-Medium (Gibco), das mit 5 % (v/v) Humanserum der Blutgruppe A Rhesus +ve, 0.25 % (w/v) Albumax II (Gibco), 200 mM Hypoxanthin und 20 mg ml⁻¹ Gentamycin versetzt wurde, kultiviert Trager and Jensen, 1976. Ihre Synchronisierung erfolgte mittels Sorbitololyse nach Lambros und Vanderberg Lambros and Vanderberg, 1979.

Die Transfektion von *Plasmodium falciparum* 3D7 erfolgte mittels Elektroporation in 2mm-Elektroporationsküvetten nach Crabb et al. unter Verwendung des *Gene Pulser II* der Firma BioRAD bei 0.310 kV 950 µF⁻¹ (*high capacitance*) Crabb et al., 2004. Pro Ansatz wurden 100 µg DNA eingesetzt. Ab Stunde vier post Transfektion wurde mit 5 nM WR99210 selektioniert Voss et al., 2006. Resistente Parasiten konnten nach Tag 20 im Blutaussstrich beobachtet werden.

7.9 Isolation von DNA und RNA

Das Isolieren von DNA aus *Guillardia theta* oder *Phaeodactylum tricoratum* erfolgte nach der CTAB-Methode von Doyle und Doyle [Doyle and Doyle, 1990]. Die Isolation der RNA erfolgte mit dem *Trizol*TM-Reagenz der Firma Invitrogen nach Herstellerangaben [19].

Zur Isolation von DNA aus *Plasmodium falciparum* wurden infizierte Erythrocyten mit 0.15 % (w/w) Saponin versetzt und für 10 min bei 4 °C inkubiert. Nach 5 min Zentrifugation bei 2500 x g, wurde das Zellpellet in 4 Vol. hyperosmotischem Puffer (50 mM NaAc, pH 7.2, 100 mM NaCl, 1 mM Na₂EDTA) resuspendiert und unlösliche Zelldebris durch 5 min Zentrifugation bei 20.000 x g, 4 °C vom wässrigen Überstand getrennt. Anschließend wurde die DNA mit PCI aus dem Überstand extrahiert, ETOH-gefällt, und in ddH₂O aufgenommen.

DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* wurde nach Sambrook et al. isoliert [Sambrook et al., 1989]. Das Reisolieren zuvor eingebrachter Plasmid-DNA aus *Saccharomyces cerevisiae* erfolgte nach einem modifizierten Protokoll des *QIAprep*[®] *Spin Miniprep Kit* [20] (Qiagen).

Plasmid-DNA wurde aus *Escherichia coli* nach dem Prinzip der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly isoliert [Birnboim and Doly, 1979]. Zum Erhalt hochreiner Plasmid-DNA wurde das *QIAGEN*[®] *Plasmid Purification Midi/Maxi Kit* eingesetzt.

Die Konzentrationsbestimmung der DNA bzw. RNA erfolgte photometrisch in wässriger Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm in Ultramikroquarzküvetten im Spektralphotometer *Ultrospec2000* der Firma Pharmacia Biotech.

7.10 Amplifikation von DNA/RNA

Die Amplifikation von definierten DNA-Fragmenten erfolgte in Standard-PCR-Reaktionen nach Mullis bzw. Saiki et al. in einem *MasterCycler Gradient* der Firma Eppendorf und unter Verwendung der Finnzymes *Phusion High Fidelity DNA - Polymerase F-530L* bzw. *Taq-Polymerase* von Eppendorf [Saiki et al., 1985; Mullis, 1990]. Annealingtemperatur, Elongationszeit, Mg²⁺-Konzentration und Zyklenzahl wurden jeweils entsprechend der verwendeten Primer, der eingesetzten DNA bzw. der Größe des erwarteten Amplifikats gewählt. Pro Reaktion wurden ca. 50 - 250 ng DNA eingesetzt. Spezifische Basenaustausche innerhalb einer Gensequenz wurden durch Verwendung mutierter Oligonucleotide

bei der PCR vorgenommen. Kontrollreaktionen auf Zellsuspensionen wurden nach Aufnahme der entsprechenden Bakterien- bzw. Hefekolonie in 100 μ l ddH₂O, 10 min Inkubation bei 95 °C und 10 min Zentrifugation bei 20.000 x g, mit 2.5 μ l des Überstandes angesetzt (Kolonie-PCR).

Die reverse Transkription von RNA erfolgte mit der *RevertAid*TM *M-MuLV* der Firma MBI-Fermentas unter Verwendung eines genspezifischen 3'-Primers. Kontrollreaktionen wurden analog, jedoch ohne Zugabe von Enzym durchgeführt. Pro Reaktion wurden 50 - 250 ng RNA eingesetzt. Die so gewonnene cDNA wurde als *Template* in einer Standard-PCR eingesetzt.

7.11 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese zur Analyse von DNA bzw. RNA wurde nach Sambrook et al. durchgeführt Sambrook et al., 1989. Zur Herstellung der Gelmatrix und als Elektrophoresepuffer wurde standardmäßig 1x TBE-Puffer verwendet. Der Gelmatrix (1- 1.5 % (w/v) Agarose in TBE) wurden 3.75 μ g ml⁻¹ Etbr zugesetzt. Ein DNA-Längenstandard wurde durch die Restriktion von 50 μ g Lambda-Phagen-DNA (MBI-Fermentas) mit den Endonucleasen *EcoRI* und *HindIII* mit einer Endkonzentration von 0.1 μ g μ l⁻¹ hergestellt. Als RNA-Längenstandard wurde die *RNA-HiRange Ladder* der Firma MBI-Fermentas verwendet. Vor dem Auftragen wurde die DNA 1:10 mit Probenpuffer versetzt.

Die Rückgewinnung der DNA aus Agarosegelen erfolgte mit dem *JETsorb DNA-Extraction Kit* der Firma Genomed nach Vorgabe des Herstellers.

7.12 Restriktion und Ligation

Die gezielte Restriktion von DNA-Fragmenten bzw. Vektoren erfolgte mittels Endonucleasen des Typs II der Firma MBI-Fermentas bei 37 °C für 1 h. Pro 1 μ g zu restringierender DNA wurde 1 u Enzym eingesetzt.

Die Ligation von PCR-Produkten bzw. von zuvor restringierten DNA-Fragmenten in geeignete Klonierungs- bzw. Expressionsvektoren entsprechend ihrem A-/T-Überhang bzw. ihrer zueinander komplementären Restriktionsschnittstellen erfolgte mittels DNA-T4-Ligase von MBI-Fermentas. Die Reaktion erfolgte für 1 h bei RT mit 2.5 u Enzym; 50 - 250 ng Plasmid-DNA und DNA-Fragment wurden im Verhältnis 1:5 - 1:10 eingesetzt.

7.13 Sequenzierung

Das Sequenzieren von Nucleinsäuren mittels Kettenabbruchmethode erfolgte nach Sanger et al. unter Verwendung des *Thermo Sequenase™ Cy5 Dye Terminator Sequencing Kit* der Firma GE Healthcare Sanger et al., 1977. Pro Reaktion (Endvolumen 12 μl in ddH₂O) wurden ca. 250 μg DNA pro zu sequenzierende 1 kbp und je 2 μM der entsprechenden Sequenzierprimer eingesetzt. Zu je 1 μl ddNTP-Terminator-Mix wurde anschließend 3 μl dieses Ansatzes gegeben und mit Mineralöl überschichtet. Die Sequenzierreaktion erfolgte im *Master Cycler Gradient* der Firma Eppendorf, in 30 Zyklen mit je 20 s Denaturierung, Annealing und Elongation. Die Annealingtemperatur wurde entsprechend der verwendeten Sequenzierprimer gewählt. Im Anschluss wurden die Reaktionen mit je 2 μl *Formamide Loading Dye* (GE Healthcare) versehen und für 10 min auf 70 °C erhitzt.

Die elektrophoretische Auftrennung der Reaktionen erfolgte mit dem *LICOR 4200* - Sequenzierautomat der Firma MWG auf einem 0.2 mm Polyacrylamidgel bei 3000 V, 30 mA und 45 °C in 1x *TBE Long Run*. Die Auswertung der Sequenzdaten erfolgte mit dem Programm *Sequencher v4.6* (Genecodes).

7.14 Expression rekombinater Proteine

Die Expression von rekombinantem GST-Fusionsprotein, erfolgte mit dem Expressionsvektor pGex-5x-3 in *Escherichia coli* BL21-CodonPlus® (DER)-RIL. Dazu wurde eine das entsprechende Konstrukt tragende Kultur bei Erreichen einer optischen Dichte (OD_{600}) von 0.6 - 0.8 durch Zugabe von 1 mM IPTG für 2.5 h bei RT induziert. Ernte und Aufschluss der Zellen, sowie die affinitätschromatographische Aufreinigung des nativen Fusionsproteins erfolgte mit dem *Bulk and ReadyPack GST-Purification Kit* der Firma GE Healthcare nach Herstellerangaben. Zum Entfernen von Degradationsprodukten und unspezifisch aufgereinigten Proteinen wurde das Eluat anschließend auf einem präparativen SDS-Gel aufgetrennt und das Fusionsprotein unter Verwendung des *Elutrap® Electroelution System* der Firma Schleicher & Schuell in 1x SDS-Elektrophoresepufer bei 100 V und 25 mA über Nacht bei 4 °C reisoliert.

Nach Aufkonzentrieren des Eluats mittels eines *Amicon® Ultracel 10K Microconcentrator* (Millipore) wurde das Protein bei der Firma Eurogentec, Belgien für ein dreimonatiges Standardimmunisierungsprogramm zur Gewinnung eines

Antiköpers eingeschickt. Das erhaltene Serum wurde mittels SDS-Page und Westernblotanalyse auf seine Reinheit bzw. Spezifität geprüft.

Die spezifische Aufreinigung des Antiköpers erfolgte mittels Bindung an Nitrocellulose immobilisiertem ORF201ab-Protein nach Sambrook et al. Sambrook et al., 1989.

7.15 Subfraktionierung von *Guillardia theta*

Das Isolieren intakter Plastiden aus *Guillardia theta* erfolgte nach dem Protokoll von Wastl and Maier, 2000 mit folgenden kleinen Änderungen: Die Lyse des Periplast wurde durch 30 min Inkubation der Zellen mit $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ Trypsin in KP-Puffer erreicht. Der mechanische Aufschluss der Zellen erfolgte unter Zugabe von $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ Proteinase-Inhibitor-Mix. Die weitere Aufreinigung der Plastiden über 30:50 % (v/v) Percoll® erfolgte nach Protokoll.

Zur Anreicherung des Symbionten (mit RER) aus *Guillardia theta* wurden Zellen einer 500 ml Algenkultur durch Zentrifugation für 10 min bei 1500 x g, RT pelletiert, in 500 μl Lysepuffer (50 mM Hepes/ NaOH pH 7.5, 250 mM Sorbitol, 5 mM Na_2EDTA , 10 mM DTT, $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ Proteinase-Inhibitor-Mix) aufgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die aufgetaute Suspension wurde im Anschluss mit weiteren 10 Vol. Lysepuffer versetzt und 5 min bei 1500 x g, 4 °C zentrifugiert. Die pelletierte Rohfraktion wurde in 500 μl Gradientenmedium (5 mM Hepes/NaOH pH 6.8, 330 mM Sorbitol, 15 mM NaCl) resuspendiert und auf 10:30 % (v/v) Percoll® nach Wastl and Maier, 2000 bei 10.000 x g, 4 °C aufgetrennt. Die an der Interphase resultierende grüne Fraktion wurde abgenommen, gewaschen und in geeignetem Puffer aufgenommen.

7.16 Herstellung von Proteinrohextrakten

Zur Herstellung von Proteinrohextrakten aus intakten Zellen von *Phaeodactylum tricornutum* oder *Guillardia theta* wurden diese durch Zentrifugation für 10 min bei 1500 bzw. 5000 x g, RT pelletiert und in 500 μl Extraktionspuffer (125 mM Tris/HCl pH 8.0, 3 % (w/v) SDS, 0.2 % (v/v) Triton X-100) resuspendiert. Nach Inkubation im Wasserbad für 10 min bei 96 °C wurde der unlösliche Zelldebris durch Zentrifugation für 5 min bei 20.000 x g (4 °C) vom löslichen Überstand getrennt und für die SDS-Page prozessiert.

Für die Herstellung von *Plasmodium falciparum* Proteinrohextrakt, wurden infizierte Erythrozyten mittels Gelafundinfloation gereinigt. Ihre Lyse erfolgte durch eine Behandlung mit 0.1% (w/v) Saponin in PBS. Nach mehrmaligem Waschen mit PBS wurde das Zellhomogenisat wiederholten *Freeze & Thaw* - Zyklen unterzogen und für die SDS-Page prozessiert.

Die quantitative Proteinbestimmung mit Amidoschwarz 10D erfolgte nach Popov et al. Popov et al., 1975.

7.17 SDS-PAGE

Die Auftrennung von denaturierten Proteinlösungen erfolgte nach der Methode von Laemmli Laemmli, 1970. Standard-Gele mit einer Größe von 8 x 10 cm und einer Dicke von 1 mm wurden mit dem *Mighty Small Dual Gel Caster* der Firma GE Healthcare angefertigt. Zur Herstellung der Gelmatrix wurde eine vorgefertigte Mischung aus Acrylamid und N,N'-Methylenbisacrylamid im Verhältnis 30:0.8 (*Rothiphorese Gel 30*) der Firma Roth verwendet. Je nach aufzutrennendem Größenbereich wurden Gele mit einer Acrylamidkonzentration von 8.5 bis 15 % (v/v) angefertigt. Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer Stromstärke von 15 - 35 mA und einer Spannung von 125 V unter Verwendung einer *SE250 Midget Electrophoresis Unit* von GE Healthcare. Als Proteinmolekulargewichtsstandard diente die *Page Ruler™ Prestained Protein Ladder* von MBI-Fermentas. Alle Proben wurden vor dem Auftragen 1:5 mit 5x SDS-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C denaturiert; Zelldebris wurde durch Zentrifugation für 10 min bei 20.000 x g, 4 °C vom Überstand getrennt.

Die Färbung der SDS-Gele mit Coomassie R-250 erfolgte nach der Methode von Neuhoff et al. Neuhoff et al., 1985. Zu präparativen Zwecken wurden SDS-Gele alternativ mit 0.1 M KCl nach Prussak et al. gefärbt Prussak et al., 1989.

7.18 Immundetektion von Proteinen

Der Transfer von Proteinen auf MeOH-aktivierte PVDF-Membran (GE Healthcare) und die anschließende Immundetektion von Proteinen erfolgte im Halbtrockenverfahren nach der Methode von Towbin et al. unter Verwendung einer *TE77 Semi-Dry Transfer Unit* von GE Healthcare Towbin et al., 1979. Der Transfer wurde in 1 h bei einer Stromstärke von 0,8 mA cm²⁻¹ Gelfläche und

einer Spannung von 50 V durchgeführt. Nach Ende des Transfers wurde die PVDF-Membran für 1 h in Blocking-Reagenz (5 % (w/v) Magermilchpulver in TBS-T) zur Absättigung freier Proteinbindungsstellen inkubiert. Es erfolgte eine 1 h Inkubation mit einem ersten, gegen das gesuchte Protein gerichteten Antikörper (in Blocking-Reagenz) bei RT. Folgend wurde die Membran jeweils dreimal für 10 min mit TBS-T gewaschen, um unspezifisch gebundene Antikörper zu entfernen. Die Inkubation mit dem, den jeweiligen Erstantikörper bindenden Zweitantikörper erfolgte ebenfalls für 1 h bei RT. Unspezifisch gebundene Antikörper wurden wie beschrieben entfernt. Zusätzlich wurde die Membran jeweils 5 min mit TBS bzw. ddH₂O gewaschen. Die Detektion der HRP-gekoppelten Zweitantikörper erfolgte mittels Chemolumineszenz. Dazu wurde die Membran vor dem Auflegen eines Röntgenfilms (*X-Ray Film RX Medical*, Fuji) für 1 min mit *SuperSignal® West Pico Luminol Enhancer Solution* der Firma Perbio benetzt. Die Entwicklung des Röntgenfilms erfolgte unter Rotlicht in Verwendung der *XGB Developer/Fixer Replenisher Solutions* der Firma Kodak.

7.19 Pulse-Chase Analyse

Zur Analyse der Der1p/ORF201 abhängigen Degradation des ERAD-Modellsubstrates Carboxy-Peptidase Y* (CPY*) in einem *Pulse-Chase*-Experiment wurde der Stamm W303-CD verwendet.

Zellkultur und Markierung erfolgte basierend auf Finger et al. Finger et al., 1993. Dazu wurden die Hefezellen in SD/-Trp-Ura bis zu ihrer frühlogarithmischen Phase kultiviert. 1.1×10^8 bzw. $3.3 \text{ OD}_{600} \text{ u ml}^{-1}$ Zellen pro zu messendem Zeitpunkt wurden durch 5 min Zentrifugation bei $2500 \times g$, RT geerntet und 3x mit *Pulse Medium*, PM (0.1 % (w/v) Glucose, 0.1 % (w/v) *Yeast Nitrogen Base* w/o AA, 10 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH 6.0, 0.1 % (w/v) (NH₄)₂SO₄), gewaschen. Anschließend wurden die Zellen in einer Dichte von $10 \text{ OD}_{600} \text{ u ml}^{-1}$ Zellen in PM bei 30 °C und 150 rpm inkubiert. Der *Pulse* erfolgte durch Zugabe von $165 \mu\text{Ci ml}^{-1}$ [³⁵S] Methionin/Cystein (*Redivue Promix 70:30*, GE Healthcare). Nach Inkubation der Zellen für 15 min bei 30 °C, 150 rpm wurde durch Zugabe von 1 Vol. *Chase Medium*, CM (75 μM Methionin/Cystein in PM) der *Chase* ausgelöst (Nullpunkt der Messung). Pro Messintervall wurden $3,3 \text{ OD}_{600} \text{ u ml}^{-1}$ Zellen entnommen und mit 10 mM NaN₃ (Endkonzentration) versetzt. Nach 5 min Zentrifugation bei $2500 \times g$, RT wurden die Zellen pelletiert und in 75 μl

Resuspension Buffer, RB (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 10 mM Na₂EDTA, 1 mM, 50 µg ml⁻¹ Proteinase Inhibitor), aufgenommen. Die mechanische Lyse der Zellen erfolgte nach Zugabe von 50 µl Glasperlen (0.5 mm Ø) durch 1 min Vortexen. Das Lysat wurde mit 925 µl 1.1x *Solubilizing Buffer*, SB (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 165 mM NaCl, 0.11 % (w/v) SDS, 1.1 % Titon-X100), versetzt. Nach 30 min Inkubation bei 4 ° C wurden die Glasperlen und der Zelldebris durch Zentrifugation für 10 min bei 10.000 x g, 4 ° C von Überstand getrennt. Die Präzipitation von CPY* erfolgte durch Inkubation der Proben mit 0.5 µg monoklonalem CPY-Antikörper (Molecular Probes) und 50 µl 3.5 % (w/v) *Protein A-Sepharose CL-4B* in *Immunoprecipitation Buffer*, IB¹⁰⁰ (GE Healthcare) auf einem Rollentaumelschüttler bei 4 ° C über Nacht. Im Anschluss wurde die Protein A Sepharose mehrmals mit IB¹⁰⁰ (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.1 % (w/v) SDS, 1 % Titon-X100) bzw. IB²⁰ (50 mM Tris/HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 0.02 % (w/v) SDS, 1 % Titon-X100) gewaschen und zur Entfernung von N-Glycanen in 10 µl *Deglycosylation Buffer*, DB (IP20 mit 50 mM 2-ME) mit 50 u ml⁻¹ N-Glycosidase F (Roche) resuspendiert. Nach einstündiger Inkubation bei 37 ° C, wurden die Proben mit 5µl 5x SDS-Probenpuffer versetzt, für 10 min bei 50 ° C inkubiert und auf einem 9 % (v/v) SDS-Gel aufgetrennt.

Im Anschluss wurden die SDS-Gele für 10 min mit 1 % (v/v) Essigsäure, inkubiert und unter Verwendung eines Geldryer 543 von BioRAD für 1 h bei 70 ° C unter Luftabschluss getrocknet. Die Exposition des Gels auf einem Röntgenfilm betrug 4 - 6 Wochen. Die Quantifizierung der digitalisierten Daten erfolgte mit dem Programm *ImageJ v1.34s* [21] Abramoff et al., 2004.

7.20 Elektronen- und Fluoreszenzmikroskopie

Für die morphologische Analyse von *Guillardia theta*, wurden intakte *Brefeldin A* behandelte und unbehandelte Zellen, Plastiden bzw. Symbioten durch Zugabe von 1 % (v/v) Glutaraldehyd fixiert und in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert. Die Einbettung in *Lowicryl K4M* Harz bzw. *Epon 812* (Plano) erfolgte nach Protokoll des Herstellers. Mittels eines Mikrotoms (Ultra-cut, Reichert-Jung) wurden Ultradünnschnitte angefertigt. Für die *in situ* Lokalisation von ORF201 wurden die Ultradünnschnitte zuvor 1 h mit anti-ORF201 Antikörper 1:500 in TBS mit 1 % (w/v) BSA inkubiert. Spezifisch gebundener Antikörper wurde anschließend durch 1 h Inkubation mit goldgekoppeltem anti-Kaninchen IgG 1:150 in TBS mit 1 % BSA nachgewiesen. Unspezifisch gebun-

dener Antikörper wurde jeweils durch mehrmaliges Waschen mit PBS entfernt. Im Anschluss wurden die Ultradünnschnitte mit Uranylacetat und Bleicitrat (bei Lowicryl) bzw Osmium (bei Epon) nachkontrastiert. Die Visualisierung der Goldpartikel erfolgte mit dem Transmissionselektronenmikroskop *EM301* der Firma Philips (Hamburg).

Die Lokalisation der in *Pheodactylum tricornutum* exprimierten BTS-GFP-Fusionskonstrukte erfolgte mit dem konfokalen *Laser-Scanning* Mikroskop *TCS SP2* (KLSM) der Firma Leica unter Verwendung eines APO 63x/1.32-0.6 oil Ph3 CS Objektivs. Die Fluoreszenz wurde mittels eines Argonlasers bei einer Wellenlänge von 488 nm angeregt. Mit Hilfe eines TD488/543/633 Teilerspiegels konnten die GFP- bzw. Autofluoreszenz der Plastide bei einem Wellenlängenbereich von 510 - 535 bzw. 625 - 700 nm mittels zweier Photomultiplier getrennt voneinander detektiert werden. Die Auswertung bzw. Nachbearbeitung der am KLSM aufgenommenen Bilder erfolgte mit dem Programm *LC Lite v2.00* von Leica.

Zur Analyse des BTS-GFP Fusionskonstruktes in *Plasmodium falciparum*, wurden infizierte Erythrocyten zuvor via Gelafundinfloatation gereinigt, mehrmals mit serumfreiem RPMI-Medium gewaschen und mit *MitoTracker Orange CMTMRos* und *Hoechst33342* (Molecular Probes) nach Herstellerangaben behandelt. Die Analyse erfolgte mit dem inversen Fluoreszenzmikroskop *Axioplan II Imaging* der Firma Carl Zeiss unter Verwendung folgender Filtereinheiten Rhodamin (546, 590LP; 580), GFP (470/20, 505-530; FT493), DAPI (365, 397LP; 395). Die Fluoreszenzbilder wurden mit einer *CoolSNAP-HQ CCD* Kamera der Firma Photometrics digitalisiert und mit dem Programm *ImageJ v1.34s* ausgewertet.

8 Anhang

8.1 *Guillardia theta* Subfraktionierung

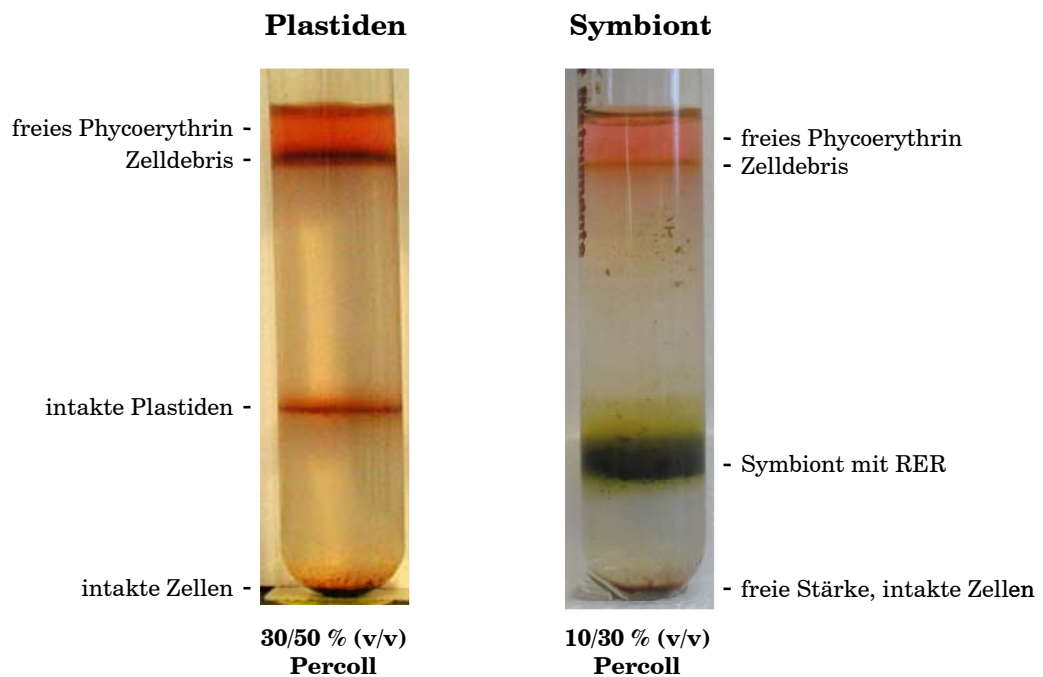
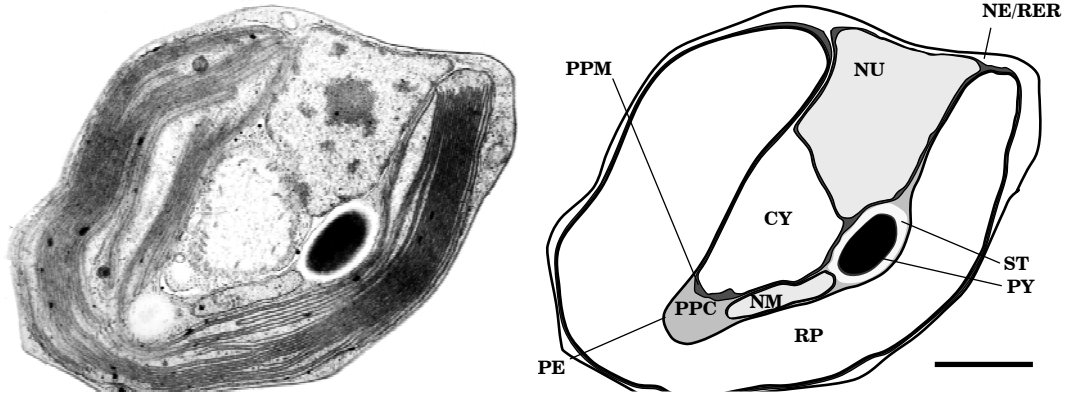


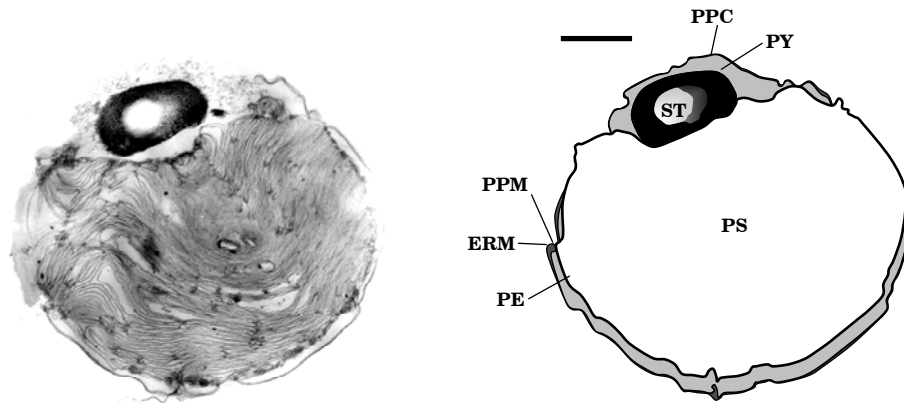
Abb. 8-1: Gradienten der Plastidenisolation bzw. "Symbiont"-Rohfraktion im Vergleich.

Die unterschiedliche Dichte von *Guillardia theta* Plastiden mit nur zwei Hüllmembranen im Vergleich zum isolierten Symbiont, der zusätzlich von PPM und RER umgeben ist, kann zu ihrer Anreicherung im Percollgradient benutzt werden.

A



B



C

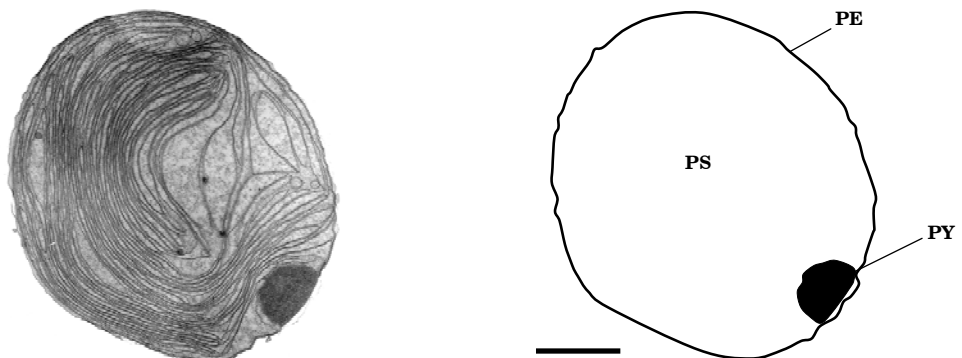


Abb. 8-2: Elektronenmikroskopische Aufnahmen einer intakten *Guillardia theta* Zelle im Vergleich zu einer isolierten Plastide bzw. dem Symbiont mit RER. Elektronenmikroskopische Aufnahme links, schematisches Modell (stark vereinfacht) rechts. Maßstab 1 μm . **A.** intakte Zelle nach Brefeldin A Behandlung **B.** isolierter Symbiont mit RER **C.** Plastide. **A.** Deutlich erkennbar, der becherförmige, primäre Rhodoplast (RP), eng umflossen vom periplastidären Kompartiment (PPC). In ihm befindet sich das Nucleomorph (NM) und typisch für Cryptophyten Speicherstärke (ST), die haubenförmig dem sich innerhalb der Plastide befindlichen Pyrenoid (PY) angelagert ist. **B.** Diskoidale Anordnung des periplastidären Kompartimentes im isolierten *Guillardia theta* Symbiont. ERM, PPM und Plastidenhülle können voneinander unterschieden werden. Präparationsbedingt, gehen das Nucleomorph und der Großteil des PPC-Plasmas sowie das Phycoerythrin des Thylakoidlumens "verloren". **C.** Plastide, mit den sie umgebenden äußeren und inneren Membran der Plastidenhülle (PE). CY, Cytosol; NE, Kernhülle; NU, Nucleus; PE, Plastidenhülle; PS, Plastidenstroma; RER, raues ER.

8.2 Protein-Identifikationsnummern

Die in dieser Arbeit beschriebenen Genmodelle sind unter den nachstehend aufgelisteten Protein-Identifikationsnummern in den unter 7.7 aufgeführten Datenbanken hinterlegt. Modifizierte Genmodelle (#) finden sich basierend auf dem hier angegebenen (annotierten) Modell unter 8.4. bzw. als "User Comment" (*) zu dem entsprechenden Datenbankeintrag.

Cyanidioschyzon merolae (CyanidoDB):

Sec61, CMK192C; **BiP-1**, CMT579C; **Hrd3**, CMG180C; **Hrd1**, CMG190C; **Uba1**, CMI034C; **Ubc4**, CMD152C; **Ubc6**, CMS321C; **Ubc7**, CMS503C; **Ub**, CMK296C; **Der1-1**, CMK163C; **Der1-2**, CMI159C; **Ufd1**, CMK008C; **Npl4**, CMH273C; **Cdc48**, CML023C; **Ufd2**, CMS041C; **Png1**, CMT048C; **Rad23**, CMK054C; **Hsp70**, CMP145C.

Guillardia theta (NCBI):

hSec61, AM183806; **sUbc1 (sUbc-21kDa)**, CAC27017; **sUbc4**, CAC27113; **sHrd1 (ORF477)**, CAC27064; **sDer1-1 (ORF201)**, AAK39810; **hDer1-2**, CAK12751; **Ufd1**, AAF24006; **sCdc48**, AAK39773; **sCdc48-like**, AAK29859; **hHsp70**, CAA62478, **sHsp70**, AAK39876.

Phaeodactylum tricornutum (PhatrDB v2.0):

hSec61, 56443; **hBiP**, 54246; **hHrd3**, 39181; **hHrd1**, 49801; **hUba1**, 54754; **sUba1**, 54460; **hUbc1**, 15966; **hUbc4**, 22525; **sUbc4**, 34112; **hUbc6**, 23065; **sUbc6**, 56431; **hUbc7**, 21310; **hUb**, 56440; **sUb**, 54323; **hDer1-1**, 46966; **sDer1-1**, 31697;

hDer1-2, 37614; **sDer1-2**, 35965; **hUfd1**, 44372; **sUfd1**, 49319; **hNpl4**, 56433; **hCdc48**, 21083; **sCdc48**, 50978; **hUfd2**, 35755; **hPng1**, 50113; **hRad23**, 43564; **hHsp70**, 54019; **sHsp70**, 55890.

Thalassiosira pseudonana (ThapsDB v3.0):

hSec61-1, 25355; **hSec61-2**, 28769; **hBiP-1**, 27656; **hHrd3**, 23332; **hHrd1**, 24902; **hUba1**, 268541; **sUba1**, 262047#; **hUbc1**, 10985; **hUbc4**, 22432#; **sUbc4**, 36045; **hUbc6**, 35107; **sUba6**, 36501#; **hUbc7**, 3013; **hUb**, 267126; **sUb**, 40669#; **hDer1-1**, 6534; **sDer1-1**, 9466#; **hDer1-2**, 10091; **sDer1-2**, 17859#; **hDer1-3**, 35036; **hUfd1**, 16926; **sUfd1**, 22140; **hNpl4**, 2409; **hCdc48-1**, 267952; **sCdc48**, 40725; **hCdc48-2**, 262568; **hRad23**, 263031; **hHsp70**, 269120; **sHsp70**, 263422#.

Cryptosporidium parvum (CryptoDB v3.3):

hSec61, EAK90569; **hBiP**, EAK90529; **hHrd3**, EAK89946; **hHrd1**, EAK89697; **hUba1**, EAK87936; **hUbc1**, EAK87733#; **hUbc4**, EAK87724.1; **hUbc6**, EAK89740; **hUbc7**, EAK88588#; **hUb**, EAK88214; **hDer1-1**, EAK88030; **hDer1-2**, EAK89974; **hUfd1**, EAK87627; **hNpl4**, EAK90611; **hCdc48**, EAK88590; **hUfd2**, EAK89077; **hRad23**, EAK90648; **hHsp70**, EAK87398.

Plasmodium falciparum (PlasmoDB v5.1):

hSec61, MAL13P1.231; **hBiP**, PFI0875w; **hHrd3**, PF14_0462; **hHrd1**, PF14_0215; **hUba1**, PFL1245w; **sUba1**, PF13_0182; **hUbc1**, PF13_0301; **hUbc4**, PFL0190w; **sUbc4**, MAL13P1.227; **hUbc7**, PFI1030c; **hUb**, PFL0585w; **hDer1-1**, PF14_0653; **sDer1-1**, PF14_0498; **hDer1-2**, PF10_0317; **sDer1-2**, PFC0590c; **hUfd1**, PF14_0178; **sUfd1**, PFI0810c*; **hNpl4**, PFE0380c; **hCdc48**, PFF0940c; **sCdc48**, PF07_0047; **hUfd2**, PF08_0020; **hRad23**, PF10_0114; **hHsp70**, PF08_0054; **sHsp70**, Mal7P1.228.

Toxoplasma gondii (ToxoDB v4.0):

hSec61-1, 59.m00005; **hBiP**, 583.m00009; **hHrd3**, 252.m01658; **hHrd1**, 540.m00334; **hUba1**, 80.m02267; **hUbc1**, 46.m00017; **hUbc4**, 641.m01538; **sUbc4**, 86.m00396; **hUbc6**, 65.m01972; **hUbc7**, 20.m03747; **hUb**, 38.m01076; **hDer1-1**, 35.m00937; **sDer1-1**, 46.m01752; **hDer1-2**, 83.m00015; **sDer1-2**, 74.m00447; **hUfd1**, 59.m00076; **sUfd1**, 76.m03417; **hNpl4**, 59.m00041; **hCdc48**, 59.m03661; **sCdc48**, 645.m00326#; **hUfd2**, 72.m00386; **hRad23**, 86.m00361; **hHsp70**, 59.m00003.

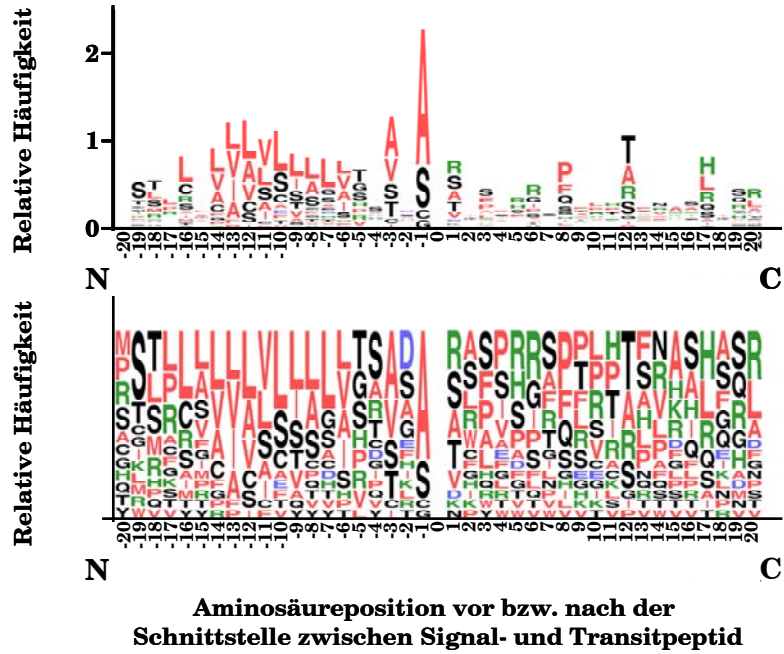
8.3 PPC-Zielsteuerungssequenzen

Tab. 8-1: Auflistung der PPC-Zielsteuerungssequenzen identifizierter symbiontspezifischer ERAD-Komponenten.

Proteine	Sequenz
Pt_sUb	<i>MKLPFALFATLLVLS</i> <u>SDA</u> <u>A</u> ISPWGGQVPHAPRTALASV
Pt_sUba1	MNYCWRFC <u>L</u> GLLLEQALLR <u>D</u> <u>SFG</u> <u>V</u> RFVPIFHPSRRVKVHIRN
Pt_sUbc4	MYRFAVFYALIG <u>V</u> <u>AEA</u> <u>R</u> ARSFIVQSCHTSFATLQGR
Pt_sUbc6	MQSSFLLCSLLLDAS <u>R</u> <u>ISA</u> <u>R</u> CFEDPWGKLHGHLDISKMR
Pt_sDer1-1	MKSSTLVSMLLLVSALSVGY <u>V</u> <u>RS</u> <u>D</u> AWRHVAPTITTHVFOQSGG
Pt_sDer1-2	MSTFYSLPYACVVVLLCLVT <u>C</u> <u>AA</u> <u>T</u> FPGGRALFGCSFPRSRRL
Pt_sCdc48-1	MVFSRPCLLVLAVLSLARS <u>S</u> <u>AGA</u> <u>V</u> WAPRSIPLLTTSWAATAQR
Pt_sHsp70	MVHLPSSSTLLTCVSVLLSGAHP <u>A</u> <u>KA</u> <u>S</u> WLARRTVEKPTLARIHEQR
Tp_sUb	MVSPKSPISLLVASSLLLS <u>Q</u> <u>SLC</u> <u>N</u> GSSHLSIHRVPFVGARRAT
Tp_sUba1	MTCPRQLLLCLGVISICSYVHH <u>G</u> <u>VGA</u> <u>S</u> LYSSFRPSPASLNAHHGSL
Tp_sUbc4	MRTGRILIALLIQSVTS <u>A</u> <u>IA</u> <u>T</u> KFIATSSRVSSVRHHHGND
Tp_sUbc6	MKHAANTFIRCSLLAVIVVSVL <u>G</u> <u>IT</u> <u>ITSA</u> <u>S</u> SSTSSSF ^{TT} TATQSSRQHS
Tp_sDer1-1	MKLPPSSTCVAILVSIYIGAV <u>T</u> <u>S</u> <u>K</u> HHPSPFQPRRTFTKPLNSA
Tp_sDer1-2	MRRYSQLTTVLLSVVAITSTHP <u>P</u> <u>TADA</u> <u>R</u> RPIPRNFFSPIQSLQQPSE
Tp_sCdc48	MKGITATAAACCLVATTT <u>S</u> <u>VSA</u> <u>T</u> LPPTGTFGVIRNNVRSSQA
Tp_sUfd1	MVQFLNRIASPLAVLLISCTPCSS <u>T</u> <u>AS</u> <u>A</u> PSFHQLPTEITANPFHFDP
Tp_sHsp70	MNHKPKPLLHSHRLLAALSLILLSV <u>T</u> <u>TDA</u> <u>S</u> SQWRRPSSLKRPLHSIFHR
Eh_sDer1-1	MRRRVVALLLVLLPR <u>A</u> <u>DS</u> <u>A</u> ALLRRRPRPLAAPALLLRL
Eh_sCdc48	MREERRGTRLLPPLLLLAALV <u>C</u> <u>AHA</u> <u>R</u> SAVVGSPRRASRASA ^{AVL}
Pf_sUba1	MNILCIHIVYCFIACLLLCNIN <u>Q</u> <u>VFT</u> <u>L</u> HVLN ^{NY} NGYLYKNLSFSIP
Pf_sUbc4	MFNIMRPIILFNILIGYYFFIVINN <u>V</u> <u>VG</u> <u>N</u> LPKKNSY ^{YNI} PNYKVK ^{NVS}
Pf_sDer1-1	MNFILYIAV ^{III} YLT <u>N</u> <u>IHC</u> <u>K</u> NVYNIKKLSGKN ^{NY} KY ^{NKI}
Pf_sDer1-2	MLFYKLCFLFSF ^{IIII} <u>I</u> <u>HG</u> <u>K</u> DISSTKLLKSGNL ^{NK} IK
Pf_sCdc48	MKVRKMHYPLFSFTEYL <u>S</u> <u>CY</u> <u>I</u> ILYFFVFLPNYSYAIN ^{INN}
Pf_sUfd1	MFRIVLYILAICLYSIN <u>I</u> <u>NYA</u> <u>K</u> KITGKTYLTNOLAKGILNK
Tg_sDer1-1	MYTFQISLAPLL <u>A</u> <u>AA</u> <u>E</u> LTFDEGGSLPTARCGLALL
Tg_sCdc48	MGTAWCPLEGAGWDSSASSFRRLGLRLRLLSLSVFLLLPFPFIFLSP <u>A</u> <u>HA</u> <u>V</u> RLPPSPAPPVSPSF ^{TSSR}

Signalpeptide sind kursiv, Transitpeptide (Aminosäuren 1 - 20) unterstrichen dargestellt, die mittels SignalP v3.0 (NN) berechnete Schnittstelle zwischen Signal- und Transitpeptid wurde hervorgehoben.

A. Heterokontophyta/Haptophyta



B. Apicomplexa

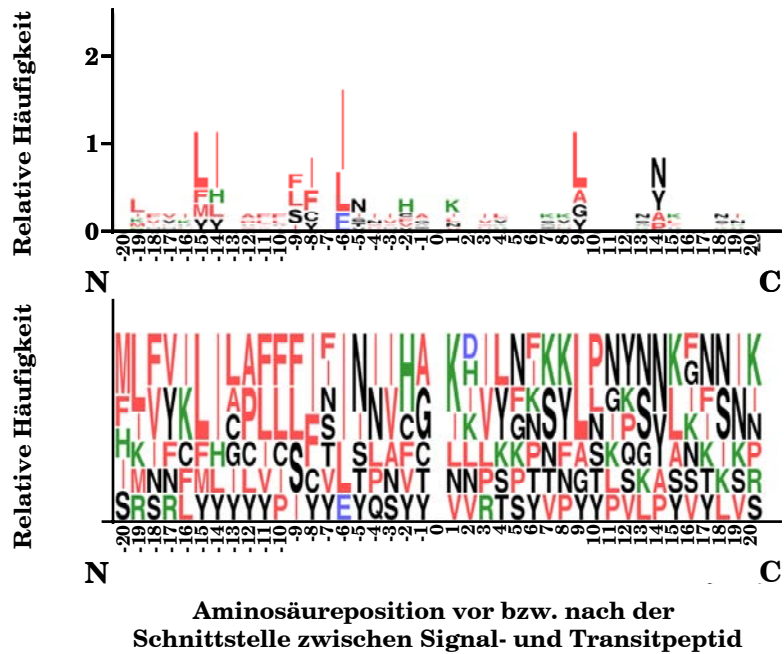


Abb. 9-3: Multiple Sequenzalignments PPC- bzw. Apicoplastzielsteuerungssequenzen in graphischer Darstellung.

A. Zielsteuerungssequenzen von Heterokontophyta und Haptophyta, **B.** von Apicomplexa. Alignments nach WebLogo v2.8.2, Sequenzlogos oben, Frequenzplots unten. Die Gesamthöhe des Stapels gibt die Konservierung der Aminosäure an einer bestimmten Position an, die Höhe der Aminosäure ihre relative Häufigkeit an dieser Position. Die Ausrichtung der Sequenzen [aus Tab A-1] erfolgte nach der mit SignalP (NN) berechneten Schnittstelle zwischen Signal (Positionen -20 - 1) und Transitpeptid (Positionen 1 - 20) Basische Aminosäuren (HKR) in grün, saure (DE) in rot und hydrophobe (AFILMPVW) in blau, hydrophile (GNQSCT) in schwarz.

8.4 Sequenzen

Thalassiosira pseudonana

>Tp_sUba1

mtcprlqllelgvisicsyvhhgvgaslyssfrpspaslnahhgsllqsshddvsrrlqhdedslsnegvlnypslhgwgvskiklnvlasiaaasyrrdlqlrgggggdanedadnevvpfedagdqppsiddntgdncstvdttinnksastskskadhdeerysrqmyalgarahglvrsttaildvpsgllyeiaknlalsgvgriilvrddnntddgyfdglddlggayrraalaeiipgssnqhdksnndvsehvalgsnpvvcvdrsisaqlemndacrntstssvpfvsvetagvysrifcdfgpsfvvvedgetprstlmekveilagddgteqhfthvchlegerhdvsrgnviefqgdysqdgvrvtatfpqcevpssskatldsllegearsfsrikprtiatfslrdilhppfdpsrrkavmssmaaldlfvkkkygrlplqsnasngsgskskrtldverfqslvrkttkveisetwdtmisqfartcrakftpvqafsgalgaqevlkgatklynvvhqfllfydcdevlqnnndgnarfeddafepiargqsyilgne lsrkalsriflvgagaigcellknlaamgagtgsntnqgclitdmtdiersnlrqllfrdhdvgefksaaartavlrlpdc rieahrsrvgeedgpfdddfwssgsvvlnaldnvearlfdvsqcvahglglidagtlgpkgnvqvviphqsesygssad ppepdipvetlknfpyeishtiwardldfyfhrprqandhlgedaalmaeelgedlgvfpfvvgeldsndpeykvel awaikqahrlffvamdvlvqkhpidsvdddgalfwsgtrrapkprfvslnsdadefvkaaarlmesflpvdsaegtsal vsledaltsleghytrlqskdnhrlrnlsggdgsstldmvlekngaktgasfmpslnladfeddddnnghvafvtaasnlr alsygiqpadtmetrrvagrivpamittglvsalsclefvkmlkglplnmhrnafvnmalpfafaplpaeevagvnrshitiwdrvivkgsskspvgamtlrtfldkvrkssgfgddfevanlsygpfiyanflhseddeldaplldt.

>Tp_sUbc4

mrtgrilialliqlsvtsaiatkfiatssrvssvrhhhdndvatseihsssrmlmgssatihrqhhslnnnsllrrkyiaafvhrdekysatsstkakldgndyrltlqptsnhyyntlqpvliirggassssnsqvnalqsiidsslpsikqfivmicqllesltgweilpvkkakssksgkqkkrvrddkqstssdtespkddattelvelkavtsipkaesktqrpdaaskkflsnnikssnpyriqrelkeflkspppglsvkisgknvrlwvtilsmpentvyagetyklrvqfpndyptspssvyflpptprhehvytngdiclslgkdwrpimtaqsvaqaifsilcgaqrkslpmdnsrhagnkpgqkqddwvyhddnc.

>Tp_sUbc6

mkhaantfircsllavivsvlgititsassstssstttatqssrqhsddgtssllhqkrkrkrkhklvgsdlsssrketnlpsdgtavaesiehtstednqssggypsgrrrrrrkvcnmadaldgsqietddtltasdrqeevmstdedvntqrrrkrkrkpvvsdasidckdsntdrillpiveedalyesdhelndelseglmpetllqepndalqsssiqqtpasitfsnnesseslinnemdddspptwvsttshheetiestmrpdtlkdttsatptttstfrsskqyenqviegdtgqaitvkmtrqrkehsqvjtrnranapknkpskpkimakatgkgeclrrikrewkdavktgiaydwtamrtvgssnnesrnydyvrigpfgnllrwhfsvmgpsnsvyeggyhgrvllpkdygpprvqmltspgrficgediclsasnyhpetwtpwrtvislvdalrlhmlttaneigllstdekrrqyalesrswrfpgvanhrmveegiflrvqdtviievedesvdpiavanddsrvelqdt

megngeqqhsmvdsesndstfpdslpinkqsqsakrvkktndsqtkhagghtamtksakadpkyakarkvanmm
agiksqsvdarvigtpanleeqpgmvilklfivevklplralrsillrvlsrvestlrsildsv.

>Tp_sUb

mvspkspisllvassllsqslcngsshlsihrvpvgarratpvpsslttalhirggmqfvtktltgktvsieveegesiedvk
akiaekegippeqqriifggqqlqdgktvddynigddatlhlvlrlvswfgvcccdersctdvlqmfcgnhfrassvtctsl
plasskrhlaresfvsmnpssnqt.

>Tp_sDer1-1

mklppsstcvailvsisyigavtskhhpsfpqrrtftkplnsansnsnihnvifdlrggakkkggrrtaslysnstkkktqkt
atgkkkvqaakeekksaasdtlakykailpltriyitmvgavtllglvlgdelsqglaldpirvmyglelwrpftaacflgpp
sigwlmnayylfeygsslerafgtsqhmlflllqigflsvfsaffgqpfafqsvitsmlhvlrsmpnqqvkwliftvpywtlp
yglmasdvlqagnaanaalphvlgilshlyyfhknvwpkiggedwlvppmflqrkldgleeskakdsistalkmrkkkgk
gkklgss.

>Tp_sDer1-2

mrrysqlttvllsvaitsthpptadarrpiprnfspiqlqqpsflsrrkhspllsritlirggdfdsddehydddddffdfg
ddgmfdfaaeddfgdestlaqiqdaykktppltkayltasfgaallgyvtnkndfpsiqlqdwkptvtrlqlwrpftaflnf
gplglgylmtvhfvwtymstlerlnhntpydfwlmmlfgsvmmvagymslglspflghnlstflvyvwsryheglevn
mfelfntraellpwfflaqtfllegevpildflgivfghiyhhyktnvktprfviqwyngdnkyaqilrkyktissdfem.

>Tp_sHsp70

mnhpkppllhshrrllaalslillsvttdassqwrrpsllkrplhsifhrnhqraptsaavvdasdieasyvknafcvrggg
angpcigidlgttyscvavwrhgrvevcpnelgnritpsyvafqpdnggtrlvgdaaknqaaqntntvfdvkrigrkin
dvtvqadkkmpfqiivgdksskptiqiddvdgkgmkqfspeeisgmilrkmketaeafletvthavvtvpayfndaq
rqatkdagkiagliertvineptaaaiaygldkrkeeniilvfdlgggtdvllsidngvfevatagdthlggqdfdqrlms
yfisqkrqtgvdisdgkravqrlrkqcenakrtlsnqnsatvecdalaegkdfsstisrakfeinvdllfkcltvtqvldk
asmskgqvqqiilvggstripkiqamlseffngkelnksinpeavaygaavqggilsgdaseatkdvllldvaplslieta
ggvmtaligrgttipvksqvfstyadnqpgvniqvfefersmtksnrllgqfelsgippaprgvpqievsvfdvdangilsis
asdkgtrqtslitsekgrlsdaeiermvkeaeefaeqdaaedknvearnqleaylynknsindtlegkidasdeelsk
aiedalvwlednpasakaecdekqkeveglanpilkayesvnagagagasnmdddfmgedlagagehmdepsvee
vd.

Emiliana huxley

>Eh_sDer1-1

mrrrvvallvllpradsaallrrrprlaapallrlrggqepapasqkppgsptttadvhvsadtppspspgllarllnsa
pvahfrsappitrswwtvsvlltvlasqrlvdlrsiafaerevvrgewwrtllnffymgeqplsrfywlqiyhlwecmrilel
vkyawepgqfvrnivsniasllllkqlspslmflgtplvmvmfyvyareyessitnflgffqirtgwlpaqmvqdgvtgd
mmpnllgllaghfyfytnevaprmlpsrpptlaqfvaamdkaappgstpsegeeeleaaaeggeeeveaaaeggetda
ddgddeveed.

>Eh_hDer1-2

matpeewyrslppvtrgymtsavaatlvtqlgldpslmhldfpsiifgslslwrlltnftffgtfsfpvmslflirytkleak
rfegrtadflwamaimgavqavvayvlgglpflsqamlsaiyvvsrefadtvsvfglfnvqaplphrppgtarpap
psaaqcrppapprprsrtrcratpsarppcsptsstaaglrrrrrrsaaiclgtttggeagsgsagewmraravsprav
prp.

>Eh_hCdc48

msadasaetkpvkkknprnlvvdeavnddnsvalnvqtmeeqlfrgdtvlikgkrrkdtvcivladdtcdlgkirmn
kcvrknkvlrgdvisvhqcpdvkygkrvhilpiddtiegitgnlfdvflkpyfleayrprkndlflvrggmravefkvvet
dpveycivapdtvihcegepikrddeeskddvgyddiggvrkqlanirelvelplrhplqfksigvkpprgilmfppgsgk
tliaravanetgafflihgpeimsklagesesnlrkafeaeeknspaiifideidsiapkrektqgeverrivsqtllmldgik

arshvvigatnrnsidaalrrfrfdrevidigvpdengrlevmrihtknmkladdvdleqlakethgyvgadlaalcte
 aamqcirekmdvidlddddeidaevldsmavsqdhylalgtsnpsalretvvevpnvtwddigglegkrelqevvqyp
 vefpekefkgmsskglvfypppgcgktilakaiianecqanfisikgpelltmwfgeseanvrelfdkargaapcvlffdel
 dsiarargssggdaggagdrvinqiltemdgmgakksvfiigatnrpdiidpavlrpgrldqliyiplpdeasrsnilkaalr
 ksplapevdlflaktthgfsgadlteicqraakmairesiekeielekeraaagegametepddpvpeitkthfeeamkf
 arrsvsmdirkyemfsqtlqqsrfgstfkfpegvggsaapragaggfataaeddedlys.

>Eh_sCdc48

mreerrgtrllpplllaalvcaharsavvgssprrasasaavllqrrglhlrggqmagergappedaasgyvmevade
 raeiadverkrmphelevgdvagdsaadseclvhpdkmaalnImagdtvrlkgrrsreticlvrddasvpadavvva
 aqarsnlhvnvgdrvklygcdsvgegavtlqplsdamaglsadelhdqvlaphfapegdeapypvrphgedrivrhg
 aqvvevlvateperrcvvapstelevldepldraeladaeedeggyddiggvdkqltkirelvelpmrhpkvstsvgvmpp
 rgvlihgpppgcgtmiaravaaetgaacylingppvmskqageseqnlrdafeaeaknapaiifideidaiaprrdktqge
 tekrlvsqlltmdslkpsrrvllmaatnrpntidpalrrfrfdleininpvpeqgrldilshqskdlrlspeidlpalsrdtq
 gycgadlsqvffeaammcvrermpeidleadtllpalleqlvvqprhveqalsvtnpstlresaievpnvswkdiggleg
 krelretvqypvqyaskfehfgmdpskgvfypppgcgktilakavaneckanfisvkgpelltmwfgeseanvrelfdk
 arqaspcviffdemdsiakargsgggaseagdrvinqilteidvgvarksvfvgatnrpdildpaimrpgrldqliyipm
 pdyesrlsilratlrkspladdvdleglanstehfgsadlteicqracklairheideqaaeaeaagkplpevrdsdgm
 aksfaeamknarrsvskaelarynkfrkdqatdtkkkdaappaeeapaapeasdeaeaedlyd.

Cryptosporidium parvum

>Cp_hUbc1 (basierend auf EAK87733)

Mgdnrmtlelrglqvftdeleedkqvgiklignrndnflgiirgpiptpyeggifldiivpkepppyepkfvkfitriwhpn
 issqtgaicldilkdawsalpaltlrvmlsiqallsspepndpddalvaslyksdyqeyietakswtqmyakptskeerikrfl
 dmgfnresiitalernnwdenlalnellfen.

>Cp_hUbc7 (basierend auf EAK88588)

Mrnvaqellkkqfmkgddtsgfsvgldddnsflrvrfegppdtyeggifnalltftpedfnpsspkmcfqemwhpn
 vypdgnvcisilhppghdryneqespderwrpifgvesilvsvismgelpndspanidaalefknnineykkkvravrv
 sve.

Toxoplasma gondii

>Tg_sCdc48 (basierend auf 645.m00326)

Mgtawcplegagwdssassfrglgrrllslsvfllpfpiflspahavrlppspappvpsftsrsfgrlrspssemgae
 rptsrvppaaillssfenrereqrakstlkaaaeaassarttgsscptsccsllasslpiftpppltdvrsiaphepstssps
 lssslsspspspsllsspspsllssslsspspspsdaslssslsvllrggrsffsspsptapvagnlfvvkgshardps
 vvflsprdmaalqvqrgdvllsgrrkretvaiampdrslarhvvlahhalkniklhaqdaikvtpqrlpharrvflpf
 sdtlgdvrdggagrsegrdrdasgekpsveavatkfrrhtsrpvkgdqfvlfpvhakgehgatgkvekvmqidtdg
 kddqevalvdatelicegepldraqfdassmityddvggkkelnlirelvelprfpeifkqvqvtpgvrllhgssgcgk
 llakaiianecganfltvngpevmksklageseanlrifeeaaalspellfideidsiaskrektqgevekrivaqlltmdgvss
 dkgivvlaatnrpnqldpalrrfrfdreieipipekgrteilkkaekmnlpgdvdlekiakdahgfvgadmaqlclea
 amqcvrencqvfdfdkdevdpetlakfvrmphfvhalsvvnpsalrerhvevpdvrvwediggltevkeelvetvqypv
 ehgekfhkfglpskglvffgppgcgktilakavaneckanfisvkgpelltmwfgeseanvrdldkaraaapcviffde
 mdsiakargsgtggggaadrvinqilteidgigkrkpifvigatnrpdildpavtrpgrldqliyiplpdksvrnifkaalr
 ksplapdvdiemarrlegfsgaditeicqraaknavresiqaevargrplaegekdpvpfiskkhfdeafkgarrsvped
 mvkvytqfnsmmkrrrvaqettetakettetakettetakettetak.

9 Literatur

- [1] **SGDTM**. <http://www.yeastgenome.org>.
 - [2] **NCBI**. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>
 - [3] **CyanidioDB**. <http://merolae.biol.s.u-tokyo.ac.jp/>
 - [4] **CryptoDB v3.3**. <http://www.cryptodb.org/cryptodb/>
 - [5] **PlasmoDB v5.1**. <http://www.plasmodb.org/plasmo/home.jsp>
 - [6] **ToxoDB v4.0**. <http://www.toxodb.org/toxo/home.jsp>
 - [7] **PhatrDB v2.0**. <http://genome.jgi-psf.org/Phatr2/Phatr2.home.html>
 - [8] **ThapsDB v3.0**. <http://genome.jgi-psf.org/thaps3/thaps3.home.html>
 - [9] **NCBI-TraceFileRecords**. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Info&id=280463&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>
 - [10] **NCBI-BLAST**. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>
 - [11] **GeneDoc v2.6.002**. <http://psc.edu/biomed/genedoc>
 - [12] **SignalP v3.0**. <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>
 - [13] **PSort**. <http://psort.ims.u-tokyo.ac.jp/>
 - [14] **ChloroP v1.1**. <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>
 - [15] **TargetP v1.1**. <http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>
 - [16] **PlasmoAP**. <http://www.plasmodb.org/restricted/PlasmoAPcgi.shtml>
 - [17] **TMHMM v2.0**. <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>
 - [18] **WebLogo v2.8.2**. <http://weblogo.berkeley.edu/>
 - [19] **Invitrogen**. <http://www.invitrogen.com/content/sfs/manuals/15596026.pdf>
 - [20] **Qiagen**. <http://www1.qiagen.com/literature/protocols/pdf/PR04.pdf>
 - [21] **ImageJ v1.34s**. <http://rsb.info.nih.gov/ij/>
- Abramoff MD, Magelhaes PJ, Ram SJ.** 2004. Image Processing with ImageJ. *Biophotonics International* 11:36-42.
- Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA,**
-

- Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MF.** 2005. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol* 52:399-451.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ.** 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25:3389-3402.
- Apt KE, Kroth-Pancic PG, Grossman AR.** 1996. Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *Mol Gen Genet* 252:572-579.
- Aravind L, Koonin EV.** 2000. The U box is a modified RING finger - a common domain in ubiquitination. *Curr Biol* 10:R132-134.
- Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Zhou S, Allen AE, Apt KE, Bechner M, Brzezinski MA, Chaal BK, Chiovitti A, Davis AK, Demarest MS, Detter JC, Glavina T, Goodstein D, Hadi MZ, Hellsten U, Hildebrand M, Jenkins BD, Jurka J, Kapitonov VV, Kroger N, Lau WW, Lane TW, Larimer FW, Lippmeier JC, Lucas S, Medina M, Montsant A, Obornik M, Parker MS, Palenik B, Pazour GJ, Richardson PM, Rynearson TA, Saito MA, Schwartz DC, Thamatrakoln K, Valentin K, Vardi A, Wilkerson FP, Rokhsar DS.** 2004. The genome of the diatom *Thalassiosira pseudonana*: ecology, evolution, and metabolism. *Science* 306:79-86.
- Bahl A, Brunk B, Crabtree J, Fraunholz MJ, Gajria B, Grant GR, Ginsburg H, Gupta D, Kissinger JC, Labo P, Li L, Mailman MD, Milgram AJ, Pearson DS, Roos DS, Schug J, Stoeckert CJ, Jr., Whetzel P.** 2003. PlasmoDB: the Plasmodium genome resource. A database integrating experimental and computational data. *Nucleic Acids Res* 31:212-215.
- Bays NW, Gardner RG, Seelig LP, Joazeiro CA, Hampton RY.** 2001a. Hrd1p/Der3p is a membrane-anchored ubiquitin ligase required for ER-associated degradation. *Nat Cell Biol* 3:24-29.
- Bays NW, Wilhovsky SK, Goradia A, Hodgkiss-Harlow K, Hampton RY.** 2001b. HRD4/NPL4 is required for the proteasomal processing of ubiquitinated ER proteins. *Mol Biol Cell* 12:4114-4128.
- Bebok Z, Mazzochi C, King SA, Hong JS, Sorscher EJ.** 1998. The mechanism underlying cystic fibrosis transmembrane conductance regulator transport from the endoplasmic reticulum to the proteasome includes Sec61beta and a cytosolic, deglycosylated intermediary. *J Biol Chem* 273:29873-29878.
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S.** 2004. Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340:783-795.
- Biederer T, Volkwein C, Sommer T.** 1997. Role of Cue1p in ubiquitination and degradation at the ER surface. *Science* 278:1806-1809.
- Birnboim HC, Doly J.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7:1513-1523.
- Bodyl A.** 2004. Evolutionary origin of a preprotein translocase in the periplastid membrane of complex plastids: a hypothesis. *Plant Biol (Stuttg)* 6:513-518.
-

- Bolter B, Soll J, Schulz A, Hinnah S, Wagner R.** 1998. Origin of a chloroplast protein importer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:15831-15836.
- Bordallo J, Plemper RK, Finger A, Wolf DH.** 1998. Der3p/Hrd1p is required for endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded luminal and integral membrane proteins. *Mol Biol Cell* 9:209-222.
- Bruderer RM, Brasseur C, Meyer HH.** 2004. The AAA ATPase p97/VCP interacts with its alternative co-factors, Ufd1-Npl4 and p47, through a common bipartite binding mechanism. *J Biol Chem* 279:49609-49616.
- Carvalho P, Goder V, Rapoport TA.** 2006. Distinct ubiquitin-ligase complexes define convergent pathways for the degradation of ER proteins. *Cell* 126:361-373.
- Cavalier-Smith T.** 1986. The kingdom Chromista: origin and systematics In: D. J. Chapman, ed. *Progress in phycological research*. Bristol: Biopress Ltd. p. 309-347.
- Cavalier-Smith T.** 1993. Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiol Rev* 57:953-994.
- Cavalier-Smith T.** 1999. Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. *J Euk Microbiol* 46:347-366.
- Cavalier-Smith T.** 2000. Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci* 5:174-182.
- Cavalier-Smith T.** 2003. Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:109-133; discussion 133-104.
- Cavalier-Smith T.** 2006. Cell evolution and Earth history: stasis and revolution. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 361:969-1006.
- Crabb BS, Rug M, Gilberger TW, Thompson JK, Triglia T, Maier AG, Cowman AF.** 2004. Transfection of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Methods Mol Biol* 270:263-276.
- Crooks GE, Hon G, Chandonia JM, Brenner SE.** 2004. WebLogo: a sequence logo generator. *Genome Res* 14:1188-1190.
- Dammai V, Subramani S.** 2001. The human peroxisomal targeting signal receptor, Pex5p, is translocated into the peroxisomal matrix and recycled to the cytosol. *Cell* 105:187-196.
- D'Andrea LD, Regan L.** 2003. TPR proteins: the versatile helix. *Trends Biochem Sci* 28:655-662.
- Deak PM, Wolf DH.** 2001. Membrane topology and function of Der3/Hrd1p as a ubiquitin-protein ligase (E3) involved in endoplasmic reticulum degradation. *J Biol Chem* 276:10663-10669.
- Deane JA, Hill DRA, Brett SJ, McFadden GI.** 1998. *Hanusia phi* gen. et sp. nov. (Cryptophyceae): characterization of "*Cryptomonas* sp. F". *Eur J Phycol* 33:149-154.
- Delemarre BJ, van der Kaay HJ.** 1979. [Tropical malaria contracted the natural way in the Netherlands]. *Ned Tijdschr Geneesk* 123:1981-1982.
-

- Delwiche CF, Palmer J.** 1997. The origin of plastids and their spread via secondary symbiosis. In: D. Bhattacharya, ed. *Origins of the algae and their plastids*. Wien: Springer.
- Denic V, Quan EM, Weissman JS.** 2006. A luminal surveillance complex that selects misfolded glycoproteins for ER-associated degradation. *Cell* 126:349-359.
- DeRocher A, Gilbert B, Feagin JE, Parsons M.** 2005. Dissection of brefeldin A-sensitive and -insensitive steps in apicoplast protein targeting. *J Cell Sci* 118:565-574.
- DeRocher A, Hagen CB, Froehlich JE, Feagin JE, Parsons M.** 2000. Analysis of targeting sequences demonstrates that trafficking to the *Toxoplasma gondii* plastid branches off the secretory system. *J Cell Sci* 113 (Pt 22):3969-3977.
- Douglas S, Zauner S, Fraunholz M, Beaton M, Penny S, Deng LT, Wu X, Reith M, Cavalier-Smith T, Maier UG.** 2001. The highly reduced genome of an enslaved algal nucleus. *Nature* 410:1091-1096.
- Douglas SE, Murphy CA, Spencer DF, Gray MW.** 1991. Cryptomonad algae are evolutionary chimaeras of two phylogenetically distinct unicellular eukaryotes. *Nature* 350:148-151.
- Doyle JJ, Doyle JL.** 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Emanuelsson O, Nielsen H, Brunak S, von Heijne G.** 2000. Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *J Mol Biol* 300:1005-1016.
- Emanuelsson O, Nielsen H, von Heijne G.** 1999. ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites. *Protein Sci* 8:978-984.
- Erdmann R, Schliebs W.** 2005. Peroxisomal matrix protein import: the transient pore model. *Nat Rev Mol Cell Biol* 6:738-742.
- Fan AC, Bhangoo MK, Young JC.** 2006. Hsp90 functions in the targeting and outer membrane translocation steps of Tom70-mediated mitochondrial import. *J Biol Chem* 281:33313-33324.
- Fewell SW, Travers KJ, Weissman JS, Brodsky JL.** 2001. The action of molecular chaperones in the early secretory pathway. *Annu Rev Genet* 35:149-191.
- Finger A, Knop M, Wolf DH.** 1993. Analysis of two mutated vacuolar proteins reveals a degradation pathway in the endoplasmic reticulum or a related compartment of yeast. *Eur J Biochem* 218:565-574.
- Foth BJ, Ralph SA, Tonkin CJ, Struck NS, Fraunholz M, Roos DS, Cowman AF, McFadden GI.** 2003. Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science* 299:705-708.
- Fraunholz MJ, Moerschel E, Maier UG.** 1998. The chloroplast division protein FtsZ is encoded by a nucleomorph gene in cryptomonads. *Mol Gen Genet* 260:207-211.
- Fraunholz MJ, Wastl J, Zauner S, Rensing SA, Scherzinger MM, Maier U-G.** 1997. The evolution of cryptophytes. *Plant Syst. Evol. [Suppl.]*:163-174.
-

- Friedlander R, Jarosch E, Urban J, Volkwein C, Sommer T.** 2000. A regulatory link between ER-associated protein degradation and the unfolded-protein response. *Nat Cell Biol* 2:379-384.
- Funk M, Niedenthal R, Mumberg D, Brinkmann K, Ronicke V, Henkel T.** 2002. Vector systems for heterologous expression of proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Methods Enzymol* 350:248-257.
- Gabalton T, Snel B, van Zimmeren F, Hemrika W, Tabak H, Huynen MA.** 2006. Origin and evolution of the peroxisomal proteome. *Biol Direct* 1:8.
- Gardner RG, Swarbrick GM, Bays NW, Cronin SR, Wilhovsky S, Seelig L, Kim C, Hampton RY.** 2000. Endoplasmic reticulum degradation requires lumen to cytosol signaling. Transmembrane control of Hrd1p by Hrd3p. *J Cell Biol* 151:69-82.
- Gauss R, Jarosch E, Sommer T, Hirsch C.** 2006a. A complex of Yos9p and the HRD ligase integrates endoplasmic reticulum quality control into the degradation machinery. *Nat Cell Biol* 8:849-854.
- Gauss R, Sommer T, Jarosch E.** 2006b. The Hrd1p ligase complex forms a linchpin between ER-luminal substrate selection and Cdc48p recruitment. *Embo J* 25:1827-1835.
- Gibbs SP.** 1979. The route of entry of cytoplasmically synthesized proteins into chloroplasts of algae possessing chloroplast ER. *J Cell Sci* 35:253-266.
- Gibbs SP.** 1981. The chloroplasts of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eukaryotic algae. *Ann N Y Acad Sci* 361:193-208.
- Gietz D, St Jean A, Woods RA, Schiestl RH.** 1992. Improved method for high efficiency transformation of intact yeast cells. *Nucleic Acids Res* 20:1425.
- Gould SB.** 2006. Housing an enslaved alga and how to get there. Dissertation. Zellbiologie. Philipps-Universität, Marburg.
- Gould SB, Sommer MS, Hadfi K, Zauner S, Kroth PG, Maier UG.** 2006a. Protein targeting into the complex plastid of cryptophytes. *J Mol Evol* 62:674-681.
- Gould SB, Sommer MS, Kroth PG, Gile GH, Keeling PJ, Maier UG.** 2006b. Nucleus-to-Nucleus Gene Transfer and Protein Retargeting into a Remnant Cytoplasm of Cryptophytes and Diatoms. *Mol Biol Evol* 23:2413-2422.
- Greenwood AD, Griffiths HB, Santore UJ.** 1977. Chloroplasts and cell compartments in cryptophyceae. *Brit Phycol J* 12:119.
- Guillard RRL.** 1975. Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. *Culture of Marine Invertebrate Animals*. New York: Plenum Press. p. 29-60.
- Guillou L, Chretiennot-Dinet MJ, Boulben S, Moon-van der Staay SY, Vaultot D.** 1999. *Symbiomonas scintillans* gen. et sp. nov. and *Picophagus flagellatus* gen. et sp. nov. (Heterokonta): two new heterotrophic flagellates of picoplanktonic size. *Protist* 150:383-398.
- Hampton RY.** 2000. ER stress response: getting the UPR hand on misfolded proteins. *Curr Biol* 10:R518-521.
-

- Harper JT, Keeling PJ.** 2003. Nucleus-encoded, plastid-targeted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) indicates a single origin for chromalveolate plastids. *Mol Biol Evol* 20:1730-1735.
- Harper JT, Waanders E, Keeling PJ.** 2005. On the monophyly of chromalveolates using a six-protein phylogeny of eukaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:487-496.
- Helenius A, Aebi M.** 2001. Intracellular functions of N-linked glycans. *Science* 291:2364-2369.
- Helenius A, Aebi M.** 2004. Roles of N-linked glycans in the endoplasmic reticulum. *Annu Rev Biochem* 73:1019-1049.
- Hibberd DJ, Norris RE.** 1984. Cytology and ultrastructure of Chlorarachnion reptans (Chlorarachniophyta divisio nova, Chlorarachniophyceae classis nova). *J Phycol* 20:310-330.
- Hiller MM, Finger A, Schweiger M, Wolf DH.** 1996. ER degradation of a misfolded luminal protein by the cytosolic ubiquitin-proteasome pathway. *Science* 273:1725-1728.
- Hitt R, Wolf DH.** 2004. Der1p, a protein required for degradation of malfolded soluble proteins of the endoplasmic reticulum: topology and Der1-like proteins. *FEMS Yeast Res* 4:721-729.
- Hjorth E, Hadfi K, Gould SB, Kawach O, Sommer MS, Zauner S, Maier UG.** 2005. Zero, one, two, three, and perhaps four. Endosymbiosis and the gain and loss of plastids. *Endocytobiosis Cell Res* 15:459-468.
- Hong EL, Balakrishnan R, Christie KR, Costanzo MC, Dwight SS, Engel SR, Fisk DG, Hirschman JE, Livstone MS, Nash R, Oughtred R, Park J, Skrzypek M, Starr B, Theesfeld CL, Andrada R, Binkley G, Dong Q, Lane CD, Hitz BC, Miyasato S, Schroeder M, Weng S, Wong ED, Dolinski K, Botstein D, Cherry JM.** 2006. The *Saccharomyces* Genome Database.
- Huang J, Mullapudi N, Lancto CA, Scott M, Abrahamsen MS, Kissinger JC.** 2004. Phylogenomic evidence supports past endosymbiosis, intracellular and horizontal gene transfer in *Cryptosporidium parvum*. *Genome Biol* 5:R88.
- Huyton T, Pye VE, Briggs LC, Flynn TC, Beuron F, Kondo H, Ma J, Zhang X, Freemont PS.** 2003. The crystal structure of murine p97/VCP at 3.6Å. *J Struct Biol* 144:337-348.
- Ismail N, Ng DT.** 2006. Have you HRD? Understanding ERAD is DOAble! *Cell* 126:237-239.
- Jackson PK, Eldridge AG, Freed E, Furstenthal L, Hsu JY, Kaiser BK, Reimann JD.** 2000. The lore of the RINGs: substrate recognition and catalysis by ubiquitin ligases. *Trends Cell Biol* 10:429-439.
- Jakob CA, Bodmer D, Spirig U, Battig P, Marcil A, Dignard D, Bergeron JJ, Thomas DY, Aebi M.** 2001. Htm1p, a mannosidase-like protein, is involved in glycoprotein degradation in yeast. *EMBO Rep* 2:423-430.
- Jakob CA, Burda P, Roth J, Aebi M.** 1998. Degradation of misfolded endoplasmic reticulum glycoproteins in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by a specific oligosaccharide structure. *J Cell Biol* 142:1223-1233.
-

- Jarosch E, Taxis C, Volkwein C, Bordallo J, Finley D, Wolf DH, Sommer T.** 2002. Protein dislocation from the ER requires polyubiquitination and the AAA-ATPase Cdc48. *Nat Cell Biol* 4:134-139.
- Jarvis P, Robinson C.** 2004. Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. *Curr Biol* 14:R1064-1077.
- Jarvis P, Soll J.** 2002. Toc, tic, and chloroplast protein import. *Biochim Biophys Acta* 1590:177-189.
- Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ.** 1998. Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem Sci* 23:403-405.
- Jentsch S, Seufert W, Sommer T, Reins HA.** 1990. Ubiquitin-conjugating enzymes: novel regulators of eukaryotic cells. *Trends Biochem Sci* 15:195-198.
- Joazeiro CA, Weissman AM.** 2000. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 102:549-552.
- Kabani M, Kelley SS, Morrow MW, Montgomery DL, Sivendran R, Rose MD, Gierasch LM, Brodsky JL.** 2003. Dependence of endoplasmic reticulum-associated degradation on the peptide binding domain and concentration of BiP. *Mol Biol Cell* 14:3437-3448.
- Kilian O, Kroth PG.** 2004. Presequence acquisition during secondary endocytobiosis and the possible role of introns. *J Mol Evol* 58:712-721.
- Kilian O, Kroth PG.** 2005. Identification and characterization of a new conserved motif within the presequence of proteins targeted into complex diatom plastids. *Plant J* 41:175-183.
- Kim I, Mi K, Rao H.** 2004. Multiple interactions of rad23 suggest a mechanism for ubiquitylated substrate delivery important in proteolysis. *Mol Biol Cell* 15:3357-3365.
- Kissinger JC, Gajria B, Li L, Paulsen IT, Roos DS.** 2003. ToxoDB: accessing the *Toxoplasma gondii* genome. *Nucleic Acids Res* 31:234-236.
- Klausner RD, Sitia R.** 1990. Protein degradation in the endoplasmic reticulum. *Cell* 62:611-614.
- Knop M, Finger A, Braun T, Hellmuth K, Wolf DH.** 1996. Der1, a novel protein specifically required for endoplasmic reticulum degradation in yeast. *Embo J* 15:753-763.
- Koegl M, Hoppe T, Schlenker S, Ulrich HD, Mayer TU, Jentsch S.** 1999. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell* 96:635-644.
- Laemmli UK.** 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lambros C, Vanderberg JP.** 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J Parasitol* 65:418-420.
- Latterich M, Froehlich K-U, Schekman R.** 1995. Membrane fusion and the cell cycle: Cdc48p participates in the fusion of ER membranes. *Cell* 6:885-893.
- Lilley BN, Ploegh HL.** 2004. A membrane protein required for dislocation of misfolded proteins from the ER. *Nature* 429:834-840.
-

- Liu M, Grigoriev A.** 2004. Protein domains correlate strongly with exons in multiple eukaryotic genomes--evidence of exon shuffling? *Trends Genet* 20:399-403.
- Maier UG, Douglas SE, Cavalier-Smith T.** 2000. The nucleomorph genomes of cryptophytes and chlorarachniophytes. *Protist* 151:103-109.
- Maier UG, Hofmann CJ, Eschbach S, Wolters J, Igloi GL.** 1991. Demonstration of nucleomorph-encoded eukaryotic small subunit ribosomal RNA in cryptomonads. *Mol Gen Genet* 230:155-160.
- Margulis L.** 1970. *Origin of eukaryotic cells.* Yale University Press, New Haven, Connecticut.
- Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M, Penny D.** 2002. Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:12246-12251.
- Martoglio B, Dobberstein B.** 1998. Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol* 8:410-415.
- Matsuzaki M, Misumi O, Shin IT, Maruyama S, Takahara M, Miyagishima SY, Mori T, Nishida K, Yagisawa F, Yoshida Y, Nishimura Y, Nakao S, Kobayashi T, Momoyama Y, Higashiyama T, Minoda A, Sano M, Nomoto H, Oishi K, Hayashi H, Ohta F, Nishizaka S, Haga S, Miura S, Morishita T, Kabeya Y, Terasawa K, Suzuki Y, Ishii Y, Asakawa S, Takano H, Ohta N, Kuroiwa H, Tanaka K, Shimizu N, Sugano S, Sato N, Nozaki H, Ogasawara N, Kohara Y, Kuroiwa T.** 2004. Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga *Cyanidioschyzon merolae* 10D. *Nature* 428:653-657.
- McCracken AA, Brodsky JL.** 1996. Assembly of ER-associated protein degradation in vitro: dependence on cytosol, calnexin, and ATP. *J Cell Biol* 132:291-298.
- McFadden GI.** 2001. Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *J Phycol* 37:951-959.
- McFadden GI, van Dooren GG.** 2004. Evolution: red algal genome affirms a common origin of all plastids. *Curr Biol* 14:R514-516.
- McGrath JP, Jentsch S, Varshavsky A.** 1991. UBA 1: an essential yeast gene encoding ubiquitin-activating enzyme. *Embo J* 10:227-236.
- Melkonian M.** 1996. Phylogeny of photosynthetic protists and their plastid. *Verh Dtsch Ges Zoo* 89:71-96.
- Meusser B, Hirsch C, Jarosch E, Sommer T.** 2005. ERAD: the long road to destruction. *Nat Cell Biol* 7:766-772.
- Mullis KB.** 1990. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am* 262:56-61, 64-55.
- Nadav E, Shmueli A, Barr H, Gonen H, Ciechanover A, Reiss Y.** 2003. A novel mammalian endoplasmic reticulum ubiquitin ligase homologous to the yeast Hrd1. *Biochem Biophys Res Commun* 303:91-97.
- Nassoury N, Cappadocia M, Morse D.** 2003. Plastid ultrastructure defines the protein import pathway in dinoflagellates. *J Cell Sci* 116:2867-2874.
-

- Neuber O, Jarosch E, Volkwein C, Walter J, Sommer T.** 2005. Ubx2 links the Cdc48 complex to ER-associated protein degradation. *Nat Cell Biol* 7:993-998.
- Neuhoff V, Stamm R, Eibl H.** 1985. Clear background and highly sensitive protein staining with Coomassie Blue dyes in polyacrylamide gels: A systematic analysis. *Electrophoresis* 6:427-448.
- Ng DT, Spear ED, Walter P.** 2000. The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control. *J Cell Biol* 150:77-88.
- Nicholas KB, Nicholas jr. HB, Deerfield DWI.** 1997. GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation. *Embnew News* 4:14.
- Patron NJ, Waller RF, Archibald JM, Keeling PJ.** 2005. Complex protein targeting to dinoflagellate plastids. *J Mol Biol* 348:1015-1024.
- Pickart CM.** 2001. Mechanisms Underlying Ubiquitination. *Annu Rev Biochem* 70:503-533.
- Pilon M, Schekman R, Romisch K.** 1997. Sec61p mediates export of a misfolded secretory protein from the endoplasmic reticulum to the cytosol for degradation. *Embo J* 16:4540-4548.
- Plempner RK, Bordallo J, Deak PM, Taxis C, Hitt R, Wolf DH.** 1999. Genetic interactions of Hrd3p and Der3p/Hrd1p with Sec61p suggest a retro-translocation complex mediating protein transport for ER degradation. *J Cell Sci* 112 (Pt 22):4123-4134.
- Plempner RK, Egner R, Kuchler K, Wolf DH.** 1998. Endoplasmic reticulum degradation of a mutated ATP-binding cassette transporter Pdr5 proceeds in a concerted action of Sec61 and the proteasome. *J Biol Chem* 273:32848-32856.
- Popov N, Schmitt M, Schulzeck S, Matthies H.** 1975. Reliable micromethod for determination of the protein content in tissue homogenates. *Acta Biol Med Ger* 34:1441-1446.
- Prussak CE, Almazan MT, Tseng BY.** 1989. Peptide production from proteins separated by sodium dodecyl-sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal Biochem* 178:233-238.
- Puiu D, Enomoto S, Buck GA, Abrahamsen MS, Kissinger JC.** 2004. CryptoDB: the *Cryptosporidium* genome resource. *Nucleic Acids Res* 32:D329-331.
- Qbadou S, Becker T, Mirus O, Tews I, Soll J, Schleiff E.** 2006. The molecular chaperone Hsp90 delivers precursor proteins to the chloroplast import receptor Toc64. *Embo J* 25:1836-1847.
- Richly H, Rape M, Braun S, Rumpf S, Hoegel C, Jentsch S.** 2005. A series of ubiquitin binding factors connects CDC48/p97 to substrate multiubiquitylation and proteasomal targeting. *Cell* 120:73-84.
- Rodriguez-Ezpeleta N, Brinkmann H, Burey SC, Roure B, Burger G, Löffelhardt W, Bohnert HJ, Philippe H, Lang BF.** 2005. Monophyly of primary photosynthetic eukaryotes: green plants, red algae, and glaucophytes. *Curr Biol* 15:1325-1330.
-

- Rogers MB, Gilson PR, Su V, McFadden GI, Keeling PJ.** 2006. The Complete Chloroplast Genome of the Chlorarachniophyte *Bigeloviella natans*: Evidence for Independent Origins of Chlorarachniophyte and Euglenid Secondary Endosymbionts. *Mol Biol Evol.*
- Rouiller I, Butel VM, Latterich M, Milligan RA, Wilson-Kubalek EM.** 2000. A major conformational change in p97 AAA ATPase upon ATP binding. *Mol Cell* 6:1485-1490.
- Rouiller I, DeLaBarre B, May AP, Weis WI, Brunger AT, Milligan RA, Wilson-Kubalek EM.** 2002. Conformational changes of the multifunction p97 AAA ATPase during its ATPase cycle. *Nat Struct Biol* 9:950-957.
- Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N.** 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* 230:1350-1354.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. *Molecular Cloning - Laboratory manuals.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR.** 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74:5463-5467.
- Sato BK, Hampton RY.** 2006. Yeast Derlin Dfm1 interacts with Cdc48 and functions in ER homeostasis. *Yeast* 23:1053-1064.
- Schuberth C, Buchberger A.** 2005. Membrane-bound Ubx2 recruits Cdc48 to ubiquitin ligases and their substrates to ensure efficient ER-associated protein degradation. *Nat Cell Biol* 7:999-1006.
- Sidrauski C, Walter P.** 1997. The transmembrane kinase Ire1p is a site-specific endonuclease that initiates mRNA splicing in the unfolded protein response. *Cell* 90:1031-1039.
- Sikorski RS, Hieter P.** 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122:19-27.
- Soll J, Schleiff E.** 2004. Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol* 5:198-208.
- Sommer MS, Gould SB, Lehmann P, Gruber A, Przyborski JM, Maier U-G.** 2007. Der1-mediated pre-protein import into the periplastid compartment of chromalveolates? *Mol Biol Evol*:doi: 10.1093/molbev/msm1008.
- Sommer T, Jentsch S.** 1993. A protein translocation defect linked to ubiquitin conjugation at the endoplasmic reticulum. *Nature* 365:176-179.
- Sonnhammer EL, von Heijne G, Krogh A.** 1998. A hidden Markov model for predicting transmembrane helices in protein sequences. *Proc Int Conf Intell Syst Mol Biol* 6:175-182.
- Steiner JM, Loffelhardt W.** 2002. Protein import into cyanelles. *Trends Plant Sci* 7:72-77.
- Steiner JM, Loffelhardt W.** 2005. Protein translocation into and within cyanelles (review). *Mol Membr Biol* 22:123-132.
-

- Stoebe B, Maier UG.** 2002. One, two, three: nature's tool box for building plastids. *Protoplasma* 219:123-130.
- Tirosh B, Furman MH, Tortorella D, Ploegh HL.** 2003. Protein unfolding is not a prerequisite for endoplasmic reticulum-to-cytosol dislocation. *J Biol Chem* 278:6664-6672.
- Tonkin CJ, Roos DS, McFadden GI.** 2006a. N-terminal positively charged amino acids, but not their exact position, are important for apicoplast transit peptide fidelity in *Toxoplasma gondii*. *Mol Biochem Parasitol* 150:192-200.
- Tonkin CJ, Struck NS, Mullin KA, Stimmler LM, McFadden GI.** 2006b. Evidence for Golgi-independent transport from the early secretory pathway to the plastid in malaria parasites. *Mol Microbiol* 61:614-630.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J.** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76:4350-4354.
- Trager W, Jensen JB.** 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* 193:673-675.
- Travers KJ, Patil CK, Wodicka L, Lockhart DJ, Weissman JS, Walter P.** 2000. Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation. *Cell* 101:249-258.
- Tsai B, Rodighiero C, Lencer WI, Rapoport TA.** 2001. Protein disulfide isomerase acts as a redox-dependent chaperone to unfold cholera toxin. *Cell* 104:937-948.
- Tsai B, Ye Y, Rapoport TA.** 2002. Retro-translocation of proteins from the endoplasmic reticulum into the cytosol. *Nat Rev Mol Cell Biol* 3:246-255.
- Tyler BM, Tripathy S, Zhang X, Dehal P, Jiang RH, Aerts A, Arredondo FD, Baxter L, Bensasson D, Beynon JL, Chapman J, Damasceno CM, Dorrance AE, Dou D, Dickerman AW, Dubchak IL, Garbelotto M, Gijzen M, Gordon SG, Govers F, Grunwald NJ, Huang W, Ivors KL, Jones RW, Kamoun S, Krampis K, Lamour KH, Lee MK, McDonald WH, Medina M, Meijer HJ, Nordberg EK, Maclean DJ, Ospina-Giraldo MD, Morris PF, Phuntumart V, Putnam NH, Rash S, Rose JK, Sakihama Y, Salamov AA, Savidor A, Scheuring CF, Smith BM, Sobral BW, Terry A, Torto-Alalibo TA, Win J, Xu Z, Zhang H, Grigoriev IV, Rokhsar DS, Boore JL.** 2006. *Phytophthora* genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science* 313:1261-1266.
- van den Hoek C, Jahns HM, Mann DG.** 1993. Algen. Thieme, Stuttgart.
- Villarejo A, Buren S, Larsson S, Dejardin A, Monne M, Rudhe C, Karlsson J, Jansson S, Lerouge P, Rolland N, von Heijne G, Grebe M, Bako L, Samuelsson G.** 2005. Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast. *Nat Cell Biol* 7:1224-1231.
- Voss TS, Healer J, Marty AJ, Duffy MF, Thompson JK, Beeson JG, Reeder JC, Crabb BS, Cowman AF.** 2006. A var gene promoter controls allelic exclusion of virulence genes in *Plasmodium falciparum* malaria. *Nature* 439:1004-1008.
- Waller RF, McFadden GI.** 2005. The apicoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites. *Curr Issues Mol Biol* 7:57-79.
-

- Waller RF, Reed MB, Cowman AF, McFadden GI.** 2000. Protein trafficking to the plastid of *Plasmodium falciparum* is via the secretory pathway. *Embo J* 19:1794-1802.
- Walter J, Urban J, Volkwein C, Sommer T.** 2001. Sec61p-independent degradation of the tail-anchored ER membrane protein Ubc6p. *Embo J* 20:3124-3131.
- Wastl J, Duin EC, Iuzzolino L, Dorner W, Link T, Hoffmann S, Sticht H, Dau H, Lingelbach K, Maier UG.** 2000. Eukaryotically encoded and chloroplast-located rubredoxin is associated with photosystem II. *J Biol Chem* 275:30058-30063.
- Wastl J, Maier UG.** 2000. Transport of proteins into cryptomonads complex plastids. *J Biol Chem* 275:23194-23198.
- Wiertz EJ, Tortorella D, Bogyo M, Yu J, Mothes W, Jones TR, Rapoport TA, Ploegh HL.** 1996. Sec61-mediated transfer of a membrane protein from the endoplasmic reticulum to the proteasome for destruction. *Nature* 384:432-438.
- Wilkinson CR, Seeger M, Hartmann-Petersen R, Stone M, Wallace M, Semple C, Gordon C.** 2001. Proteins containing the UBA domain are able to bind to multi-ubiquitin chains. *Nat Cell Biol* 3:939-943.
- Wilson RJ, Rangachari K, Saldanha JW, Rickman L, Buxton RS, Eccleston JF.** 2003. Parasite plastids: maintenance and functions. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 358:155-162; discussion 162-154.
- Ye Y, Meyer HH, Rapoport TA.** 2001. The AAA ATPase Cdc48/p97 and its partners transport proteins from the ER into the cytosol. *Nature* 414:652-656.
- Ye Y, Shibata Y, Kikkert M, van Voorden S, Wiertz E, Rapoport TA.** 2005. Inaugural Article: Recruitment of the p97 ATPase and ubiquitin ligases to the site of retrotranslocation at the endoplasmic reticulum membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:14132-14138.
- Ye Y, Shibata Y, Yun C, Ron D, Rapoport TA.** 2004. A membrane protein complex mediates retro-translocation from the ER lumen into the cytosol. *Nature* 429:841-847.
- Yoon HS, Hackett JD, Ciniglia C, Pinto G, Bhattacharya D.** 2004. A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol Biol Evol* 21:809-818.
- Yoon HS, Hackett JD, Pinto G, Bhattacharya D.** 2002. The single, ancient origin of chromist plastids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15507-15512.
- Yung SC, Unnasch TR, Lang-Unnasch N.** 2003. Cis and trans factors involved in apicoplast targeting in *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 89:767-776.
- Zaslavkaia LA, Lippmeier JC, Kroth PG, Grossman AR, Apt KE.** 2000. Transformation of the diatom *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) with a variety of selectable marker and reporter genes. *J Phycol* 36:379-386.
- Zauner S, Fraunholz M, Wastl J, Penny S, Beaton M, Cavalier-Smith T, Maier UG, Douglas S.** 2000. Chloroplast protein and centrosomal genes, a tRNA intron, and odd telomeres in an unusually compact eukaryotic genome, the cryptomonad nucleomorph. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:200-205.
- Zhang Z, Green BR, Cavalier-Smith T.** 2000. Phylogeny of ultra-rapidly evolving dinoflagellate chloroplast genes: a possible common origin for sporozoan and dinoflagellate plastids. *J Mol Evol* 51:26-40.
-

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Uwe Maier für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie der finanziellen und sonstigen Mittel. Sein persönliches Interesse, auch über das Wissenschaftliche hinaus, hat den Fortgang dieser Arbeit begleitet.

Im Weiteren gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Klaus Lingelbach für die Zweitbegutachtung, sowie Frau Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl und Herrn Prof. Dr. Andreas Brune als weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission.

Dr. Stefan Zauner danke ich für ein stets offenes Ohr, die konstruktive Kritik und, wie auch Dr. Peter Poltnigg, für das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Ferner bedanke ich mich bei Prof. Dr. Dieter H. Wolf von der Universität Stuttgart für die Hefemutanten, bei Prof. Dr. Roland Lill für die Hefepiasmide.

Prof. Dr. Peter Kroth (und Frau Doris Ballert) von der Universität Konstanz danke ich für die Möglichkeit, in seinem Labor die Transfektion von *Phaeodactylum* erlernen zu können. Ansgar Gruber gilt mein Dank für die Hilfe bei der Datenbankanalyse.

Dr. Jude Przyborski und Frau Simone Spork von der AG Lingelbach danke ich für das Durchführen der *Plasmodium* Transfektionen und aller damit verbundenen Arbeiten, Frau Marianne Johannsen für die Arbeiten am Elektronenmikroskop.

Allen Mitarbeitern und Ehemaligen der AG Maier sei Dank für die gute Laboratmosphäre. Ihr ward sehr tapfer mit mir!

Zu guter letzt, danke ich meiner Frau Julia, die mich während der letzten drei Jahre über die Maßen unterstützt hat und meiner Tochter Johanna, die für diese Arbeit so manches Mal auf Ihren Papa verzichten musste. Ich liebe Euch.

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

„Ein ERAD-abgeleiteter Präproteintranslokator in der
periplastidären Membran der Chromalveolaten?“

selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe. Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den
