

**Proteintranslokation in der komplexen Plastide von *Guillardia theta*:  
Import Kern- und Nucleomorph-kodierter Plastidenproteine und  
Identifizierung und Charakterisierung neuer plastidärer Funktionen**

**DISSERTATION**

**zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)**

**dem Fachbereich Biologie  
der Philipps-Universität Marburg  
vorgelegt von**

**Jürgen Wastl**

**aus Eschenbach i.d.Opf.**

**Marburg/Lahn (2000)**

# Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin, Ampere
bp	Basenpaar(e)
C	Cytosin
cDNA	<i>copy</i> -DNA
CHEF	<i>clamped homogenous electric field</i>
CTAB	Cetyltrimethylammonium Bromid
DEAE	Diethylaminoethyl
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
G	Guanosin
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-Ethansulfonsäure
IgG	Immunglobulin G
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactosid
K	Kelvin
kDa	Kilodalton
LMP	<i>low melting point</i>
min	Minute
MOPS	3'-Morpholino-propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase Ketten Reaktion
PS	Photosystem
rRNA	ribosomale Ribonukleinsäure
RT	reverse Transkriptase
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SLS	Natriumlauroylsulfat
SSU	<i>small subunit</i> , kleine ribosomale Untereinheit
T	Thymin
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris (hydroxymethyl)-amino-methan
U	<i>units</i> (als Enzymaktivität)
UE	Untereinheit
V	Volt
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid

# 1 Einleitung

## 1.1 Plastiden

### 1.1.1 Plastidenevolution

Plastiden sind die charakteristischen Organelle aller photoautotrophen Eukaryoten. Mereschkowsky (1905) nahm aufgrund morphologischer und physiologischer Merkmale an, dass die Plastiden von Cyanobakterien abstammen. Darauf basierend formulierte Margulis die Endosymbiontentheorie (1970). Diese besagt, dass eine heterotrophe Wirtszelle einen freilebenden phototrophen Prokaryoten phagozytierte. Durch die Integration des Prokaryoten als Symbionten in dieser primären Endocytobiose entstand ein photosynthetisch aktiver Eukaryot. Diese Theorie ist generell akzeptiert und durch ultrastrukturelle, biochemische und molekularbiologische Untersuchungen belegt (z.B.: Gray, 1992; Cavalier Smith, 1995; Bhattacharya & Medlin, 1995).

Der Endocytobiont wurde im Verlauf der Evolution als semiautonomes Organell etabliert, das von zwei Membranen umgeben ist. Damit einher ging eine drastische Reduzierung des Genoms des vormals freilebenden Cyanobakteriums. Die Reduktion der Plastome erfolgte, da deren kodierte Funktionen entweder nicht mehr im Endosymbionten gebraucht wurden, oder diese von Kern-kodierten Proteinen ersetzt wurden (Delwiche & Palmer, 1997).

Eine Erklärung für den Verlust an Genen im Plastom ist der Gentransfer in den Nucleus des Wirtes. Timmis & Scott (1983, 1984) lieferten durch die Identifizierung plastidärer DNA im Wirtsgenom von Spinat den ersten Hinweis auf einen DNA-Transfer von Plastom zu Wirtsgenom. Unter der Voraussetzung, dass Gene in dem Genom des Wirtes integrieren, und deren Genprodukte synthetisiert werden, können diese im photosynthetisch aktiven Endosymbionten die Plastom-kodierten Protein funktionell ersetzen (Baldauf et al., 1990). Die Theorie der intrazellulären Genverlagerung ist mittlerweile anerkannt (z.B.: Palmer, 1985; 1991).

Die Kodierungskapazität der Plastome in photosynthetisch aktiven Plastiden liegt in einem Bereich von ca. 120 kb in *Pinus thunbergii* (Wakasugi et al., 1994) bis zu 191 kb in der Rotalge *Porphyra purpurea* (Reith & Munholland, 1995). Der daraus abgeleitete Gengehalt von ca. 100 bis 250 Plastom-kodierten Funktionen zeigt im Vergleich zu den ca. 3000 Genen des vollständig sequenzierten Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 (Kaneko et al., 1996) die extreme Reduktion des Plastoms.

### 1.1.2 Sekundäre Endocytobiose und komplexe Plastiden

Die meisten Algengruppen enthalten Plastiden, die von mehr als zwei Membranen umgeben sind. Dies ist mit der primären Endosymbiontentheorie nicht zu erklären. Es wurde deshalb die Hypothese aufgestellt, dass nicht ein phototropher Prokaryot, sondern ein phototropher Eukaryot von einer eukaryoten Zelle phagozytiert und als Symbiont aufgenommen wurde (Gibbs, 1978; 1981; 1983). Durch eine sukzessive Reduktion des Symbionten kam es schliesslich zu einer vollkommenen Eliminierung des Cytosols und des Nucleus des primären Wirtes, sodass nur noch die von vier Membranen umgebenen Plastide übrig blieb (siehe Abb.1-1). Diese Plastiden werden als komplexe Plastiden bezeichnet (Sitte, 1993). Die Vielzahl der rezenten Algengruppen zeichnet sich durch den Besitz von komplexen Plastiden aus (Haptophyta, Heterokontophyta).

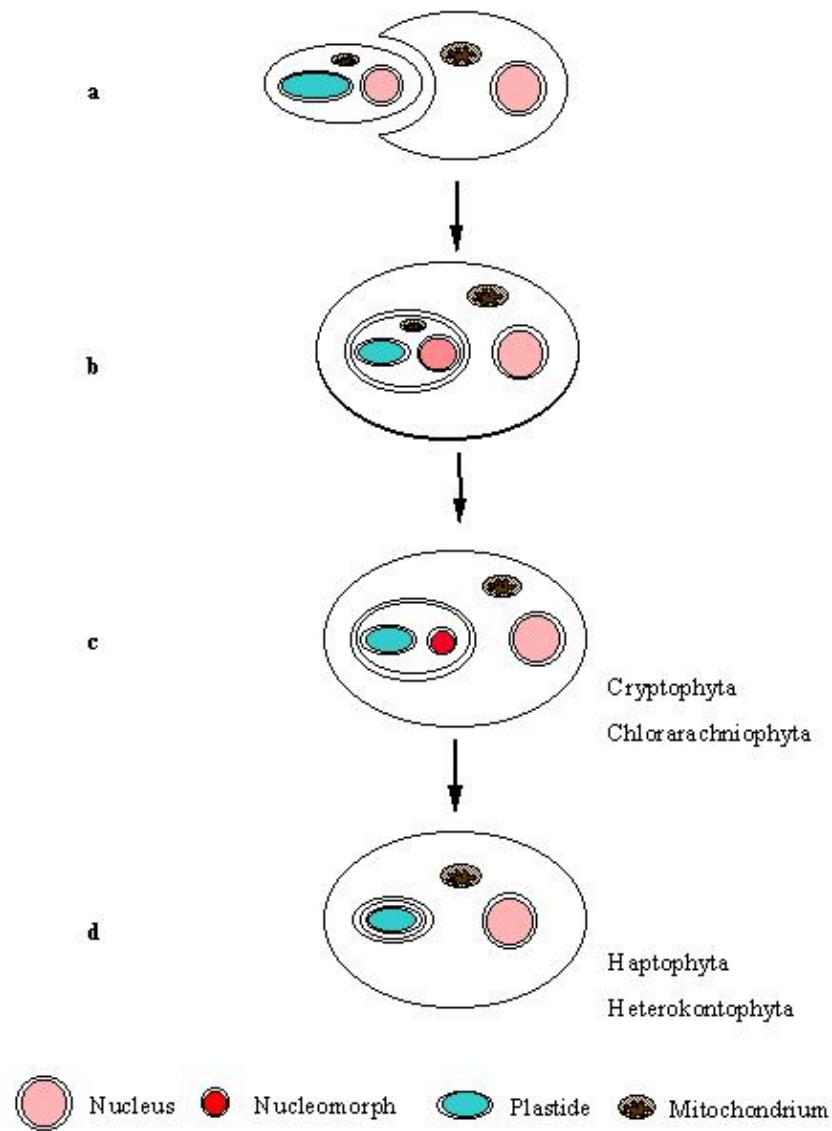
Die Cryptophyta (Gillot, 1990; Fraunholz et al., 1997) und die Chlorarachniophyta (Ludwig & Gibbs, 1989; Hibberd & Norris, 1984) besitzen eine besondere Form komplexer Plastiden. Zwischen den beiden

Membranpaaren beherbergen sie ein periplastidäres Cytosol (Abb.1–1c), das einen extrem reduzierten Restzellkern, das DNA–haltige Nucleomorph besitzt (Greenwood, 1974; Gibbs, 1983; Ludwig & Gibbs, 1987 und 1989). Die Funktionalität dieses sogenannten periplastidären Kompartimentes konnte erstmals mit dem Nachweis von 80S Ribosomen (Sitte & Baltes, 1990; McFadden & Douglas, 1994) und anhand der Isolierung einer cDNA für das molekulare Chaperon Hsp70 in der Cryptomonade *Rhodomonas salina* gezeigt werden (Hofmann et al., 1994).

Phylogenetische Untersuchungen der 18S rRNA Sequenzen zeigen die Verwandtschaft der Nucleomorph–kodierten kleinen ribosomalen Untereinheit der Cryptomonade *G. theta* mit denen der Rhodophyta (Douglas et al., 1991; Maier et al., 1991; Van de Peer et al., 1996). Weitere phylogenetische Berechnungen an Nucleomorph–kodierten Tubulinen in *G. theta* stützen diesen Befund (Keeling et al., 1999).

Im Gegensatz dazu belegen phylogenetische Analysen an den Chlorarachniophyta, dass deren eukaryoter Symbiont einen gemeinsamen Vorläufer mit der Chlorophyll *a/b*–Linie besitzt. Die unterschiedliche Abstammung der Symbionten spricht deshalb für eine polyphyletische Entstehung dieser Algengruppen (Van de Peer et al., 1996).





**Abb. 1–1: Sekundäre Endocytobiose.** (a) Eine phototrophe eukaryote Zelle wird von einer eukaryoten Zelle phagozytiert. (b) Die entstandene chimäre Zelle besitzt zwei eukaryote Cytosole und zwei Nuclei. (c) Im Laufe der Evolution kommt es zu einer Reduktion des Endosymbiontencytosols zu einem sogenannten periplastidären Kompartiment mit einem reduzierten Nucleus, dem Nucleomorph. (d) Die vollständige Reduktion des periplastidären Kompartimentes führt zu einer komplexen Plastide, die von vier Membranen umgeben ist.

Auch die Apicomplexa, zu denen die intrazellulären humanpathogenen Parasiten *Plasmodium falciparum* und *Toxoplasma gondii* gehören, zeichnen sich durch die Existenz komplexer Plastiden aus. Diese sogenannten Apicoplasten sind photosynthetisch inaktiv und ebenfalls von vier Membranen umgeben (McFadden & Waller, 1997; McFadden et al., 1996).

Die Apicoplasten enthalten ein ringförmiges Chromosomen, dessen Sequenzierung und daraus abgeleitete phylogenetische Analysen sowohl in *Plasmodium falciparum* ("malaria circle") als auch in *Toxoplasma gondii* dieses als Plastidengenom identifizierte (Wilson et al., 1996; Köhler et al., 1997). Diese molekulargenetischen Hinweise auf einen plastidären Ursprung des Apicoplasten werden von ultrastrukturellen Untersuchungen gestützt (McFadden et al., 1997).

## 1.2 Proteintranslokation an plastidären Membranen

### 1.2.1 Bedeutung des Protein–Imports in Plastiden

Plastiden, die durch primäre Endocytobiose als semiautonomes Organell etabliert wurden, sind von zwei Membranen, der sogenannten *plastid envelope* umgeben. Im Laufe der Evolution wurden Gene für plastidäre Funktionen auf den Nucleus der Wirtszelle ausgelagert (siehe Kap. 1.1.1). Für die Genprodukte bedeutet dies, dass sie über die *plastid envelope* transloziert werden müssen, um an ihren Wirkungsort zu gelangen.

Das gerichtete Protein–*targeting* in die Plastide erfordert zum einen ein spezielles Sortierungssignal, das die Proteine an ihren Zielort sendet und zum anderen eine Importmaschinerie in der *plastid envelope*.

### 1.2.2 Transitpeptide

Das topogene Signal, das die Translokation an der *plastid envelope* vermittelt, wird als Transitpeptid bezeichnet. Transitpeptide sind spezifisch für den gerichteten Proteintransport in Plastiden (Heins et al., 1998). In allen drei Entwicklungslinien photosynthetisch aktiver Eukaryoten, die eine Plastide durch eine primäre Endocytobiose etabliert haben, wurden derartige topogene Signale identifiziert (Grünalgen/Landpflanzen: Theg & Geske, 1992; Rotalgen: Zhou & Ragan, 1994; Glaucocystophyten: Jakowitsch et al., 1996). Im Gegensatz zu den Signalsequenzen, die die Translokation an den Mitochondrienmembranen initiieren, besitzen Transitpeptide keine konservierten Motive (von Heijne & Nishikawa, 1991). Die bisherigen Untersuchungen zur Funktion von Transitpeptiden haben bewiesen, dass diese essentiell für den Proteintransport an der *plastid envelope* sind.

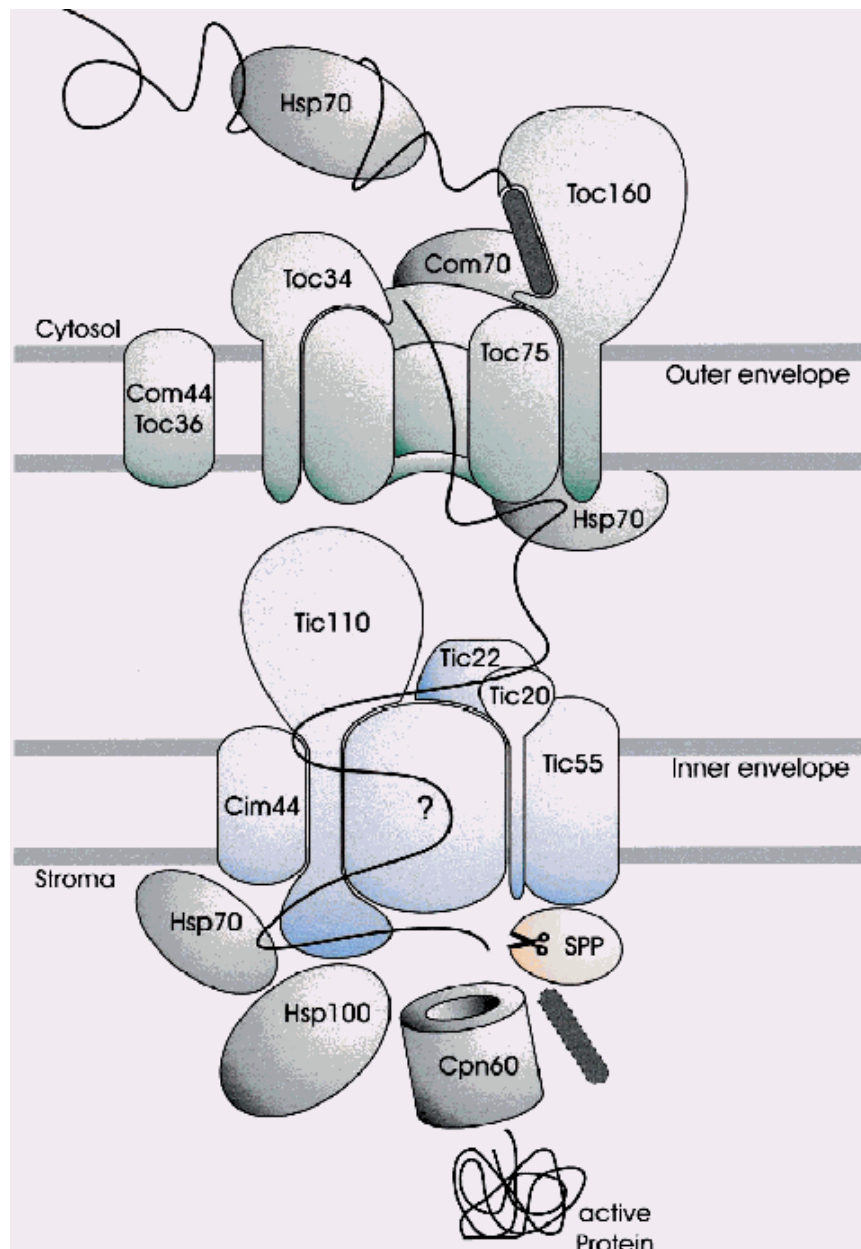
Der Vergleich von Transitpeptiden aus Grünalgen und höheren Pflanzen zeigt, dass Transitpeptide trotz der Variabilität gemeinsame Merkmale aufweisen: Ein entscheidendes Kriterium ist der Gehalt an phosphorylierbaren Aminosäuren (Waegemann & Soll, 1996), ein weiteres die positive Nettoladung dieses Aminosäurebereiches (von Heijne & Nishikawa, 1991; von Heijne et al., 1991).

Plastidär lokalisierte, Kern–kodierte Proteine werden als sogenannte Präproteine im Cytosol synthetisiert. Dabei ist das Transitpeptid als N–terminale Extension Teil des Präproteins. Nach Translokation an den Membranen wird das topogene Signal von einer stromalen Signalpeptidase abgespalten und damit das Präprotein zum reifen Protein prozessiert.

Über die Evolution von Transitpeptiden und das N–terminale "Ankoppeln" des Transitpeptids an das reife Protein ist bislang wenig bekannt. Neben der Vermutung, dass Duplikations– und Rekombinationsereignisse zur Entstehung von Präproteinen führen (Arimura et al., 1999), wurden verschiedene Mechanismen beschrieben: So zeigten Thorbjornsen et al. (1996), dass in *Hordeum vulgare* das Transitpeptid durch Spleissen an eine ADP–Glucose–Pyrophosphorylase hinzugefügt wurde. Auch Exon–*shuffling* wurde als Methode zum Anfügen von topogenen Signalen postuliert (Wegener & Schmitz, 1993; Wischmann & Schuster, 1995; Long et al., 1996).

### 1.2.3 Die Translokationsmaschinerie in den beiden Plastidenmembranen

Die Maschinerie, die den Transport der Präproteine über die beiden Plastidenmembranen bewerkstelligt, ist komplex aufgebaut und besteht aus Komponenten, die in sogenannten Translocons sowohl in der inneren (Tic) als auch äusseren Membran (Toc) lokalisiert sind. Eine Übersicht über die Komponenten der Importmaschinerie in Chloroplasten höherer Pflanzen gibt Abb. 1–2. Der oligomere Komplex setzt sich zusammen aus den Translocons Toc und Tic sowie verschiedenen molekularen Chaperonen, die mit den jeweiligen Translocons assoziiert sind (May & Soll, 1999). Die Sequenzinformation bislang bekannter Tic- und Toc-Komponenten der charakterisierten pflanzlichen Importkomplexe ist ausschliesslich auf Wirtszell-Genomen identifiziert worden. Keines der bislang bekannten, vollständig sequenzierten Plastome enthält ein Gen, das ein Protein dieses Translokationsapparates kodiert (Martin et al., 1998).



**Abb.1–2: Die Importmaschinerie, bestehend aus Toc, Tic und molekularen Chaperonen in der äusseren und inneren Plastidenmembran (May & Soll, 1999).** Das entfaltete Präprotein wird über das Translocon der äusseren Membran (Toc) in den Intermembranraum und anschliessend über das Translocon der inneren Membran (Tic) in das Stroma der Plastide importiert. Dort wird das Präprotein mit Hilfe einer stromalen Signalpeptidase (SPP) prozessiert und das reife Protein mit Hilfe von molekularen Chaperonen in seine native Form überführt. Abk.: Hsp, *heat shock protein*; Com, *component of outer chloroplast membrane*; Cim, *component of inner chloroplast membrane*, Cpn60, Chaperon der hsp60 Familie; Zahlen bezeichnen das jeweilige ungefähre Molekulargewicht in kDa.

Die Sequenzanalyse in dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 (Kaneko et al., 1996) ergab vier Sequenzhomologe zu bislang bekannten Toc/Tic-Komponenten der Translokationsmaschinerie in der *plastid envelope* höheren Pflanzen (Reumann & Keegstra, 1999). Da ein Proteinimport in Prokaryoten bislang nicht beschrieben wurde, wird für diese integralen Membranproteine eine Beteiligung an der Sekretion postuliert (Heins & Soll, 1998)

Molekulare Chaperone sind an der Translokation von Präproteinen über die *plastid envelope* beteiligt (Abb.1–2). Für cytosolisches Hsp70 konnte gezeigt werden, dass es an der Toc-Maschinerie mit Präproteinen interagiert (Schnell et al., 1994; Kourtz & Ko, 1997) und in dessen Anwesenheit die Effizienz des Importes erhöht wird (Waegemann et al., 1990). Hsp70 wurde ebenfalls im Intermembranraum (Waegemann & Soll, 1991) identifiziert. Die Aufgabe dieses Chaperons liegt in der Stabilisierung einer importkompetenten Form des Präproteins (May & Soll, 1999). Importierte Proteine werden im Anschluss an die Translokation prozessiert und im Stroma von molekularen Chaperonen in ihre native Konformation überführt. Dies konnte anhand der Interaktion von stromalem Hsp60 (Kessler et al., 1994) als auch für Hsp100 mit Tic110 (Akita et al., 1997) nachgewiesen werden.

## 1.2.4 Proteintransport in komplexe Plastiden

Die Sequenzanalyse Kern-kodierter, plastidärer Proteine aus Organismen mit komplexen Plastiden ergab, dass diese Proteine auch über eine N-terminale Extension verfügen, wie erstmals an der kleinen Untereinheit der Ribulose-1,5-Bisphosphat-Carboxylase-Oxygenase (RubisCO) aus *Euglena gracilis* gezeigt werden konnte (Chan et al., 1990). Im Gegensatz zu dem Transitpeptid der Präproteine aus Grünalgen, Rotalgen, Glaucocystophyten und höheren Pflanzen ist dieses zweigeteilt und besteht aus einer Signalsequenz und einem Transitpeptid. Die Signalsequenz konnte als Exportsignal zur kotranslationalen Insertion an Mikrosomenmembranen verifiziert werden (Kishore et al., 1993; Lang et al., 1998). Die C-terminale Domäne des zweigeteilten Transitpeptides zeigt Charakteristika der Transitpeptide, die für die Translokation an der *plastid envelope* beschrieben wurden (von Heijne & Nishikawa, 1991; von Heijne et al., 1991).

Der *in vivo* Protein-Import in komplexe Plastiden wurde erstmals von Sulli und Schwartzbach untersucht (1995). Sie konnten mit Hilfe von *pulse-chase* Experimenten nachweisen, dass das *plastid-targeting* in die komplexe Plastide von *Euglena gracilis*, mit der kotranslationalen Insertion in das ER beginnt. Es wird postuliert, dass anschliessend über den Golgi-Apparat Vesikel mit Proteinen, die für die Plastide bestimmt sind, mit der äussersten der drei Plastidenmembranen fusionieren. Die daraufhin freigesetzten Proteine überqueren die beiden inneren Membranen, wie sie von der *plastid envelope* höherer Pflanzen bekannt ist (Sulli & Schwartzbach, 1995).

Im Gegensatz zu den komplexen Plastiden der Euglenophyta und der Dinophyta, deren komplexe Plastiden von drei Membranen umgeben sind, müssen Nucleus-kodierte plastidäre Proteine in den Haptophyta, Heterokontophyta, Chlorarachniophyta, Cryptophyta und Apicomplexa jedoch vier Membranen überqueren, um in das Stroma der Plastide zu gelangen.

In *Plasmodium falciparum* und *Toxoplasma gondii* wurden Kern-kodierte, Apicoplast-lokalisierte Proteine identifiziert, die unter anderem an der Fettsäurebiosynthese beteiligt sind und als Präproteine mit einem zweigeteilten Transitpeptid synthetisiert werden (Waller et al., 1998). *Toxoplasma* ist molekularbiologischen Methoden gut zugänglich und dient deshalb als ein Modellsystem, in dem das Apicoplast-*targeting in vivo* untersucht werden kann (Striepen et al., 1998): Mittels Transformation von unterschiedlichen Transitpeptid-Konstrukten konnte die Lokalisation der jeweiligen GFP-Fusionsproteine *in vivo* und damit die Funktion der beiden N-terminalen topogenen Signale bestimmt werden (Waller et al., 1998).

Erste Untersuchungen zum *plastid-targeting* in komplexe Plastiden der Heterokontophyta, die von vier Membranen umgeben sind, wurden von Lang et al. (1998) publiziert: Sie konnten die jeweilige Funktion der beiden topogenen Signale des zweigeteilten Transitpeptides *in vitro* nachweisen.

Die ebenfalls von vier Membranen umgebenen komplexen Plastiden der Cryptophyta und Chlorarachniophyta zeichnen sich durch das funktionelle, periplastidäre Kompartiment zwischen der zweiten und der dritten

Membran aus (siehe Abb.1–1). Über das Plastiden-*targeting* in diesen beiden Algengruppen, die ausgehend von den beiden eukaryoten Genomen zwei unterschiedliche Arten von Präproteinen kodieren können, ist bislang nichts bekannt.

### 1.3 Das *Guillardia theta* Nucleomorph Genomprojekt

Zwischen der zweiten und dritten Membran der komplexen Plastide befindet sich bei den Chlorarachniophyta und Cryptophyta das sogenannte periplastidäre Kompartiment mit einem reduzierten DNA-haltigen Restzellkern, dem Nucleomorph (siehe Kap. 1.1.2). Ein Genomprojekt hat sich zum Ziel gesetzt, die komplette Sequenz dieses Restgenoms des Endosymbionten zu entschlüsseln, um daraus Informationen für dessen Aufrechterhaltung zu gewinnen (Gilson et al., 1997). Als Grund für die Beibehaltung und funktionelle Aktivität des Nucleomorphs wurde die Kodierung essentieller plastidärer Proteine vermutet (Häuber et al., 1994).

Das aus drei Chromosomen bestehende Restgenom zeichnet sich durch eine hohe Gendichte aus (Fraunholz, 1999). Die Vielzahl der Gene kodiert Funktionen des Transkriptions- und Translationsapparates. Bislang wurde kein Gen identifiziert, das Enzyme des Primärstoffwechsel kodiert (Zauner et al., 2000).

### 1.4 Zielsetzung

Die Aufrechterhaltung des periplastidären Kompartimentes und des Nucleomorphs beruht auf der Annahme, dass das Nucleomorph essentielle plastidäre Funktionen kodiert. Ein Ziel dieser Arbeit bestand darin, *open reading frames (orfs)* mit plastidären Funktionen zu identifizieren und zu charakterisieren. Dabei stellte sich die Frage, ob neben bereits bekannten plastidären Funktionen auch neue identifiziert werden können. Ein Nucleomorph-kodierter *orf* mit bislang unbekannter plastidärer Funktion sollte näher charakterisiert und seine subzelluläre Lokalisation in *G. theta* bestimmt werden. Hierzu sollten sowohl immunologische Methoden verwendet werden als auch mit Hilfe von *in vitro* Translokationsstudien das *plastid-targeting* Nucleomorph-kodierter plastidärer Funktionen untersucht werden.

Das am besten charakterisierte System bezüglich des plastidären Proteinimportes stellt das der Erbsenchloroplasten dar. Neben dessen Verwendung zu Proteintranslokationsstudien sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob transportkompetente *G. theta* Plastiden isoliert werden können. Anhand von Importstudien in *G. theta* Plastiden sollten im Vergleich zur Translokation in Erbsenchloroplasten Aussagen zur Proteintranslokation an der *plastid envelope* in *G. theta* getroffen werden.

Zusätzlich zum Import Nucleomorph-kodierter Präproteine sollte der Import Nucleus-kodierter Präproteine, die ein zweigeteiltes Transitpeptid besitzen, in die komplexe Plastide von *G. theta* untersucht werden. In dieser Arbeit sollte der experimentelle Beweis der Funktionalität der beiden einzelnen topogenen Signale geführt werden und damit das *plastid-targeting* in der komplexen Plastide von *G. theta* beschrieben werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien

Hier nicht aufgeführte Chemikalien wurden von den Firmen Roth (Karlsruhe), Merck (Darmstadt) oder Sigma (München) bezogen.

Ampicillin	Boehringer, Mannheim
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
CSPD	Boehringer, Mannheim
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe
Kanamycin	Serva, Heidelberg
LMP-Agarose (Seaplaque GTG)	Biozym, Hameln
Long Ranger-Gel Solution	FMC Bioproducts, Rockland (USA)
N-Lauroylsarcosin	Sigma, München
Percoll	Amersham Pharmacia, Freiburg
Pevabloc SC	Boehringer, Mannheim
Phenol (wassergesättigt)	Roth, Karlsruhe
Phenol (TE-gepuffert)	Roth, Karlsruhe
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
RNasin	Boehringer, Mannheim
SDS	Roth, Karlsruhe
TEMED	Roth, Karlsruhe
Tetracyclin	Sigma, München
Thermolysin	Boehringer, Mannheim
X-Gal	Roth, Karlsruhe

#### 2.1.2 Puffer und Lösungen

Hier nicht aufgeführte Lösungen und Puffer wurden ausnahmslos angefertigt nach Sambrook et al., (1989).

0,4 M MOPS

0,1 M Natriumacetat

0,02 M Na<sub>2</sub>EDTA

pH 7,0 mit 10 N NaOH einstellen

5 x HMS

1,65 M Sorbitol

250 mM HEPES/KOH, pH 7,6

15 mM MgCl<sub>2</sub>

20 x SSC

3,0 M NaCl

0,3 M Na<sub>3</sub>-Citrat

pH 7,0

10 x TBE

1,34 M Tris/HCl, pH 8,8

0,44 M Borsäure

25 mM Na<sub>2</sub>EDTA

5 x *random priming* Puffer

1 M HEPES, pH 6,6

250 mM Tris/HCl, pH 8,0

25 mM MgCl<sub>2</sub>

50 mM β-Mercaptoethanol

Prähybridisierungs- und Hybridisierungslösung

Roti-Hybri-Quick (Roth, Karlsruhe) Waschpuffer

2 x SSC, 0,1 % (w/v) SDS DEAE-Elutionspuffer

1 M NaCl

0,5 mM Na<sub>2</sub>EDTA

25 mM Tris-HCl, pH 8,0

#### RNA-Isolierungspuffer

4 M Guanidiniumthiocyanat

25 mM Na<sub>3</sub>-Citrat, pH 7,0

0,1 M β-Mercaptoethanol

0,5 % (w/v) N-Lauroylsarcosylat

#### Ladepuffer (DNA)

0,1 % (w/v) Bromphenolblau

0,1 % (w/v) Xylencyanol

50 mM Na<sub>2</sub>EDTA

4 M Harnstoff

50 % (w/v) Saccharose

#### Proteinextraktionspuffer

3 % (w/v) SDS

0,2 % (w/v) Triton X-100

125 mM Tris-HCl (pH 6,8)

#### Proteinprobenpuffer

Roti-Load (Roth, Karlsruhe)

#### Laufpuffer für SDS-PAGE

0,05 M Tris/HCl

0,384 M Glycin

0,1 % (w/v) SDS

#### Transferpuffer (*semidry-blotting*)

100 mM Tris-Glycin pH 7,5

0,9 % (w/v) NaCl



### 2.1.3 Filter und Membranen

DEAE–Membran NA 45	Schleicher & Schuell, Dassel
Hybond N+	Amersham Pharmacia, Freiburg
Nitrocellulose	Roth, Karlsruhe
PVDF–Membran	Millipore, Bedford, USA
Whatman 3MM	Schleicher & Schuell, Dassel

### 2.1.4 Radiochemikalien

[ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]–Methionin, 3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml wurde von Amersham Pharmacia (Freiburg) bezogen. Arbeiten mit Radiochemikalien wurden in dafür zugelassenen Isotopenlaboren der Universität Bayreuth durchgeführt. An der Philipps–Universität Marburg wurde ein zugelassenes Labor in der Parasitologie (AG Prof. Dr. Lingelbach) genutzt.

### 2.1.5 Photomaterialien

Agfaortho Negativfilm	Agfa Gevaert, Leverkusen
Scientia EM Film	Agfa Gevaert, Leverkusen
Photopapier Agfa BN310RC	Agfa Gevaert, Leverkusen
Entwickler Agfa Rodinal	Agfa Gevaert, Leverkusen
Fixierer Agfa Leukobrom	Agfa Gevaert, Leverkusen
Polaroid–Film 4 x 5 Land Film Typ 57	Polaroid, USA
Röntgenfilm RX Medical 18 x 24 cm	Fuji, Japan
Röntgenfilm RX Medical 30 x 40 cm	Fuji, Japan
Röntgenfilm–Entwickler	Kodak, Rochester (USA)
Röntgenfilm–Fixierer	Kodak, Rochester (USA)

### 2.1.6 Molekularbiologische Kits

<i>DIG–labelling and Detection Kit</i>	Boehringer Mannheim
<i>ECL–Western Detection System</i>	Amersham Pharmacia, Freiburg

<i>"Microsomal membranes"</i>	Promega, Mannheim
<i>Plasmid–Midi–Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>Plasmid–Mini–Kit</i>	Qiagen, Hilden
<i>"Thermo sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit with 7–deaza–dGTP"</i>	Amersham Pharmacia, Freiburg
<i>"Coupled Reticulozyte Lysate"</i>	Promega, Mannheim

### 2.1.7 DNA–modifizierende Enzyme

Restriktionsendonukleasen, DNA–Polymerasen und DNA–modifizierende Enzyme wurden von den Firmen Amersham Pharmacia (Freiburg), Boehringer (Mannheim), Eppendorf–Netheler–Hinz (Hamburg), Gibco/BRL (Eggenstein), Promega (Mannheim) oder Stratagene (Heidelberg) bezogen.

DNase I	(10 U/ml)
Klenow–Polymerase	(2000 U/ml)
reverse Transkriptase	(200 U/μl)
RNase A	(5 mg/ml)
SP6 RNA Polymerase	(10–20 U/μl)
T4 DNA Ligase	(1000 U/ml)
T7 RNA Polymerase	(10–20 U/μl)
Taq DNA Polymerase	(5000 U/ml)

### 2.1.8 DNA–Längenstandards und Protein–Molekulargewichtstandards

DNA–Längenstandards wurden durch zweistündige Hydrolyse von 12,5 μg Lambda–DNA mit den Endonucleasen *EcoRI* und *HindIII* hergestellt (Endkonzentration 100 ng/μl). Zur Abschätzung der molekularen Masse von Proteinen in denaturierenden Polyacrylamid–Gelen wurde ein vorgefärbter Standard verwendet (SDS–PAGE *Standard Low Range*, BioRAD, München), der folgende Proteine enthielt:

*Phosphorylase B* 109,0 kDa

*Bovine serum albumine* 80,0 kDa

*Ovalbumine* 51,4 kDa

*Carbonic anhydrase* 34,0 kDa

*Soybean trypsin inhibitor* 27,0 kDa

*Lysozyme* 16,6 kDa

Alternativ wurde als Standard die BrCN-Spaltprodukte von Pferdeherzmyoglobin (Fluka) mit folgenden Standardgrößen verwendet: 17,0 kDa; 14,5 kDa; 10,7 kDa; 8,2 kDa; 6,3 kDa; 2,5 kDa.

## 2.1.9 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg) bezogen. Die Primer für ALFexpress (Sequenzierung) waren am 5'-Ende mit dem Fluoreszenzfarbstoff CY5 markiert, Primer für den Einsatz mit dem LiCOR 4200 waren mit IRD800- (800 nm-Kanal) bzw. IRD700-Farbstoff markiert (700 nm-Kanal).

Name	Sequenz	Modifikation
Reverse Primer	5'-AAC AGC TAT GAC CAT G-3'	CY5/IRD700/IRD800
Universal Primer	5'-TGA CCG GCA GCA AAA TG-3'	CY5/IRD700/IRD800
M13(-20)	5'-gta aaa cga cgg cca gt-3'	CY5/IRD700/IRD800
M13 reverse	5'-gga aac agc tat gac cat g-3'	CY5/IRD700/IRD800

Primer für spezifische Amplifikationen wurden ohne Modifikation synthetisiert.

<i>gapC1-5A</i>	5'-GCA AAA ATG GCG TAC TTC AAG GC-3'
<i>gapC1-5B</i>	5'-CAA CAT GGG ATC CTC CTT TGT TCC-3'
<i>gapC1-3</i>	5'-CTA TTA GGC CTT GAC CTT GG-3'
<i>rub5</i>	5'-CGC GTC GTT TTA CAT ATG TTT G-3'
<i>rub5-2</i>	5'-CTG AAA AAT TCA TGG AGA TCG ACG-3'
<i>rub3</i>	5'-GTG ATA GGA TCCAGC CTA TTC-3'
<i>rub NMR5:</i>	5'-CTG AAA AAT CCA TGG AGA TCG ACG AAG-3'
<i>rub NMR3:</i>	5'-GAA TGC TCA GCT TAA CCA TAT TTT TG-3'

## 2.1.10 Vektoren

pBluescript II KS (+) Amp<sup>r</sup>, *lacZ'*; *f1ori*; P<sub>T7</sub>; P<sub>T3</sub> (Stratagene, Heidelberg)

pBluescript II SK (+) Amp<sup>r</sup>, lacZ'; f1ori; P<sub>T7</sub>; P<sub>T3</sub> (Stratagene, Heidelberg)

enthalten im Vektor λZAPII

pGEM-T Amp<sup>r</sup>, lacZ', P<sub>T7</sub>, P<sub>SP6</sub>, (Promega, Mannheim)

pET28a Km<sup>r</sup>, f1ori; lacI, P<sub>T7</sub>; T7 Transkriptionsstart; N-term. His-Tag, T7-Tag; C-term. His-Tag; T7-Terminator

(Novagen, Madison, USA)

## 2.1.11 Bakterienstämme

*E. coli* XL1-Blue MRF': Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1

recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZ ΔM15 Tn5 (Kanr)]

*E. coli* SOLR e14-(mcrA-) Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)171 endA1 supE44

thisbcC uvrC umuC::Tn5(Kanr) recJ gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZ ΔM15]c

*E. coli* BL21(DE3): dcmompT hsdS(r<sub>B</sub><sup>-</sup>, m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal (λcIts857 ind1 Sam7 nin5 lacUV5-T7 gene1)

Kompetente *E. coli* Zellen wurden nach Sambrook et al. (1989) hergestellt. Für die Anzucht von λZAPII wurde *E. coli* XL1 Blue MRF' verwendet.

## 2.1.12 Antikörper

Folgende mono- bzw. polyklonale Antisera wurden in dieser Arbeit verwendet:

goat anti rabbit IgG 15 nm Gold-konjugiert (Sigma, München)

mouse anti-Digoxigenin F(ab)<sub>2</sub>-Fragment,

Alkalische Phosphatase-konjugiert (Boehringer, Mannheim)

goat anti-rabbit IgG Meerrettich-Peroxidase-konjugiert (Boehringer, Mannheim)

rabbit anti-Rubredoxin (in dieser Arbeit hergestellt, siehe Kap.2.2.23)

## 2.1.13 Kultur-Medien

### 2.1.13.1 Medium für *E. coli*

LB-Medium (pro Liter): 10 g Bacto-Trypton

5 g Bacto-Hefeextrakt

10 g NaCl

Für die Herstellung von LB-Platten wurden 15 g Bacto-Agar pro Liter LB-Medium eingewogen. Für selektive Medien wurde Ampicillin (50 µg/ml Endkonzentration) beziehungsweise Kanamycin (20 µg/ml Endkonzentration) zum Medium gegeben. Zur Herstellung selektiver X-Gal-IPTG-Ampicillin-Platten wurde zusätzlich X-Gal und IPTG (Endkonzentration je 40 µg/ml) zugefügt.

### 2.1.13.2 Kultur-Medium f/2 für *Guillardia theta*

Das Kulturmedium für *Guillardia theta* wurde nach Guillard & Ryther (1962) und Guillard (1975) hergestellt.

#### *f/2-Grundlösung*

Substanz	MW	mmol/l	g/l
Meersalz (Tropic Marine)			30,0
NaNO <sub>3</sub>	85,0	0,883	0,075
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	156,0	0,036	0,006
Tris	121,1	5,0	0,602

Der pH-Wert wird mit 5 N HCl auf 7,2 eingestellt und das Medium anschließend autoklaviert.

#### *f/2 Spurenelement-Stammlösung*

Substanz	MW	mmol/l
FeCl <sub>3</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	270,30	11,65
Na <sub>2</sub> EDTA	372,30	11,71
CuSO <sub>4</sub> x 5 H <sub>2</sub> O	249,68	0,039
ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O	287,54	0,077
CoCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	237,93	0,042
MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O	197,91	0,91
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O	241,90	0,026

Jede Substanz muss gelöst sein, bevor die nächste zugegeben wird. Nach dem Autoklavieren wird die Lösung lichtgeschützt bei 4 °C aufbewahrt. Der pH-Wert beträgt etwa 2,0.

#### *f/2 Vitamin-Stammlösung*

Substanz:	MW	mmol/l
Biotin	244,31	0,0020
Cyanocobalamin	135,4	0,00037



Pulsfeld Gelelektrophoresesystem CHEF DRIII (BioRad, München)

Repro-Anlage Leitz Focomat IIc (Leica)

Semidry Blotting Apparatur Novablot 2117–250 (LKB, Bromma)

Spektralphotometer Ultrospec II (Pharmacia, Freiburg)

Transmissions Elektronenmikroskop EM301 (Philips, Hamburg)

UV-Lampe MinUVIS 254 nm/366 nm (DESAGA, Heidelberg)

Zweistrahl-Photometer Uvikon 941 (Kontron, Eching)

## 2.1.15 Software

Zur automatischen Erstellung von Alignments wurde ClustalX (Jeanmougin et al., 1998) benutzt. Letzteres wurde ebenso wie das Programmpaket Phylip (Felsenstein, 1985; 1989) zur Erstellung von Phylogenien verwendet.

Über das Internet wurde weiterhin auf folgende Programme und Suchalgorithmen zugegriffen:

BlastX, BlastN <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST>

ChloroP <http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>

CyanoBase <http://www.kazusa.or.jp:8080/cyano/index.html>

PSORT <http://psort.nibb.ac.jp:8800/>

SOSUI <http://azusa.proteome.bio.tuat.ac.jp/sosui/>

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Algenkultur und Ernte

*Guillardia theta* wurde bei einer Temperatur von 20 °C unter Beleuchtung mit "warm-white" Fluoreszenzlampen im 12-stündigen Licht/Dunkel-Rhythmus gehalten. Dabei wurden zwei Liter fassende Erlenmeyerkolben für ein Volumen von einem Liter Algenkultur verwendet. Algen in der späten log-Phase (etwa nach zwei Wochen) wurden geerntet. Hierzu wurde bei 3000 rpm und 18 °C für 10 Minuten in einer Beckman GP Centrifuge zentrifugiert.

Das Algen-Pellet wurde einmal in f/2-Medium gewaschen und anschließend weiterverarbeitet. Die Messung der Zelldichte erfolgte indirekt über die Bestimmung des Chlorophyll *a*-Gehaltes nach der Methode von Jeffrey & Humphrey (1975), wobei 1 µg Chlorophyll *a* etwa  $2 \times 10^5$  Zellen von *G. theta* entsprechen (Hansmann & Eschbach, 1990). Für die kontinuierliche Kultur der Zellen wurden 100 ml Stammkultur (zwei Wochen alt) zu 900 ml frischem f/2-Medium gegeben.

*Chilomonas paramecium* EHRENBERG (Stammsammlung SAG 977–2a) wurde in *beef extract*-haltigen Medium (1g/l H<sub>2</sub>O) heterotroph angezogen.

## 2.2.2 Anzucht von *Pisum sativum*

Erbsen (*Pisum sativum*) der Sorte "Kleine Rheinländerin" wurden auf Vermikulit in einem 12 Stunden Licht/Dunkel-Rhythmus bei 20 °C (Licht) und 17 °C (Dunkel) kultiviert. Zur Isolierung der Chloroplasten wurden 10–12 Tage alte Pflanzen geerntet.

## 2.2.3 Generelle molekularbiologische Methoden

Grundlegende molekularbiologische Methoden wurden, wenn nicht explizit angegeben, nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

## 2.2.4 Nukleinsäure-Isolierung

### 2.2.4.1 Plasmidisolierung aus *E. coli*

Für die Plasmidisolierung aus den verwendeten *E. coli*-Stämmen wurde die Methode der *boiling preparation* (Holmes & Quigley, 1981) genutzt. Für Isolierung hochreiner Plasmid-DNA wurden Kits der Firma Qiagen (Hilden) nach Angaben der Hersteller verwendet.

### 2.2.4.2 Isolierung genomischer DNA aus *G. theta*

Die Präparation von DNA aus Cryptomonaden wurde nach der CTAB-Methode (Doyle & Doyle, 1990) durchgeführt. Gesamt-DNA-Präparationen wurden bei 4 °C aufbewahrt.

### 2.2.4.3 Isolierung von DNA aus rekombinanten Bakteriophagen

In einem 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden phagenkompetente *E. coli* XL1Blue MRF'-Zellen (siehe Kap.2.1.11) und Bakteriophagen (rekombinante  $\lambda$ ZAPII-DNA der cDNA-Bibliothek; Fraunholz, 1999) gemischt und 20 Minuten bei 37 °C vorinkubiert. Das optimale Verhältnis der Titer von Phagen und Zellen wurde empirisch ermittelt. Die infizierten Zellen wurden zu 5 ml LB in ein steriles Reagenzglas gegeben und unter Schütteln über Nacht angezogen. Rekombinante  $\lambda$ ZAPII-DNA wurde durch *in vitro*-Excision unter Verwendung des VCSM13 Helfer-Phagen nach Protokoll des Herstellers (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt.

### 2.2.4.4 Isolierung von Gesamt-RNA

Zur Isolierung von RNA aus *G. theta* wurde ein Liter Algen abzentrifugiert (Kap.2.2.1) und die Zellen in 1 ml RNA-Isolierungspuffer (Kap.2.1.2) resuspendiert. Pro Milliliter Isolierungspuffer wurden nacheinander 0,1 ml 2 M Natriumacetat, 1 ml wassergesättigtes Phenol (Roth) und 1 ml Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 v/v) zugegeben, jeweils gut gemischt und der Ansatz anschließend 15 Minuten auf Eis inkubiert. Zur Phasentrennung wurde 10 Minuten bei 10000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die organische Phase und die Interphase wurden verworfen, die wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Zugabe von einem Volumen Isopropanol präzipitiert. Das entstehende Pellet wurde in 0,3 ml RNA-Isolierungspuffer erneut gelöst und ein zweites Mal ausgefällt. Nach dem Waschen und Trocknen des Präzipitats wurde die RNA in 100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O gelöst. Die Qualität dieser Total-RNA-Präparationen erwies sich als ausreichend für RT-PCR Experimente (Kap.2.2.8).



## 2.2.5 Markierung von DNA

Die Markierung der Sonden erfolgte nach der *random priming* Methode von Feinberg und Vogelstein (1983, 1984) mit DIG-11-dUTP. Dazu wurden 4 µl 5 x *random priming*-Puffer (Kap.2.1.2), 200–500 ng Sonden-DNA und 1 µl randomisierte Hexanucleotide ( $A_{260}=1$ ) in einem Endvolumen von 17 µl gemischt, zwei Minuten bei 98 °C denaturiert und auf Raumtemperatur abgekühlt. Daraufhin wurden 2 µl 10 x DIG-*labelling mix* (Boehringer, Mannheim) und 2 U Klenow-Enzym zugegeben und 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Zum Entfernen nicht eingebauter Nucleotide wurde die DNA gefällt (Kap.2.2.3), gewaschen und in Wasser aufgenommen. Die Konzentration der Sonden-DNA in der Hybridisierungslösung wurde auf ca. 25 ng/ml eingestellt.

## 2.2.6 Hybridisierung von Nukleinsäuren

Das *screening* in der vorhandenen cDNA-Bibliothek (Fraunholz, 1999) erfolgte nach Sambrook et al. (1989). Plaque-Lifts auf Nylon-Membranen (Hybond N<sup>+</sup>, Amersham Pharmacia) wurden zur Detektion mit den Digoxigenin-markierten Sonden verwendet. Die Detektion von DNA auf Plaque-Lifts und auf Southern-Blots erfolgte nach folgendem Schema: Die Hybridisierung wurde über Nacht bei Sonden-spezifischer Temperatur von 55°C durchgeführt. Nach dem Abgiessen der Sondenflüssigkeit wurde durch zweimaliges Waschen mit 2 x SSC/0,1 % SDS nicht-gebundene Sonden-DNA entfernt. Die Digoxigenin-markierten Sonden wurden durch Alkalische Phosphatase-konjugierten *anti*-Digoxigenin F(ab)<sub>2</sub>-Fragmenten und dem Chemilumineszenzsubstrat CSPD nach dem von Boehringer (Mannheim) beschriebenen Protokoll auf Röntgenfilmen (Fuji) detektiert. Für die Wiederverwendung der Membranen wurde die Digoxigenin-markierte Sonden-DNA nach der Anweisung im "*DIG-Labelling and Detection Manual*" (Boehringer, Mannheim) durch Alkali-Behandlung (2 x 15 min bei 37 °C mit 0,2 N NaOH, 1 % SDS) entfernt. Die Membranen wurden anschliessend in 2 x SSC gewaschen, feucht in Haushaltsfolie eingeschweisst und aufbewahrt. Diese Membranen standen somit für erneute Detektionen zu Verfügung.

## 2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Polymerase-Kettenreaktion wurden Enzyme und zugehörige Puffersysteme von Amersham Pharmacia (Freiburg), Boehringer (Mannheim) oder Eppendorf Netheler-Hinz GmbH (Hamburg) verwendet. Die Bedingungen der PCR (*Annealing*-Temperaturen, Elongationszeiten und MgCl<sub>2</sub>-Konzentrationen) wurden nach Anforderungen der Primer, der eingesetzten DNA oder des erwarteten Amplifikats verändert.

Ein Standard PCR-Ansatz wurde in einem Endvolumen von 25 µl mit Endkonzentrationen von 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 x Reaktionspuffer, je 0,25 µM Primer und 1 U Taq-DNA-Polymerase durchgeführt. Von der jeweiligen Ausgangs-DNA wurde eine DNA-Menge von ca. 200 ng eingesetzt.

PCR-Produkte wurden aus Agarosegelen mittels DEAE-Membranen eluiert und in das Plasmid pGEM-T ligiert (Promega, Mannheim). Nach Transformation in kompetente *E. coli* MRF'-Zellen (siehe Kap.2.2.3) und anschliessender Isolierung der rekombinanten Plasmide (Kap. 2.2.4.1) wurden die Amplifikate sequenziert (siehe Kap.2.2.9).

## 2.2.8 Reverse-Transkriptase (RT)-PCR

Für die reverse Transkription wurde das Superscript RNaseH<sup>-</sup>-Enzym mit entsprechendem Puffersystem (GIBCO BRL, Eggenstein) nach Protokoll verwendet. Die Erststrangsynthese erfolgte in einem 10 µl Ansatz mit 0,25 µM des genspezifischen Oligonukleotids für 30 Minuten bei 42 °C. Nach Denaturierung der reversen

Transkriptase bei 95 °C für 2 Minuten wurden 5 µl des Erststrangsynthese-Ansatzes in einer PCR (Kap.2.2.7) mit den beiden genspezifischen Primern eingesetzt.

## 2.2.9 DNA-Sequenzierung

Klonierte DNA wurde mit dem "*Thermosequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing Kit with 7-deaza-dGTP*" der Firma Amersham Pharmacia (Freiburg) sequenziert. Dazu wurden für den LiCOR-Sequenzierautomaten (MWG, Ebersberg) IRD700- bzw. IRD800-markierte Sequenzierprimer verwendet, für ALFexpress (Amersham Pharmacia, Freiburg) wurden CY5-markierte Oligonucleotide benutzt. Standardmässig wurde pro Sequenzierreaktion 1 µg Plasmid-DNA (Kap.2.2.4.1) mit destilliertem Wasser auf ein Volumen von 21 µl verdünnt und mit 4 µl Sequenzierprimer (2,5 µM) versetzt. Je 6 µl dieses Gemisches wurden auf vier PCR-Gefäße verteilt, in denen je 2 µl der einzelnen Nukleotid-spezifischen Terminationslösungen vorgelegt waren. Die Reaktionslösungen wurden mit Öl überschichtet und 25 Zyklen aufeinanderfolgender Denaturierungs- (50 sec), Annealings- (50 sec) und Extensionsphasen (60 sec) unterzogen. Nach der Sequenzierreaktion wurde jedem PCR-Gefäß 4 µl eines formamidhaltigen Ladepuffers (*formamide loading dye*, Amersham Pharmacia) zugesetzt.

## 2.2.10 Analyse fluoreszenzmarkierter DNA-Stränge

Die Analyse der in Kap.2.2.9 erstellten Sequenzierreaktionen erfolgte auf dem LiCOR4200 nach den Herstellerangaben (MWG, Ebersberg). DNA-Fragmente, die auf dem ALFexpress-Sequenzierautomaten analysiert werden sollten, wurden über ein Long Ranger-Gel (FMC Bioproducts) ebenfalls nach Angaben des Herstellers analysiert. Der Betrieb der Sequenziermaschinen erfolgte nach den Anweisungen der Hersteller.

## 2.2.11 Einbetten der Algenzellen in Agarose

Zur Gewinnung hochmolekularer chromosomaler DNA durch Pulsfeld-Gelelektrophorese wurden die Zellen von *Guillardia theta* in *low-melting point*-Agarose (LMP-Agarose) eingebettet und anschließend mit Proteinase K behandelt (nach Eschbach et al., 1991). Für die Einbettung und DNA-Präparation wurden folgende, nicht in Kap.2.1.2 aufgeführte Lösungen benötigt:

Lösung 1: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0

100 mM Na<sub>2</sub>EDTA

100 mM NaCl

Lösung 2: 1% (w/v) LMP-Agarose

2 mg/ml Proteinase K in Lösung 1

Lösung 3: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0

400 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,0

1% (w/v) SLS

0,25 mg/ml Pronase

Lösung 4: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0

400 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8,0

1% (w/v) SLS

1 mg/ml Pronase

Lösung 5: 10 mM Tris/HCl, pH 8,0

400 mM Na<sub>2</sub>EDTA

Die Lösungen 3 und 4 wurden vor dem Gebrauch 30 Minuten bei 50 °C präinkubiert.

*G. theta* wurde gemäß Kap.2.2.1 geerntet, in Lösung 1 zu einer resultierenden Zelldichte von  $2 \times 10^8$ /ml resuspendiert und bei 37 °C sofort mit einem Volumen Lösung 2 gemischt. Aliquote Mengen von je 100 µl dieser Suspension wurden mit einer großporigen, abgerundeten Pipettenspitze in Gießformen (je 10 x 8 x 2 mm) verteilt und mindestens zehn Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, wobei die LMP–Agarose erstarrte. Diese sogenannten "Inserts" wurden nach dem Herauslösen aus der Gießform zehn Minuten bei 50 °C in Lösung 3 inkubiert. Daran schloss sich eine 48–stündige Inkubation in Lösung 4 an (50 °C), wobei die Lösung nach 24 Stunden erneuert wurde. Die Inserts wurden anschliessend in der Pulsfeld–Gelelektrophorese (siehe Kap.2.2.12) zur Separation der Nucleomorph Chromosomen weiterverwendet. Alternativ konnte die so präparierte, hochmolekulare DNA mehrere Wochen in Lösung 5 bei 4 °C aufbewahrt werden.

## 2.2.12 Pulsfeld–Gelelektrophorese (CHEF) der Nucleomorph–Chromosomen

Nachdem die Algen–Inserts (Kap.2.2.11) zweimal je 15 Minuten in 0,5 x TBE–Puffer äquilibriert worden waren, wurden sie in die Geltaschen eines 1 % (w/v) Agarosegels (0,5 x TBE) überführt und mit flüssiger LMP–Agarose fixiert. Anschliessend wurden die Nucleomorph–Chromosomen in 0,5 x TBE–Laufpuffer mittels CHEF–Elektrophorese (CHEF DRIII, BioRAD) aufgetrennt. Die im folgenden angegebenen Laufbedingungen erwiesen sich für die Trennung der drei Chromosomen als optimal (nach Eschbach et al., 1991). Die Elektrophorese wurde bei einer konstanten Laufpuffertemperatur von 14 °C, einem Winkel von 120° und bei einer Spannung von 5,4 V/cm in zwei Phasen durchgeführt. In der ersten Phase (25 Stunden) betrug die Pulsfrequenz konstant 15 sec, in der zweiten 17–stündigen Phase wurde ein Gradient der Pulsfrequenzen von 15 sec bis 6 sec gefahren.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel in 0,5 µg/ml Ethidiumbromidlösung 30 Minuten gefärbt, danach zur Kontrastierung für 30 min in demineralisiertem Wasser entfärbt und dokumentiert.

## 2.2.13 Southern–Transfer von hochmolekularen Nukleinsäuren

Elektrophoretisch separierte *Guillardia theta*–DNA wurde durch Southern–Transfer (Southern, 1975) auf positiven Nylon–Membranen immobilisiert. Dazu wurde die durch Pulsfeld–Gelelektrophorese aufgetrennte *G. theta* DNA (Kap.2.2.12) mit UV–Licht bestrahlt (240 nm, 30 sec), um Strangbrüche einzuführen. Die

weitere Behandlung der Agarosegele erfolgte nach Sambrook et al. (1989). Als Transferpuffer wurde 20 x SSC verwendet. Um die DNA an der Membran zu fixieren, wurden die Membranen eine Stunde bei 80 °C inkubiert.

## **2.2.14 Herstellung von Proteinrohextrakten**

Proteinrohextrakte aus allen in dieser Arbeit verwendeten Organismen wurde durch Resuspendieren pelletierter Zellen oder zerkleinerten Pflanzenmaterials in Proteinextraktionspuffer (Kap.2.1.2) durch zehnmütiges Kochen der Proben im Wasserbad hergestellt. Im Anschluss wurden die Extrakte bei 14000 rpm zentrifugiert, um unlösliche Bestandteile zu pelletieren. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -20 °C gelagert.

Für denaturierende SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (siehe Kap.2.2.15) wurden die Proben mit Ladepuffer (siehe Kap.2.1.2) versetzt und erneut im kochenden Wasserbad 10 Minuten inkubiert. Proteinmengen wurden photometrisch nach der Methode von Bradford bestimmt (Bradford, 1979) oder durch Bestimmung des Chlorophyllgehaltes abgeschätzt (siehe Kap.2.2.18).

## **2.2.15 Denaturierende Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)**

SDS-PAGE wurde nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt. Dabei wurde ein 0,5 mm dickes, diskontinuierliches Gel mit einem Trenn- (pH 8,8) und einem Sammelgel (pH 6,8) angefertigt (*Mighty-Small*-Apparatur, Höfer). Die Auflösung im Gel wurde durch die Prozentigkeit des Trenngel bestimmt (nach Ausubel et al., 1996).

Proben, die nach Kap.2.2.14 hergestellt wurden, sind vor Auftragung nochmals denaturiert worden (10 min, 80°C). Die SDS-PAGE wurde in 1 x SDS-Laufpuffer (siehe Kap.2.1.2) bei 20 mA Stromstärke im Sammelgel und 25 mA im Trenngel durchgeführt.

## **2.2.16 *Semidry-blotting* zum Transfer von Proteinen auf Membranen**

Zum Transfer von Proteinen aus SDS-Gelen (Kap.2.2.15) auf Nitrocellulose-Membranen (Schleicher & Schuell) wurde ein "Blot-Sandwich" luftblasenfrei zwischen den Graphitelektroden des Novablot-Semidry-Systems (LKB, Bromma) aufgebaut. Der Aufbau bestand aus drei Lagen in Transfer-Puffer (25 mM Tris-HCl, 20 % Methanol, 0,1 % SDS, pH 8,3) getränkten Whatman 3MM-Papieren, dem darauf plazierten Gel, der äquilibrierten Transfermembran und abschliessenden drei Lagen Transfer-Puffer getränkten Whatman-Papieres. Der Transfer erfolgte 1,5 Stunden bei 0,8 mA/cm<sup>2</sup> Membran. Nach dem Transfer wurden die Membranen luftgetrocknet und bis zur Weiterverwendung trocken bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Für die N-terminale Sequenzierung wurde Protein auf PVDF-Membranen (Millipore, Bedford, USA) geblottet und nach dem Blotten mehrfach in destilliertem Wasser gespült. Die Sequenzierung mittels Edman-Abbau erfolgte in der Universität Giessen durch Herrn Dr. D. Linder.

## **2.2.17 Detektion von Proteinen mittels spezifischer Antiseren**

Die Immunodetektion von auf Membranen immobilisierten Proteinen wurde mittels eines Kaninchen-Antiserums erreicht. Die Detektion des Antiserums erfolgte durch einen sekundären HRP-konjugierten monoklonalen Antikörper des *ECL-enhanced chemiluminescence*-Kits (Amersham Pharmacia, Freiburg) nach den Angaben des Herstellers.

## 2.2.18 Plastidenpräparationen

### 2.2.18.1 Isolierung von Plastiden aus *Pisum sativum*

Die Isolierung intakter Plastiden aus Erbsenpflanzen (*Pisum sativum*, Sorte "Kleine Rheinländerin") wurde in modifizierter Form nach Schindler et al. (1987) und Perry et al. (1991) durchgeführt. Nach Anzucht der Erbsen (siehe Kap.2.2.2) wurde das Blattgewebe mit Isolationsmedium in einen Küchenmixer (Braun) viermal je 2 Sekunden homogenisiert und anschliessend durch zwei Lagen Nylongaze filtriert. Das Filtrat wurde bei 2000 x g 1 min lang zentrifugiert und das Pellet in 1 ml Waschpuffer (1 x HMS) resuspendiert. Um intakte von zerstörten Plastiden in der Rohplastidenfraktion zu trennen, wurde 1 ml dieser Fraktion auf ein 40 %-iges Percoll-Kissen (9 ml) geschichtet und 5 min lang bei 2000 x g in einem Festwinkelrotor (SS34-Rotor, Sorvall) zentrifugiert. Zerstörte Plastiden lagen dem Kissen auf, wohingegen intakte Plastiden pelletierten. Das Pellet wurde in 1 x HMS-Puffer resuspendiert und erneut zentrifugiert (1 min, 2000 x g) und in einem kleinen Volumen 1 x HMS-Puffer (50–100 µl) aufgenommen.

Isolationsmedium:                    330 mM Sorbitol  
  
                                                 20 mM MOPS  
  
                                                 13 mM Tris  
  
                                                 3 mM MgCl<sub>2</sub>  
  
                                                 0,1 % BSA(v/v)

Waschpuffer (1 x HMS)            330 mM Sorbitol  
  
                                                 50 mM Hepes/KOH, pH 7,6  
  
                                                 3 mM MgCl<sub>2</sub>

Percoll-Kissen:                    40 % Percoll (v/v)  
  
                                                 40 % Aqua dest (v/v)  
  
                                                 20 % 5 x HMS

Zur Chlorophyllbestimmung wurden 5–10 µl Suspension mit 80 % Aceton auf 1 ml aufgefüllt und die Extinktion bei 652 und 750 nm gemessen. Die Chlorophyll-Konzentration (µg/µl) errechnet sich aus:  $(OD_{652} - OD_{750}) \times \text{Verdünnungsfaktor} / 36$ .

Anhand der Chlorophyllbestimmung wurde die erforderliche Menge an Chloroplasten für weitergehende Analysen eingesetzt (z.B. Importstudien).

### 2.2.18.2 Isolierung von Plastiden aus *Guillardia theta*

Die Isolierung von Plastiden aus *G. theta* wurde in modifizierter Form nach dem Protokoll zur Isolierung von Plastiden aus *Euglena gracilis* (Ortiz et al., 1980) durchgeführt. Dazu wurden zwei Liter Algen in einem GSA-Rotor bei 3000 rpm 10 min lang bei 18 °C zentrifugiert und das Pellet in 10 ml f/2-Medium resuspendiert und erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde in 10 ml KP-Puffer mit 0,01 g Proteinase K (Boehringer, Mannheim) aufgenommen und gut resuspendiert. Die Zellen wurden ca. 90 min bei Raumtemperatur geschwenkt und lichtmikroskopisch auf ihre Form und Schwimmfähigkeit überprüft. Die Algensuspension wurde mit 20 ml KP mit Proteasehemmer Pevabloc SC (Boehringer, Mannheim) nach Angaben des Herstellers versetzt. Nach erneuter Zentrifugation (2500 rpm, 5 Minuten, 10 °C) wurde das Pellet in 60 ml BM resuspendiert und die Zellen in einem Küchenmixer 30 sec auf Stufe 1 mechanisch aufgebrochen. Das Lysat wurde bei 1500 rpm 5 Minuten lang bei 10 °C zentrifugiert, um intakte Zellen zu pelletieren. Der Überstand wurde vorsichtig in ein neues, gekühltes Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4000 rpm 5 Minuten lang bei 10 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde nun in 0,5 ml GM vorsichtig resuspendiert und auf einen vorbereiteten, gekühlten 50 %/30 % Percollgradienten in SS34-Corexröhrchen geschichtet. Eine Zentrifugation (9500 rpm, 12 min, 10 °C) ließ intakte Plastiden an der Phasengrenze der beiden Percoll-Kissen bandieren. Diese Plastiden wurden vorsichtig abgenommen und mit 1 ml AM gemischt und bei 8500 rpm 5 min lang bei 10 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 0,5 ml AM resuspendiert und in einem erneuten Waschschrift (2000 rpm, 5 min, 10 °C) pelletiert. Die Plastiden wurden in einem geringen Volumen AM (50–100 µl) erneut resuspendiert.

KP (pH 7,0)	400 mM Sorbitol
	50 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
BM ( <i>Breaking</i> -Medium, pH 7,4)	250 mM Sorbitol
	20 mM HEPES
	0,4 mM Na <sub>2</sub> EDTA
GM (Gradientenmedium, pH 6,8)	5 mM β-Mercapto-Ethanol
	330 mM Sorbitol
	1 % (w/v) Ficoll
	5 mM HEPES
	2 µg/ml Polyvinylsulfat
	15 mM NaCl
AM (Aufnahmemedium, pH 8,4)	330 mM Sorbitol
	1 mM MgCl <sub>2</sub>
	2 mM Na <sub>2</sub> EDTA
	50 mM Tricin
5 x Gradienten-Mix (pH 8,4)	330 mM Sorbitol
	1 mM MgCl <sub>2</sub>

	2 mM Na <sub>2</sub> EDTA
	50 mM Tricin
	5 mM Glutathion
	1 % (w/v) PEG 6000
	0,1 % (w/v) BSA
30 % Percoll	5 ml Wasser
	2 ml 5 x Gradientenmix
	3 ml Percoll
50 % Percoll	3 ml Wasser
	2 ml 5 x Gradientenmix
	5 ml Percoll

Zur Chlorophyllbestimmung an Plastiden aus *G. theta* wurden 5 µl der Plastidenfraktion in 1 ml 80 % Aceton gegeben, gut gemischt und bei OD<sub>645</sub> und OD<sub>633</sub> gegen 80 % Aceton gemessen. Anhand der Formel  $(OD_{645} \times 202 + OD_{633} \times 80,2) \times 0,05$  ergibt sich der Chlorophyll *a* Gehalt in µg/ml.

## 2.2.19 Subfraktionierung von Plastiden

### 2.2.19.1 Präparationen der Thylakoide

#### 2.2.19.1.1 *Pisum sativum*–Thylakoide

Für die Präparation intakter Thylakoide wurden aus Erbsenpflanzen Chloroplasten isoliert (siehe Kap.2.2.18.1) und durch schonende Lyse (0,1 % (v/v) Triton X–100; 5 min auf Eis) die Hüllmembranen solubilisiert. Anschliessend erfolgte eine Dichtegradientenzentrifugation im Percoll–Kissen (40 % Percoll) analog der Plastidenisolierung aus *Pisum sativum* (siehe Kap.2.2.18.1). Nach 5 min bei 2000 x g wurden die pelletierten Thylakoide in 1 x HMS resuspendiert, zweimal in 1 x HMS gewaschen und für weitere Zwecke verwendet.

#### 2.2.19.1.2 *Guillardia theta*–Thylakoide

Zur Isolierung intakter Thylakoide aus *G. theta* wurden zwei Liter Algen abzentrifugiert (3000 rpm, 10 Minuten, 18 °C). Das Pellet wurde in 40 ml Puffer T1 aufgenommen und erneut zentrifugiert. Nach Resuspendierung in 20 ml Puffer T1 wurde die Zellsuspension in der French Press (American Instrument Company, Maryland, USA) bei 500 bar bei stetiger Eiskühlung aufgeschlossen. Nach zweimaliger Passage durch die French Press wurde der Rohextrakt 5 min lang bei 3000 rpm zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde erneut zentrifugiert, um die Membranen zu pelletieren (20000 rpm, 4 °C, 30 Minuten). Das Membranpellet wurde vorsichtig in Puffer T1 resuspendiert und nach einem erneuten Zentrifugationsschritt das Pellet in Puffer T2 aufgenommen.

T1 (pH 7,9)	300 mM Sorbitol
	50 mM Tris/HCl
	20 mM MgSO <sub>4</sub>

T2 (pH 7,3)	50 mM Tricin/NaOH
-------------	-------------------

### 2.2.19.2 Subfraktionierung der Thylakoidmembran

Die Präparation von Photosystem II (PS II) angereicherten Thylakoidmembranfragmenten (sogenannten BBY-Partikel) aus Spinat erfolgte nach dem Protokoll von Berthold, Babcock und Yocum (1981). Die weitere Subfraktionierung zur Herstellung von OG-Core-Komplexen und Dimer-Komplexen des PS II (DM-Partikel) wurde nach Dörner (1999) durchgeführt. Alle Präparationen wurden freundlicherweise von Dr. Lucia Iuzzolino und Dr. Wolfgang Dörner (AG PD. Dr. H. Dau, Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt.

### 2.2.20 Import von Präproteinen in transportkompetente Plastiden

#### 2.2.20.1 *In vitro* Transkription und Translation

Um markiertes Protein für die Importansätze zu erhalten, wurden die jeweiligen Klone in Kaninchen-Retikulozytenlysat ("*Coupled Reticulozyte Lysate*", Promega, Mannheim) in Gegenwart von 10 µCi [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-Methionin (1000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham Pharmacia, Freiburg) nach Protokoll *in vitro* transkribiert und translatiert. Der Ansatz wurde bei 30 °C für 90 min (T7 RNA-Polymerase) bzw. 120 min (SP6 RNA-Polymerase) inkubiert.

TNT <i>Reticulocyte lysate</i>	25 µl
TNT <i>reaction buffer</i>	2 µl
Aminosäure-Mix (ohne Met.)	1 µl
<sup>35</sup> S-Methionin (Kap.2.1.4)	2 µl
RNasin	1 µl
DNA <i>template</i> (1 µg)	x µl
RNA-Polymerase	1 µl
H <sub>2</sub> O (nukleasenfrei)	ad 50 µl

#### 2.2.20.2 Import in transportkompetente Plastiden

Für jedes Präprotein wurde ein Importansatz mit einem Gesamtvolumen von 400 µl auf Eis in der angegebenen Reihenfolge pipettiert:



H <sub>2</sub> O	204 – x µl
5 x HMS	80 µl
Importmix	76 µl
Protein	40 µl
Plastiden (entspr. 50 µg Chlorophyll)	x µl

Der Import in Erbsenplastiden erfolgte 30 min lang bei 25 °C. Bei *G. theta* Plastiden wurde die Zeitdauer des Proteintranslokation empirisch zu 10 min ermittelt. Der Import wurde durch Zentrifugation bei 1000 x g für 1 min gestoppt. Die pelletierten Plastiden wurden in 300 µl Waschmedium (1 x HMS) aufgenommen, auf Eis gesetzt und direkt weiterbehandelt.

Jeder Importansatz wurde nun in drei parallele Ansätze mit je 100 µl resuspendierten Plastiden aufgeteilt: Zwei der drei Ansätze wurden mit 1/10 Vol. Thermolysin (0,1 mg/ml Endkonzentration) auf Eis inkubiert. Einer dieser beiden Ansätze wurde zusätzlich mit 0,2 % Triton X-100 vorab solubilisiert. Der Thermolysinverdau wurde nach 10 Minuten durch die Zugabe von 1/5 Vol. 50 mM EDTA gestoppt.

Um vergleichbare Bedingungen zu gewährleisten, wird der verbleibende Ansatz unter gleichen Bedingungen mit 1/10 Vol. 10 mM CaCl<sub>2</sub> (ohne Thermolysin) inkubiert.

Durch eine erneute Zentrifugation in einem 40 % Percollkissen (5 min, 4500 x g) wurden intakte Plastiden pelletiert, in 50 µl 1 x HMS gewaschen und für 1 min bei 1000 x g erneut zentrifugiert. Das Pellet wurde im Anschluss nun gelelektrophoretisch analysiert (siehe Kap.2.2.20.3).

#### Import Mix:

100 mM ATP	30 µl
1 M Kaliumgluconat	30 µl
250 mM Methionin	60 µl
1 M Natriumhydrogencarbonat	15 µl
20 % (w/v) BSA	150 µl

#### 5 x HMS

Sorbitol	1,65 M
HEPES/KOH, pH 7,6	250 mM
MgCl <sub>2</sub>	15 mM

#### Thermolysin–Stammlösung

Thermolysin	1 mg/ml
CaCl <sub>2</sub>	10 mM

Stopplösung für den Thermolysinverdau

EDTA (pH 8,0)	50 mM
---------------	-------

### 2.2.20.3 Analyse des Imports

Die Importansätze wurden in Probenpuffer (siehe Kap.2.1.2) aufgenommen und 10 min im kochenden Wasserbad denaturiert. Eine anschließende Zentrifugation (10000 x g, 10 min) trennte die Membranen und unlösliche Bestandteile ab. Der Überstand wurde gelelektrophoretisch mit SDS-PAGE aufgetrennt (siehe Kap.2.2.15).

Nach dem Trocknen des Gels wurde ein Röntgenfilm (Fuji, Japan) bei Raumtemperatur exponiert.

### 2.2.21 Translation in Anwesenheit von Mikrosomen

Für den experimentellen Ansatz der Kotranslation an Membranen wurde der Klon in Retikulozytenlysat (TNT "*Coupled Reticulozyte Lysate*", Promega, Mannheim) in Anwesenheit von 10 µCi [ $\alpha$ -<sup>35</sup>S]-Methionin (1000 Ci/mmol, 10 mCi/ml, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) und Mikrosomen (Promega, Mannheim) nach dem Protokoll des Herstellers (30 °C, 60–90 min) transkribiert und translatiert. Die Menge an Membranen wurde empirisch zu 6u ermittelt. Zwei parallele Ansätze für die anschließende Proteolyse nach der Inkubation in An- und Abwesenheit eines Detergens (Triton X-100) wurden mitgeführt.

TNT <i>Reticulozyte lysate</i>	12,5 µl
TNT <i>reaction buffer</i>	2 µl
Aminosäure-Mix (ohne Methionin)	1 µl
<sup>35</sup> S-Methionin (Kap. 2.1.4)	2 µl
RNasin	1 µl
DNA <i>template</i> (1 µg)	x µl
Mikrosomen	y µl
RNA-Polymerase	1 µl
H <sub>2</sub> O (nukleasenfrei)	ad 25 µl

Nach der Inkubation wurde ein Parallel-Ansatz einer Proteolyse mit 1/10 Volumen Thermolysin (0,1 mg/ml in 10 mM CaCl<sub>2</sub>) unterzogen, um externes Protein zu verdauen. Nach 10 min Inkubation auf Eis wurde der Verdau durch Zugabe von 1/5 Volumen 50 mM EDTA gestoppt. Die Mikrosomen wurden bei 1000 x g für 1

min zentrifugiert und das Pellet in 1 x HMS resuspendiert und gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in einem geringen Volumen Probenpuffer aufgenommen und gelelektrophoretisch analysiert (siehe Kap.2.2.15).

## 2.2.22 Protein-Expression

Für die Proteinexpression wurde der Vektor pET28a (siehe Kap.2.1.10) verwendet. Das Konstrukt pRub-NMR wurde in kompetente *E.coli* BL21(DE3) Zellen transformiert (Sambrook et al., 1989). Nach Plasmidisolierung transformierter *E.coli* Zellen (siehe Kap.2.2.4.1) wurde das Konstrukt zur Überprüfung des Leserahmens sequenziert (siehe Kap.2.2.19).

Für die Expression wurde aus einer Übernachtskultur von *E.coli* BL21(DE3)/pRUB-NMR ein 20 ml Kolben LB-Medium mit Kanamycin (20 µg/ml Endkonzentration) im Verhältnis 1:100 inokuliert und das Wachstum im Spektralphotometer (Ultrospec II, Amersham Pharmacia) bei OD<sub>600</sub> verfolgt. Sobald die Kultur eine OD<sub>600</sub> von 0,6 erreicht hatte, wurde die Expression von *rub-nmr* mit 2 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Das Wachstum wurde weiter photometrisch verfolgt und zu bestimmten Zeiten wurden Aliquots entsprechend einer OD<sub>600</sub> steril entnommen und nach Abzentrifugieren (5 min, 5000 x g, 4 °C) in 60 µl Probenpuffer aufgenommen und gelelektrophoretisch analysiert (siehe Kap.2.2.15).

Die Reinigung des rekombinanten Proteins erfolgte durch Frau Dr. Silke Hoffmann am Lehrstuhl für Biopolymere der Universität Bayreuth (Prof. Dr. P. Rösch). Am gleichen Institut wurde auch die Proteinstruktur durch NMR bestimmt.

## 2.2.23 Herstellung eines Antiserums

Im institutseigenen Tierhaus wurde mit Hilfe von Herrn Lothar Kremp (AG Prof. Dr. K. Lingelbach) ein polyklonales Antiserum gegen gereinigtes rekombinantes Rubredoxin erzeugt. Dazu wurde 1 mg gereinigtes Rubredoxin mit 1 mg Adjuvans (Adju Prime Immuno Modulator, Pierce, Rodford, USA) gemischt, in 3 ml PBS gelöst und in 300 ml Aliquots bei -20°C weggefroren.

Das Antiserum wurde nach finaler Blutung des Kaninchens gewonnen.

## 2.2.24 Elektronenmikroskopische *in situ*-Lokalisation von Rubredoxin

*G. theta*-Zellen einer exponentiell wachsenden Kultur wurden durch 1 % Glutaraldehyd (Endkonzentration) in f/2 Medium fixiert und anschließend mit einer Ethanol-Reihe (30%, 50 %, 70 %, 96 %, 100 %) entwässert. Nach Imprägnierung mit einer 1:1 Mischung aus Lowicryl K4M/100 % Ethanol wurden die Zellen in Lowicryl K4M (Chemische Werke Lowi GmbH, Waldkraiburg) nach Angaben des Herstellers eingebettet. Ultradünnschnitte der Präparate wurden mit einem Ultracut-Mikrotom der Firma Reichert-Jung (Wien) angefertigt, auf Kupfer-Netze übertragen und einer Immunlokalisation mit Rubredoxin-Antiserum (1:200 in PBS eine Stunde) unterzogen. Die Konzentration des primären Immuserums wurde empirisch bestimmt. Für die Detektion des primären Antikörpers wurden 15 nm-goldmarkierte *anti*-Kaninchen-IgG Immunglobuline benutzt (Sigma, München; 1:60 verdünnt in PBS). Nach jedem Detektionsschritt wurde fünfmal mit PBS/0,1 % Triton X-100 gewaschen. Die so behandelten Ultradünnschnitte wurden schliesslich fünf Minuten mit gesättigter Uranylacetatlösung und mit Bleicitrat-Lösung nachkontrastiert und nach vollständigem Trocknen der Präparate mit einem Transmissions-Elektronenmikroskop EM301 der Firma Philips analysiert.

## 2.2.25 Spektroskopische Methoden

### **2.2.25.1 UV/Vis-Spektrum**

Absorptionsspektren wurden in einem Zweistrahl-Photometer (Uvikon 941, Kontron, Eching) aufgenommen. Die Messungen erfolgten in optisch gegeneinander abgeglichenen Quarzküvetten (micro, d = 1cm, Hellma, Mühlheim). Die Spektren wurden in einem Bereich von 240 nm bis 700 nm aufgenommen.

### **2.2.25.2 Elektronenspinresonanz-Messungen**

Für die Elektronenspinresonanz (EPR)-Messungen wurden die Geräte und die Software des Max-Planck-Institutes für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, unter der Anleitung von Herrn Dr. Evert Duin verwendet.

Probenvolumina von je 300 µl wurden unter anaeroben Bedingungen in ESR-Röhrchen aus hochreinem Quarzglas (707SQ mit 4 mm Außendurchmesser, Spintech, Remshalden) abgefüllt und bis zur Messung in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Die Parameter der Messung (Temperatur, Mikrowellenleistung, Zeitdauer) wurden in Anlehnung an bereits bekannte Messungen (Eidsness et al., 1999) eingestellt, wobei die Signalintensität empirisch für jede Probe ermittelt wurde.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Nucleomorph–kodierte plastidäre Proteine

Die komplexe Plastide der Cryptomonade *Guillardia theta* besitzt zwischen dem äußeren und inneren Membranpaar ein periplastidäres Kompartiment, das einen Restzellkern des eu–karyotischen Endosymbionten beherbergt, das Nucleomorph. Das Genomprojekt, dessen Ziel die komplette Entschlüsselung der Sequenz des Restgenoms des eukaryoten Endosymbionten in *Guillardia theta* ist, soll Aufschluss über die Bedeutung des Nucleomorphs und die Notwendigkeit der Aufrechterhaltung des periplastidären Kompartiments geben. Ein wesentlicher Grund für die Beibehaltung dieses eukaryoten Restcytosols und Genoms wurde in dessen Kodierung von Proteinen für essentielle plastidäre Funktionen vermutet.

#### 3.1.1 Einige Nucleomorph *Open reading frames* kodieren plastidäre Funktionen

Die drei Chromosomen des Nucleomorphs besitzen eine Kodierungskapazität von ca. 550 kb (Rensing et al., 1994). In der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. U.–G. Maier wurde hauptsächlich die Sequenzierung und Charakterisierung des Chromosoms II durchgeführt (Fraunholz, 1999; Zauner et al., 2000). Die komplette Entschlüsselung des 181 kb großen Chromosoms ergab eine Gesamtzahl von 149 *Open reading frames* (NmOrfs; Zauner, persönliche Mitteilung). Ein Schwerpunkt dieser Arbeit bestand in der Identifizierung und Charakterisierung von NmOrfs zur Aufrechterhaltung plastidärer Funktionen. Eine Sequenzanalyse mit Hilfe von Datenbanken (<http://niji.imb.nrc.ca/magpie/nucleomorph/private/>) und der CyanoBase (<http://www.kazusa.or.jp/cyanobase/>) wurde zum Vergleich mit dem ersten komplett sequenzierten photosynthetisch aktiven Organismus *Synechocystis* sp. PCC6803 (Kaneko et al., 1996) durchgeführt. Diese ergab die in Tab.3–1 aufgeführten *Nmorfs* des Chromosoms II des Nucleomorphs, die Homologien zu bereits bekannten plastidären Proteinen oder hypothetischen cyanobakteriellen Proteinen zeigen.

Insgesamt befinden sich auf dem Chromosom II des Nucleomorphs 16 Orfs mit Homologien zu plastidären Proteinen photosynthetisch aktiver Organismen (Tab.3–1), die somit 11 % aller *Nmorfs* auf Chromosom II darstellen.

Unter Berücksichtigung der Sequenz der Chromosomen I und III, die zum Ende dieser Arbeit ermittelt wurde (Zauner, persönliche Mitteilung), ergibt sich eine Gesamtzahl von 35 Orfs mit Homologien zu plastidären Proteinen (Tab.3–2).

**Tab. 3–1:** Tabelle der *orfs* auf Chromosom II des Nucleomorphs von *Guillardia theta*, deren Genprodukte Ähnlichkeiten zu cyanobakteriellen oder bekannten Genen mit plastidären Funktionen zeigen. Der mit \* markierte *orf* besitzt nicht über die ganze Länge des homologen *orfs* in *Synechocystis* Ähnlichkeiten.

	Gen	vermutliche Funktion	Homologe in <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803	Nachweis der Transkription	
Chromosom II	<i>cpn60</i>	molekulares Chaperone	sll0416	+	diese Arbeit, Wastl et al., 1999
	<i>ftsZ</i>	Plastidenteilung	sll1633	+	Fraunholz, 1999

	<i>rub</i> ( <i>orf159</i> )	redox-aktives Eisenprotein	slr2033	+	diese Arbeit
	<i>ycf48</i> ( <i>hcf136</i> )	Photosystem II Assemblierung	slr2034	+	diese Arbeit
	<i>orf323</i>	-unbekannt-	sll2002	+	diese Arbeit
	<i>cbbX</i>	Beteiligt an der Regulation der RubisCO	-	+	Maier et al., im Druck
	<i>orf163</i>	-unbekannt-	slr1470		
	<i>orf249</i>	-unbekannt-	sll1390		
	<i>orf227</i>	-unbekannt-	slr0565		
	<i>orf496</i>	-unbekannt-	slr1974		
	<i>dnaG</i>	DNA-Primase	sll1868		
	<i>gidA</i>	DNA-modifizierendes Enzym	sll0202	+	Zauner, persönliche Mitteilung
	<i>deaD</i>	RNA-Helicase	slr0083		
	<i>orf273*</i>	beta-transducin-like Protein (WD-repeat)	slr0143 (1191aa)		
	<i>iep110</i>	Komponente des Proteintranslocons der inneren Plastidenmembran	-		
	<i>secE</i>	Proteintranslocase	ssl3335		

**Tab. 3–2:** *orfs* der Nucleomorph Chromosomen I und III, deren Genprodukte Ähnlichkeiten zu cyanobakteriellen bzw. plastidären Proteinen zeigen. Die mit \* markierten *orfs* besitzen nicht über die gesamte Länge der Sequenz Ähnlichkeiten.

	<b>Gen</b>	<b>vermutliche Funktion</b>	<b>Homologe in <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803</b>
Chromosom I	<i>sigA</i>	Initiation prokaryoter Transkription	slr0653
	<i>gyrA</i>	Topoisomerase UE	sll1941
	<i>gyrB</i> *	Topoisomerase UE	sll2005
	<i>cysR</i>	periplasmatische Katalase	– (gi1361329) <i>Synechococcus</i> ; A56274
	<i>orf186</i>	Vanadium Chloroperoxidase	– (gi 2462069) <i>Anabaena</i> PCC7120
	<i>orf229</i>	–unbekannt–	slr1926
	<i>orf326</i> *	–unbekannt–	slr0076 ( <i>orf453</i> )
	<i>orfX</i> *	Kaliumkanal ( <i>orf365</i> )	sll0993
	<i>orf683</i> *	Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> –Antiporter	sll0689
	<i>orf222</i>	–unbekannt–	slr1649
	<i>tha4</i> *	Proteintranslokation an der Thylakoidmembran	ssl2823
	<i>ski2</i>	antivirales Protein	slr0451

	<i>rps15 (orf126)</i>	ribosomales Protein	sll1784
	<i>tic22</i>	Komponente des Proteintranslocons der inneren Plastidenmembran	slr0924
	<i>clpP</i>	Endopeptidase (proteolytische Untereinheit)	slr0164
	<i>cbp</i>	Carotin-bindendes Protein	ssl1633
Chromosom III	<i>orf598</i>	ATP-bindendes Protein für Zuckertransport	slr0747
	<i>orf346*</i>	periplastidäres Eisen-bindendes Protein	slr0513

Keiner der in Tab. 3–1 und Tab. 3–2 aufgeführten *Nmorfs* kodiert ein Enzym des plastidären Primärmetabolismus. Gleichfalls sind weder Strukturkomponenten des Photosyntheseapparates noch Funktionen des plastidären Energiemetabolismus auf den Nucleomorph Chromosomen kodiert. Eine Vielzahl der *NmOrfs* ist für Transportprozesse und DNA–Modifikation zuständig (siehe Abb. 4–2 in der Diskussion).

Einen weiteren interessanten Aspekt verdeutlichen *tic22* und *iep110* auf den Nucleomorph Chromosomen I und II: Die "Modell"–Proteintranslokationsmaschinerie (Toc/Tic) (siehe Einleitung) besteht aus bislang 16 identifizierten und charakterisierten Komponenten, wobei nur vier dieser Komponenten ein cyanobakterielles Homolog besitzen (Heins & Soll, 1998). Bei *NmTic22* handelt es sich um eine dieser vier mit einem Sequenzhomologen in *Synechocystis* (slr0924, CyanoBase, Kap.2.1.15).

Mit *Iep110* befindet sich auf dem Nucleomorph eine weitere Tic–Komponente kodiert. Diese besitzt jedoch kein cyanobakterielles Homolog. Mit *CbbX* ist ein stromalokalisiertes Protein auf Chromosom II kodiert, dass in der Regulation der RubisCO involviert ist (Maier et al., akzeptiert), und ebenfalls kein cyanobakterielles Pendant besitzt.

Mit der Identifizierung dieser *orfs* bestätigt sich die Hypothese, dass das Nucleomorph Proteine der Plastide kodiert. Für eine Auswahl der *Nmorfs* wurde der Nachweis der Transkription erbracht (siehe Tab. 3–1), indem in einer cDNA–Bibliothek von *Guillardia theta* (Fraunholz, 1999) nach den entsprechenden cDNAs gescreent wurde (Kap.2.2.6). Die Sequenzierung der rekombinanten Phagen ergab, dass auch die Nucleomorph–Transkripte polyadenyliert, aber nicht ediert werden.

### 3.1.2 Charakterisierung des Nucleomorph–kodierten Cpn60

Mit dem 1740 bp grossen *groEL*–Homolog *cpn60* wurde ein Mitglied der *hsp60*–Familie auf dem Restgenom des Endosymbionten in *G. theta* identifiziert (Wastl et al., 1999). Die Aufgabe der molekularen Chaperone besteht in der Überführung missgefalteter oder denaturierter Proteine in ihren nativen Zustand. *Cpn60* nimmt



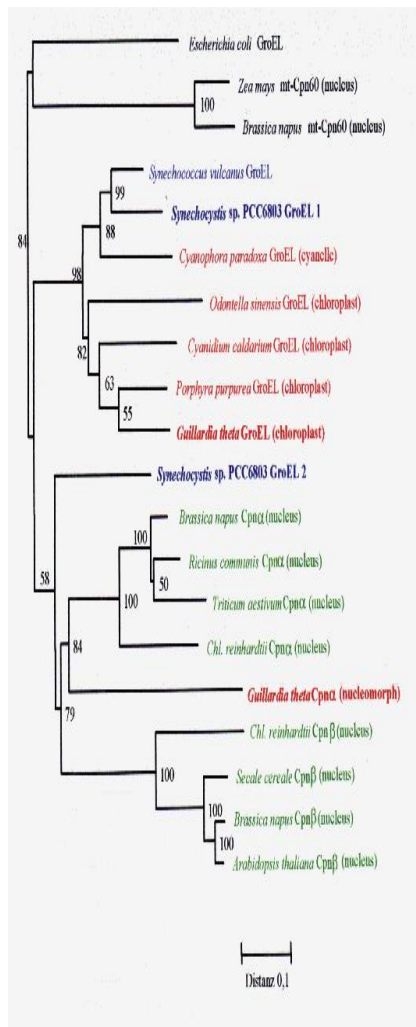
auch an der Faltung stromaler Proteine im Anschluss an deren Translokation an der *plastid envelope* teil, was dieses Mitglied der Hsp60-Chaperone zu einem Bestandteil der Importmaschinerie macht (Heins & Soll, 1998).

Die Nomenklatur der Chaperonine richtet sich nach deren chromosomalen Lokalisierung: Ist das Gen auf einem prokaryoten Genom lokalisiert, wird es als *groEL* bezeichnet. Wird es dagegen auf einem eukaryoten Genom kodiert, so wird die Bezeichnung *cpn60* gewählt.

Die Sequenzierung des Plastoms von *G. theta* (Douglas & Penny, 1999) zeigt, dass ein Plastom-lokalisierter *orf* ebenfalls Homologien zu cyanobakteriellen *groEL* (72 % Identität, 85 % Ähnlichkeit) aufweist. Dieser 1587 bp *orf* kodiert für ein 529 aa grosses Genprodukt, das als GroEL bezeichnet wird (AF041468).

### 3.1.2.1 Lokalisation von Cpn60 auf Nucleomorph-Chromosom II

Da zum Zeitpunkt der Arbeit die Chromosomen I und III nicht komplett sequenziert waren, war das Ziel dieses Experimentes zu zeigen, ob Cpn60 nur von Chromosom II kodiert wird. Dazu wurde eine Hybridisierung von in PFGE aufgetrennter *Guillardia theta* Gesamt-DNA (Kap.2.2.12) mit einer Digoxigenin markierten Sonde durchgeführt. Als Sonde wurde ein 0,6 kb *HindIII/SpeI* Fragmentes aus der zentralen Domäne von *cpn60* mit DIG-11-dUTP markiert und für die Hybridisierung eine Sondenkonzentration von ca. 25 ng/ml eingestellt (Kap.2.2.5). In Abb. 3-1 ist gezeigt, dass die Sonde ausschliesslich mit Chromosom II des Nucleomorphs hybridisiert. Daraus folgt, dass sich *cpn60* nur auf Chromosom II des Nucleomorphs befindet. Durch die komplette Sequenzierung des Nucleomorphs ist bestätigt worden, dass *cpn60* als *single copy* Gen auf Chromosom II vorliegt und keine weiteren *cpn60* Gene auf den Chromosomen I und III kodiert sind. Mit den Chromosomen des Zellkerns wurde kein Hybridisierungssignal detektiert, obwohl dort mindestens ein weiteres *cpn60*-Homolog zu erwarten ist, dessen Genprodukt als Chaperonin in den Mitochondrien für Proteinfaltung zuständig ist. Dass keine Hybridisierung mit den Kernchromosomen erfolgte, ist mit den unterschiedlichen Basenkompositionen von Nucleus zu Nucleomorph zu erklären. (77 % AT-Gehalt in der *single copy region* des Chromosom II, Zauner, persönliche Mitteilung).



**Abb. 3–1: Lokalisation des *cpn60*-Gens auf Nucleomorph Chromosom II in *Guillardia theta*.** Die Trennung der genomischen DNA erfolgte mittels PFGE. Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurde die DNA auf Nylon-Membran transferiert. Die Hybridisierungsbedingungen sind in Kap. 2.2.6 beschrieben. Spur 1 zeigt die Auftrennung von *G. theta* Gesamt DNA im Pulsfeldgel (Kap.2.2.12). Spur 2 zeigt das Hybridisierungssignal der *cpn60*-Sonde (0,6kb internes *HindIII/SpeI* Fragment) mit Chromosom II. (Nu: Nucleuschromosomen; Nm: Nucleomorph-chromosomen; P: Plastide)

Mit der Rückhybridisierung konnte damit die Lokalisation des *cpn60*-Gens auf dem Nucleomorph-Chromosom II eindeutig gezeigt werden. Die Transkription wurde durch die Identifizierung einer entsprechenden cDNA nach *screening* einer *Guillardia theta* cDNA-Bibliothek (Fraunholz, 1999) bestätigt. Mit dem *cpn60*-internen *HindIII/SpeI*-Fragment (siehe oben) als Digoxigenin markierte Sonde wurden rekombinante Phagen isoliert (siehe Kap.2.2.6). Die Charakterisierung eines Phagen mittels Sequenzierung ergab ein 2067 bp langes, polyadenyliertes Transkript. Eine Edierung des Transkriptes wurde nicht festgestellt.

### 3.1.2.2 Phylogenie des Cpn60 Proteins

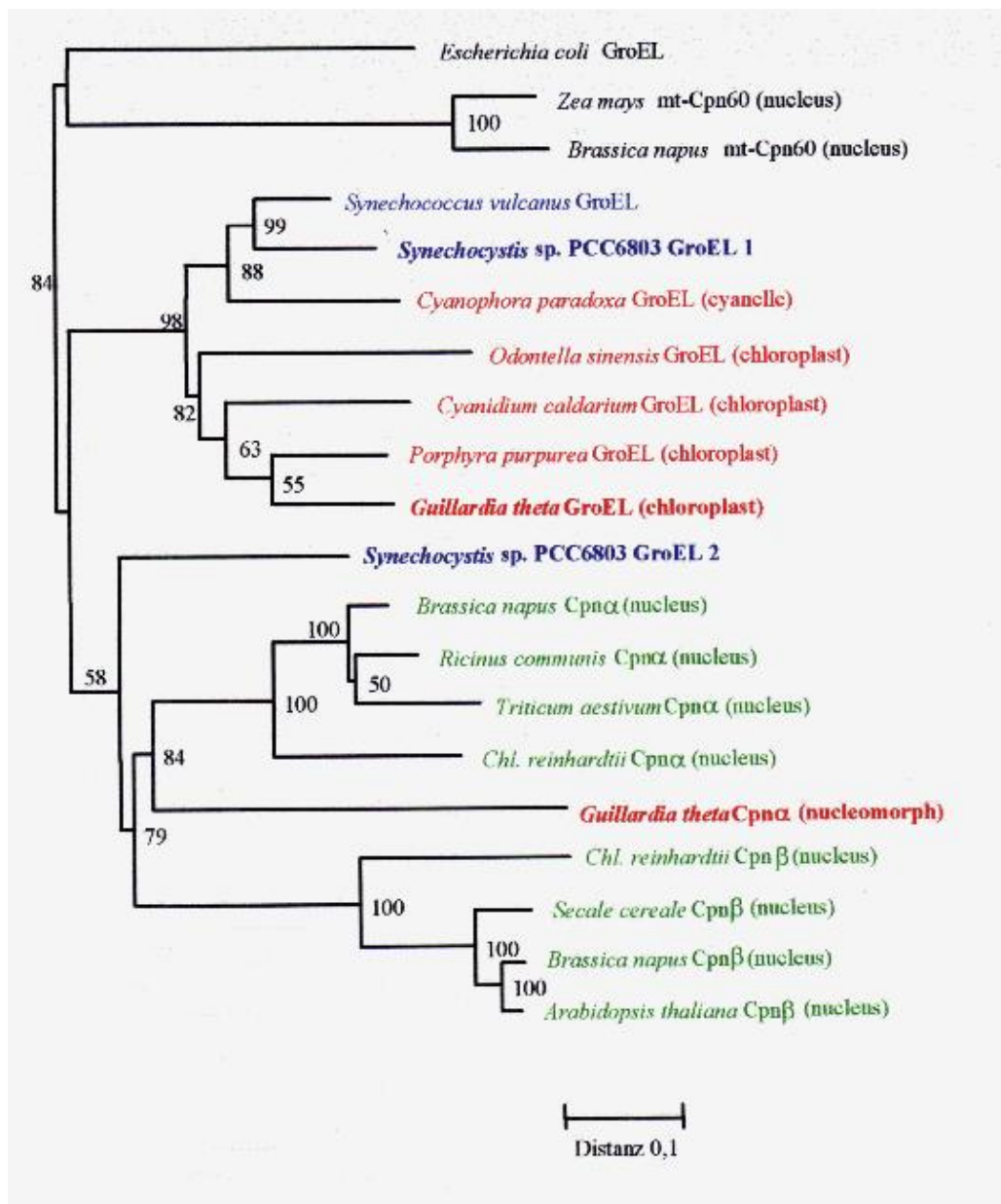
Ein Vergleich der Aminosäuresequenz von Cpn60 mit den Datenbanken mit dem Suchalgorithmus BlastX (Altschul et al., 1997) ergaben eine Homologie des NmCpn60 zu cyanobakteriellem Hsp60 Protein (*Synechocystis* sp. PCC69803; BAA10240; 53 % Identität; 76 % Ähnlichkeit). Mit dem Plastom-kodierten GroEL und dem Nucleomorph-kodierten Cpn60 existieren somit zwei Chaperonine in *G. theta*, die zu cyanobakteriellem GroEL homolog sind.

Eine Erklärung für zwei Hsp60–Chaperone in *G. theta* findet sich anhand der Sequenzanalyse des vollständig sequenzierten Chromosoms von *Synechocystis* sp. PCC6803: Dieses kodiert ebenfalls zwei *groEL*–Gene, die sich sowohl in Genstruktur als auch in der Regulation unterscheiden. So existieren sowohl ein lichtreguliertes, in einem bicistronischen Operon (mit *groES*) vorliegendes *groEL*–Genprodukt (Lehel et al., 1993; im folgenden als GroEL1 bezeichnet) als auch ein monocistronisches, konstitutiv exprimiertes GroEL–Homolog (GroEL2; Chitnis & Nelson, 1991). Um Aussagen bezüglich der Phylogenie der beiden Hsp60 Homologen in *G. theta* zu machen, wurde ein Stammbaum anhand eines Aminosäurealignments ausgewählter Cpn60 und GroEL Chaperone berechnet. Mit ClustalX (Jeanmougin et al., 1998) wurde dazu ein Alignment von 382 Aminosäuren erstellt und mit dem Programm Phylip (Felsenstein, 1989) mit 100 *bootstraps* ein *neighbour–joining–tree* erstellt (siehe Kap.2.1.15). Dieser ist in Abb. 3–2 dargestellt.

Diese Stammbaumanalyse unterstützt eindeutig die Zuordnung des *G. theta* Cpn60 zu dem GroEL2 von *Synechocystis*. Zudem gruppieren alle in die Berechnung mit eingegangenen Cpn60 Proteine aus Grünalgen und höheren Pflanzen mit GroEL2, wobei eine Zweiteilung in Cpn60 $\alpha$  und Cpn60 $\beta$  ersichtlich ist. NmCpn60 gruppiert mit den Cpn60 $\alpha$  (Abb. 3–2).

Das aus der Sequenzierung des *G. theta* Plastidengenoms bekannte zweite GroEL–Homolog gruppiert mit dem cyanobakteriellen Pendant GroEL1. Sequenzierungsprojekte an Plastomen ergaben, dass neben *G. theta* weitere Plastome der Chlorophyll *a/c*–Linie sich durch den Besitz eines *groEL*–Gens auszeichnen (Hallick et al., 1993; Kowallik et al., 1995; Reith & Munholland, 1995). Auch diese gruppieren zusammen mit *G. theta* GroEL und dem GroEL1 aus *Synechocystis*.

Zusätzlich wurden zwei Kern–kodierte mitochondrial–lokalisierte Cpn60 aus Pflanzen in die Stammbauberechnung mit einbezogen. Anhand der Daten des Stammbaumes ist jedoch auszuschliessen, dass es sich bei NmCpn60 um eine Isoform eines Mitochondrial–lokalisierten Hsp60–Chaperons des Endosymbionten handelt.



**Abb. 3–2: Neighbor joining–tree für plastidär lokalisierte Hsp60–Chaperone (Wastl et al., 1999).** Für die Berechnung des Stammbaums wurde ein Aminosäurealignment von 382 Aminosäuren verwendet. Kern–kodierte Homologe werden als Cpn60, Plastom– und Prokaryot–kodierte als GroEL bezeichnet. GroEL aus *E.coli* und zwei Kern–kodierte mitochondrial–lokalisierte Cpn60 aus höheren Pflanzen (mt–Cpn60) wurden mit einberechnet. Alle Plastom–kodierte GroEL gruppieren mit GroEL1 aus *Synechocystis* sp. PCC6803, alle Kern–kodierte plastidären Cpn60 mit GroEL2 aus *Synechocystis* sp. PCC6803. Nucleomorph–kodierte Cpn60 gruppieren mit den Cpn $\alpha$  der Chlorophyll *a/b* Linie. Diese besitzen kein Plastom–kodierte GroEL, dafür eine Zweiteilung der Cpn60 Proteine in eine  $\alpha$ – und  $\beta$ –Gruppe, was auf Genduplikationsereignis in der Chl. *a/b* Linie hinweist. Plastidär lokalisierte Hsp60 Proteine sind wie folgt markiert: Cyanobakterielle GroEL (blau); Hsp60–Chaperone der Chl.*a/c*–Phycobilisom Linie (rot); Cpn60 aus Chl. *a/b*–haltigen Organismen (grün); In der Klammer ist der Kodierungsort angegeben.

Die Existenz zweier Hsp60–Homologe in *G. theta* ist ein Indiz dafür, dass beide in ihrer Funktion als Chaperon für die Aufrechterhaltung der Plastide von essentieller Bedeutung sind.

In der Chl. *a/b*–Linie sind bislang keine Plastom–kodierte GroEL–Proteine bekannt, dafür existieren zwei Nucleus–kodierte Cpn60–Gruppen (Abb. 3–2). Diese lassen sich in Cpn $\alpha$  und Cpn $\beta$  Proteine einteilen, was auf ein Genduplikationsereignis in der Chl. *a/b* Linie zurückzuführen ist.

Die Homologien zu cyanobakteriellem GroEL lassen vermuten, dass für das Nucleomorph–kodierte Cpn60 das Stroma der Plastide von *G. theta* den Bestimmungsort darstellt. Der Sequenzvergleich von NmCpn60 mit

GroEL2 aus *Synechocystis* sp. PCC6803 zeigt, dass NmCpn60 eine N-terminale Extension besitzt (Wastl et al., 1999). Suchalgorithmen (PSORT, ChloroP, siehe Kap.2.1.15) zur Vorhersage von Transitpeptiden erkennen diese jedoch nicht als topogenes Signal für den Transport über die Plastidenmembranen. Dennoch zeigt die 33 Aminosäuren lange Extension des NmCpn60 typische Eigenschaften von Transitpeptiden, wie zum Beispiel den Gehalt an positiv geladenen Aminosäuren (Arginin, Lysin), der eine positive Nettoladung bewirkt, und phosphorylierbare Aminosäuren (Serin, Threonin). Diese Eigenschaften sind auch den bisher bekannten Transitpeptiden höherer Pflanzen und Grünalgen zu eigen.

Im folgenden soll deshalb der N-terminale Aminosäurebereich der auf dem Nucleomorph kodierten Proteine mit Homologien zu plastidär lokalisierten Proteinen beziehungsweise mit cyanobakteriellen Proteinen (siehe Tab. 3-1 und Tab. 3-2) näher untersucht werden.

### 3.1.3 Nucleomorph-kodierte Plastidenproteine besitzen eine N-terminale Extension

Aus Untersuchungen zum Import von Proteinen in Plastiden ist bekannt, dass die im Cytosol synthetisierten Vorläuferproteine, die sogenannten Präproteine, N-terminal eine Extension von einer Länge von ca. 25-120 Aminosäuren besitzen (von Heijne et al., 1991). Diese dirigieren die für die Plastide bestimmten Proteine an die Translokationsmaschinerie der Chloroplasten und initiieren die Translokation der Präproteine über die beiden Membranen der Plastide, der sogenannten *plastid envelope*.

Ein Vergleich der N-Termini von Proteinen mit deren cyanobakteriellen Homologen zeigt, dass diese Nucleomorph-kodierten Proteine ebenfalls eine ca. 20 bis 60 Aminosäure lange N-terminale Extension besitzen. Mit den bisher bekannten Transitpeptiden, zumeist die von Präproteinen aus Grünalgen und Landpflanzen, ergeben sich im Bezug auf die N-Termini keinerlei konservierte Bereiche.

Aus Rotalgengenomen, die mit dem Nucleomorphgenom aus *G. theta* einen gemeinsamen Vorfahren haben (Douglas et al., 1991, Maier et al., 1991; Van de Peer et al., 1996), sind nur wenige Daten im Bezug auf Transitpeptide (im Vergleich zu Grünalgen und höheren Pflanzen) vorhanden. Im einem Sequenzvergleich (Abb.3-3) sind die N-terminalen Extensionen von PsbU aus der Rotalge *Cyanidium caldarium* (Ohta et al., 1999) und verschiedene NmOrfs aufgeführt, die Homologien zu cyanobakteriellen Proteinen bzw. plastidären Proteinen besitzen.

Orf323	MLFVFNHLFYP <b>TR</b> -KVCNNVCLN <b>KNRNKT</b> FKFSKQRKIINLK
Cpn60	MTLLFVNNW <b>SLNKS</b> SKST <b>MNLKY</b> KNK <b>KLNTK</b> MAKKVVF
Rub	MFVNNLLIDCRFV <b>KNT</b> CHF <b>KVNKKF</b> NLIQVH <b>SSNL</b> SDEEK <b>SSR</b> IDEILRL <b>KNAE</b> KFMEID
SigA	MFFN-LLID <b>SKFT</b> ISNN <b>SIP</b> FFFGN <b>SKHR</b> CIH <b>KNLVIY</b> KKNIHISLL <b>KIET</b> KQLDEE
Ycf48	MFINSFCLKNLLPVF <b>SKNKT</b> FLLNV <b>KCLSN</b> KNFENHSNFF <b>KINRT</b> KFINYL
Orf496	MFIN <b>VT</b> VLNHLN <b>KIK</b> INKDLILD <b>KITH</b> NFF <b>TKK</b> HYLNSL <b>KCKD</b> STVY <b>NFN</b> DY <b>QMR</b> IP
Tic22	MLFINLL <b>KSNL</b> NNQGAN <b>FLKIS</b> NP <b>KKKIQ</b> HI-KKNV <b>NFS</b> REDRFRV <b>LNK</b> KNLYKLLFLAL
CbbX	MLAFIS <b>NYIT</b> FK <b>TNR</b> TY <b>KNNI</b> CQLHCQ <b>SL</b> NDNDIE <b>ARKI</b> KEEA <b>ERRK</b> Q <b>QAER</b> NRM
DnaG	MFIS <b>YHN</b> INY <b>FKKN</b> KQLNYFDHQ <b>YFNFR</b> CK <b>GK</b> LN <b>YFF</b> KEN <b>YK</b> T <b>ATF</b> C <b>NY</b> K <b>QDL</b> IK <b>IE</b> N <b>FK</b>
PsbU	MMAFIS <b>T</b> PL <b>GK</b> VT <b>VK</b> SA <b>TV</b> SA <b>NR</b> RR <b>GL</b> RM <b>Q</b> SD <b>SE</b> P <b>VV</b> S <b>RR</b> ALL <b>S</b> GALAAAV

Abb. 3-3: Sequenzvergleich der N-Termini von Nucleomorph-kodierten Proteinen. Eine Auswahl der aus Tab. 3-1 und Tab. 3-2 aufgeführten NmOrfs mit Ähnlichkeiten zu cyanobakteriellen Proteinen bzw. Proteinen, deren plastidäre Lokalisation nachgewiesen ist. Ein gemeinsames Motiv am N-Terminus ist mit einem Kasten markiert. Blau gekennzeichnet sind die phosphorylierbaren Aminosäuren; rot markiert die basischen Aminosäuren im C-terminalen Bereich der N-terminalen Extensionen.

Die Aminosäurezusammensetzung der Peptide zeigt, dass die N-Termini Nucleomorph-kodierter potentieller plastidärer Präproteine Ähnlichkeiten zueinander besitzen. So zeichnet sich der Beginn der Aminosäureabfolge durch den Besitz mindestens einer aromatischer Aminosäuren (Phenylalanin) aus, der

eine hydrophobe Aminosäuren (Isoleucin, Valin, Phenylalanin) folgt. Im Anschluss daran befinden sich phosphorylierbare Aminosäuren. Sowohl der zentrale Bereich der Extension als auch der C-terminale Bereich fällt durch die Häufung der basischen/positiven Aminosäuren Arginin und Lysin auf. Dies steht im Gegensatz zu Transitpeptiden der Grünalgen, die nur im zentralen Bereich sich durch positiven Aminosäuren auszeichnen (Schatz & Dobberstein, 1996).

Damit existieren zwei Kriterien, die ein potentielles Nucleomorph-kodiertes plastidenlokalisiertes Protein, kennzeichnen:

- a) die Homologie zu bekannten cyanobakteriellen Proteinen
- b) die zusätzliche N-terminale Extension (im Gegensatz zu cyanobakteriellen Homologen)

Wie die Existenz von Tic22, Iep110 und CbbX zeigt (Tab. 3-1 und Tab. 3-2), die keine cyanobakteriellen Homologen besitzen, müssen nicht beide Kriterien erfüllt sein, um ein Nucleomorph-kodierte plastidäre Funktion zu identifizieren. Eukaryote Genome kodieren für plastidäre Funktionen, die nicht cyanobakteriellen Ursprungs sind, so zum Beispiel viele Komponenten der Translocons (siehe Einleitung).

Um die plastidäre Lokalisation Nucleomorph-kodierter Proteine nachzuweisen, sind unterschiedliche Ansätze zur proteinbiochemischen Charakterisierung notwendig. Im folgenden wird anhand von Proteintranslokationsstudien die Funktion der N-terminalen Extension eines NmOrfs untersucht.

## 3.2 Import Nucleomorph-kodierter Proteine in Plastiden

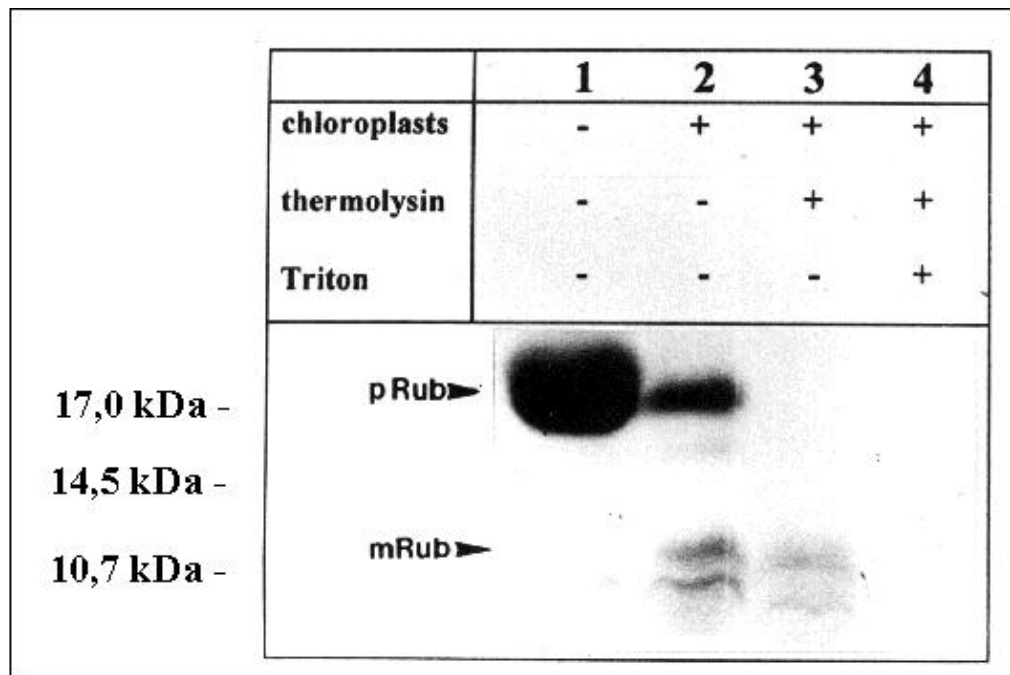
Die Isolierung transportkompetenter Plastiden ist grundlegende Voraussetzung für Translokationsstudien mit Präproteinen. Das bislang am besten charakterisierte System stellt das aus *Pisum sativum* dar. Dabei konnte sowohl mit Kern-kodierten Proteinen aus dem Nucleus der Erbse selbst (z.B. Lübeck et al., 1997) als auch mit Proteinen anderer Pflanzen die Funktion des Transitpeptides anhand der Translokation über die *plastid envelope* gezeigt werden (z.B. Bonk et al., 1997). Definitionsgemäß stellen für Erbsen-Präproteine die Erbsenplastiden das homologe System dar. Die Verwendung von Erbsenchloroplasten zum Import von Präproteinen anderer Organismen werden demnach als heterologes System bezeichnet. Diese Definition für homologes/heterologes System wird im folgenden beibehalten.

### 3.2.1 Heterologer Import in isolierte Erbsenplastiden

Mit Hilfe transportkompetenter Erbsenchloroplasten wurde überprüft, ob Nucleomorph-kodierte potentielle Plastidenproteine als Präproteine synthetisiert werden und deren N-terminale Extension als Transitpeptid fungiert. Exemplarisch wurde der 159 aa lange Orf auf Chromosom II für Importstudien verwendet, der Homologien (44 % Identität; 60 % Ähnlichkeit) zu einem hypothetischen Protein in *Synechocystis* (slr2033; CyanoBase) und zu Rubredoxinen anderer Prokaryoten besitzt. Daher wird dieser Orf als Rubredoxin bezeichnet. Die Transkription des *rub*-Gens wurde durch die Isolierung einer 575 bp langen, polyadenylierten cDNA verifiziert (Tab.3-1). Die Sequenz der cDNA zeigt, dass 5'-stromaufwärts der konservierten Domäne zwei alternative Startcodons existieren. Das erste ermöglicht eine Translation eines Präproteins mit einer 56 Aminosäuren langen N-terminalen Extension.

Mit den beiden Primern *rub5* und *rub3* (Kap.2.1.9) konnte in einer PCR (94 °C, 50 sec; 55 °C, 50 sec; 72 °C, 30 sec, 25 Zyklen) der 477 bp lange *orf* amplifiziert werden. Durch die Klonierung des PCR-Produktes in pGEM-T wurde *rub* unter die Kontrolle des T7-Promotors gestellt und durch Sequenzierung das Leseraster überprüft (Kap.2.2.9). In einer gekoppelten in vitro Transkription und Translation wurde nun das Gen exprimiert und das Genprodukt in Anwesenheit von <sup>35</sup>S-Methionin in Retikulozytenlysat translatiert (Kap.2.2.20.1).

Das markierte Präprotein wurde im heterologen System zum *in vitro* Proteintransport wie folgt eingesetzt: Nach Isolierung der Erbsenchloroplasten und der Chlorophyllbestimmung (Kap.2.2.18.1) wurde die Menge an Chloroplasten, die 50 µg Chlorophyll entsprach, in einem Importansatz zusammen mit dem Rubredoxin-Präprotein 30 min inkubiert (Kap.2.2.20.2). In zwei parallelen Ansätzen wurden die Importkontrollen zur Proteolyse mit Thermolysin in Ab- und Anwesenheit von einem Detergenz mitgeführt. Nach den in Kapitel 2.2.20.2 aufgeführten Importbedingungen wurden die Proteine der jeweiligen Importansätze mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und das Acrylamidgel getrocknet. Die Abbildung 3-4 zeigt die Autoradiographie des getrockneten Gels.



**Abb. 3-4: Heterologer Import von *G. theta* Rubredoxin in isolierte Erbsenplastiden.** Gezeigt ist die Autoradiographie nach SDS-PAGE (17 % Trenngel). Nucleomorph-kodiertes Rubredoxin (pRub) wurde mit <sup>35</sup>S-Methionin markiert und mit isolierten Chloroplasten aus *Pisum sativum* (Kap.2.2.18.1) 30 min inkubiert (Kap.2.2.20.2). Spur 1 zeigt das Translationsprodukt pRub (mit Pfeil markiert) mit einer molekularen Masse von ca. 18 kDa. Spur 2 zeigt das Proteinprofil der <sup>35</sup>S-Methionin markierten Proteine nach Importbedingungen. Spur 3 und Spur 4 zeigen das Proteinprofil zu gleichen Bedingungen wie Spur 2, nach zusätzlicher Thermolysinbehandlung in Abwesenheit (Spur 3) und Anwesenheit von Triton X-100 (Spur 4) zur Solubilisierung der Membranen. pRub bezeichnet das Präprotein, mRub das reife Protein, das um ca. 7 kDa kürzer ist als das Präprotein pRub.

Wie aus der Abb. 3-4 hervorgeht, ist nach Zugabe von Chloroplasten in Spur 2 eine zusätzliche Bande markierten Proteins mit einem Molekulargewicht von ca. 11 kDa detektierbar. Im Vergleich zu dem Präprotein mit einer molekularen Masse von 18 kDa ist eine Verkürzung um ca. 7 kDa ersichtlich, die durch die Prozessierung des Vorläuferproteins zu erklären ist. Nach Proteolyse der Chloroplasten ist kein Präprotein mehr, aber das 11 kDa grosse Protein detektierbar (Abb. 3-4, Spur 3). Das Präprotein erweist sich somit Protease-sensitiv, das kleinere Protein dagegen Protease-resistent, was auf dessen stromale Lokalisation schließen lässt. Die Kontrolle mit zusätzlicher Detergenzbehandlung der Chloroplasten nach Importbedingungen zeigte, dass unter diesen Bedingungen (solubilierte Membranen) auch das reife Nucleomorph-kodierte Protein proteolytisch verdaut wird.

Damit ist gezeigt, dass im heterologen System der Erbsenchloroplasten Rubredoxin in eine prozessierte Form überführt werden kann, die gegen proteolytischen Verdau der Plastiden insensitive ist. Das Präprotein verfügt also über ein topogenes Signal, das im heterologen System eine Translokation an den Plastidenmembranen bewirkt.

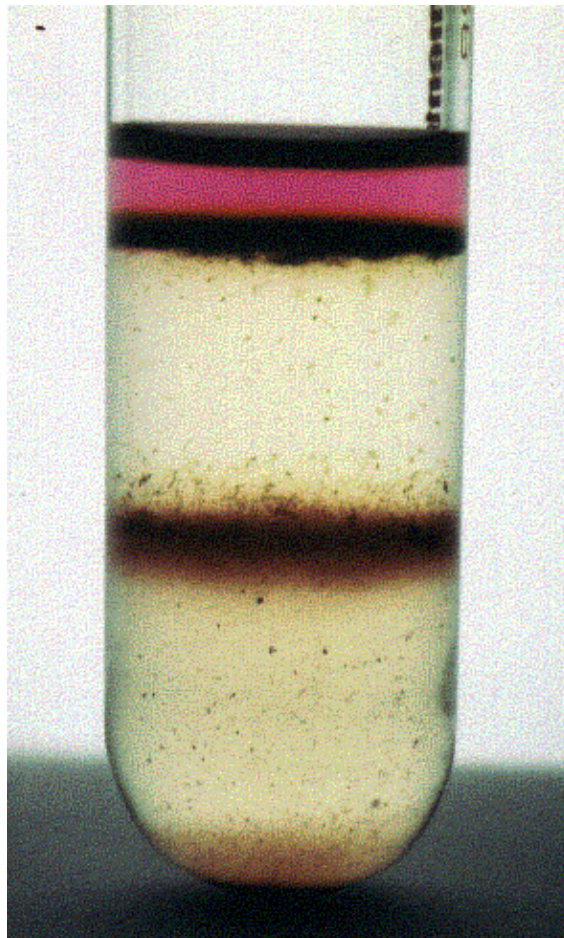


Es stellt sich nun die Frage, ob sich der Import plastidärer Proteine in *G. theta* auch im homologen System nachvollziehen lässt.

### 3.2.2 Homologer Import eines Nucleomorph-kodierten Präproteins in transportkompetente *Guillardia theta* Plastiden

#### 3.2.2.1 Isolierung importkompetenter *Guillardia theta* Plastiden

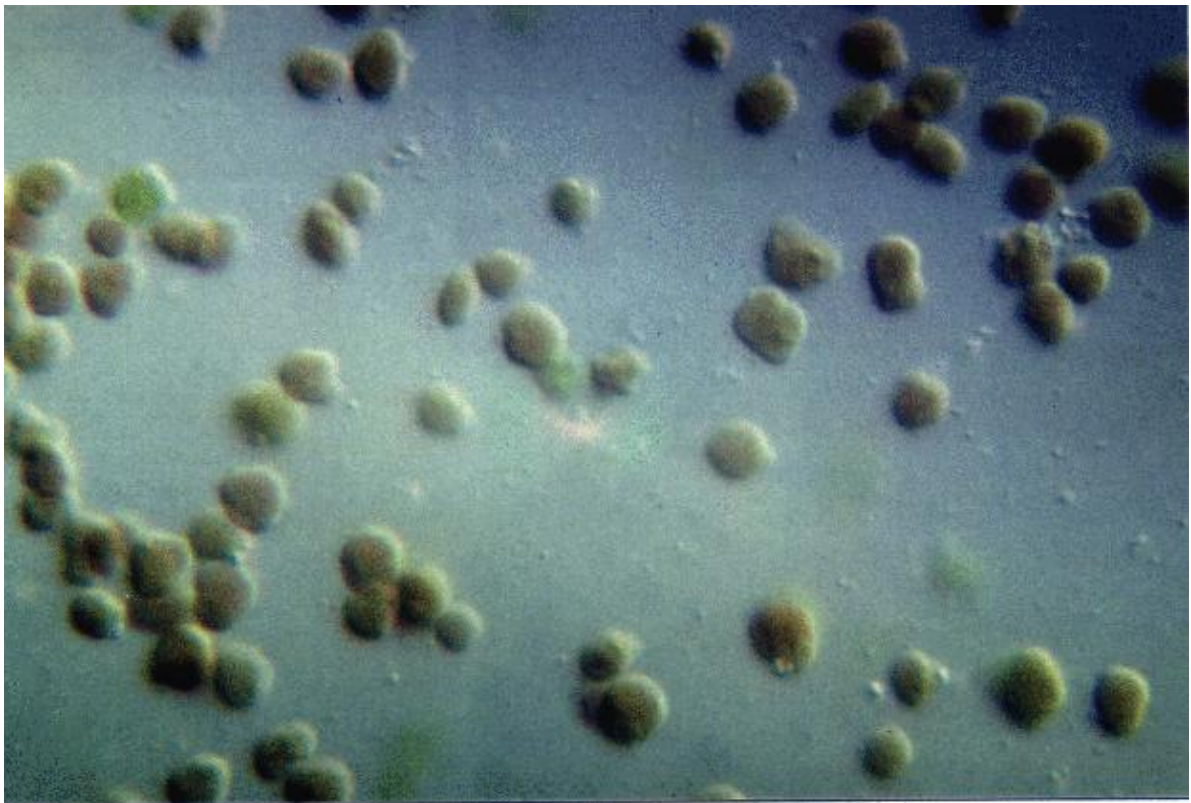
Für die Isolierung transportkompetenter Zwei-Membran-Plastiden aus *G. theta* wurde ein modifiziertes Protokoll verwendet, das die Isolierung von physiologisch aktiven *Euglena gracilis* Plastiden beschreibt (Ortiz et al., 1980). Dabei wurden die zuvor proteolytisch behandelten *G. theta* Zellen nach mechanischem Aufschluss differentiell zentrifugiert: Zur Abtrennung intakter Zellen vom Rohextrakt wurde dieser bei 1500 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde im Anschluss bei 4000 x g zentrifugiert und das Pellet in Gradientenmedium (Kap.2.2.18.2) resuspendiert. Diese Rohplastidenfraktion wurde nun in einem Percoll-Dichtegradienten aufgetrennt. Dabei bandierte die Fraktion mit den intakten Plastiden, die an ihrer roten Färbung zu erkennen waren, an der Phasengrenze zwischen dem 50 %-igen und 30 %-igen Percollkissen. Zerstörte Plastiden (grün) und lösliche cytosolische Bestandteile lagen dem 30 %-igen Percollkissen auf. Die Abbildung 3-5 zeigt den Percollgradienten nach der Zentrifugation.





**Abb. 3–5: Percoll-Dichtegradient zur Anreicherung von *G. theta* Plastiden.** Nach Zellaufschluss und differentieller Zentrifugation wurde eine Rohplastidenfraktion auf einen 50 %-30 %-Percollgradienten geschichtet und zentrifugiert. An der Phasengrenze der beiden Percollkissen bandieren intakte Plastiden (rot), wohingegen zerstörte Plastiden dem 30 % Percollkissen aufliegen.

Die Fraktion der intakten Plastiden wurde abgenommen und zweimal in AM-Puffer (siehe Kap.2.2.18.2) gewaschen. Isolierte Zwei-Membran-Plastiden aus der komplexen Plastide von *G. theta* wurden elektronenmikroskopisch (ohne Abb.) und lichtmikroskopisch überprüft. Die isolierte Plastidenfraktion enthielt lediglich von zwei Membranen umgebene Plastiden. Eine Isolierung von Vier-Membran-Plastiden aus *G. theta* (intakte komplexe Plastiden) ist aufgrund des Kontinuums der äussersten Membran mit der Kernhülle nicht möglich. Abb. 3–6 zeigt die lichtmikroskopische Aufnahme von isolierten Plastiden nach differentieller Percoll-Dichtegradientenzentrifugation .



**Abb. 3–6: Lichtmikroskopische Aufnahme von isolierten *G. theta* Plastiden.** Nach differentieller Dichtegradientenzentrifugation wurden die isolierten Plastiden bei 400 facher Vergrößerung im Interferenzkontrast auf morphologische Intaktheit untersucht.

Die isolierten Zwei-Membran Plastiden sind morphologisch intakt. Es gilt nun zu prüfen, ob diese Fraktion auch importkompetent ist, d.h. in der Lage ist, in *in vitro* Experimenten Nucleomorph-kodiertes Präprotein in das Stroma der Plastide zu transportieren.

### 3.2.2.2 Importstudien mit Rubredoxin im homologen System

Für Importexperimente an Zwei-Membran-Plastiden aus *G. theta* wurde, wie bereits im heterologen System (siehe Kap.3.2.1), das Nucleomorph-kodierte Rubredoxin verwendet. Zusätzlich wurde ein Konstrukt erstellt,

dessen abgeleitete Aminosäuresequenz N-terminal um 56 Aminosäuren verkürzt war. Der deletierte Bereich stellt die N-terminale Extension dar, die keine Homologie zu dem hypothetischen Rubredoxin aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 besitzt. Die Abbildung 3–7 zeigt schematisch die abgeleiteten Aminosäuresequenzen der Konstrukte, die für die Importstudien im homologen System verwendet wurden.

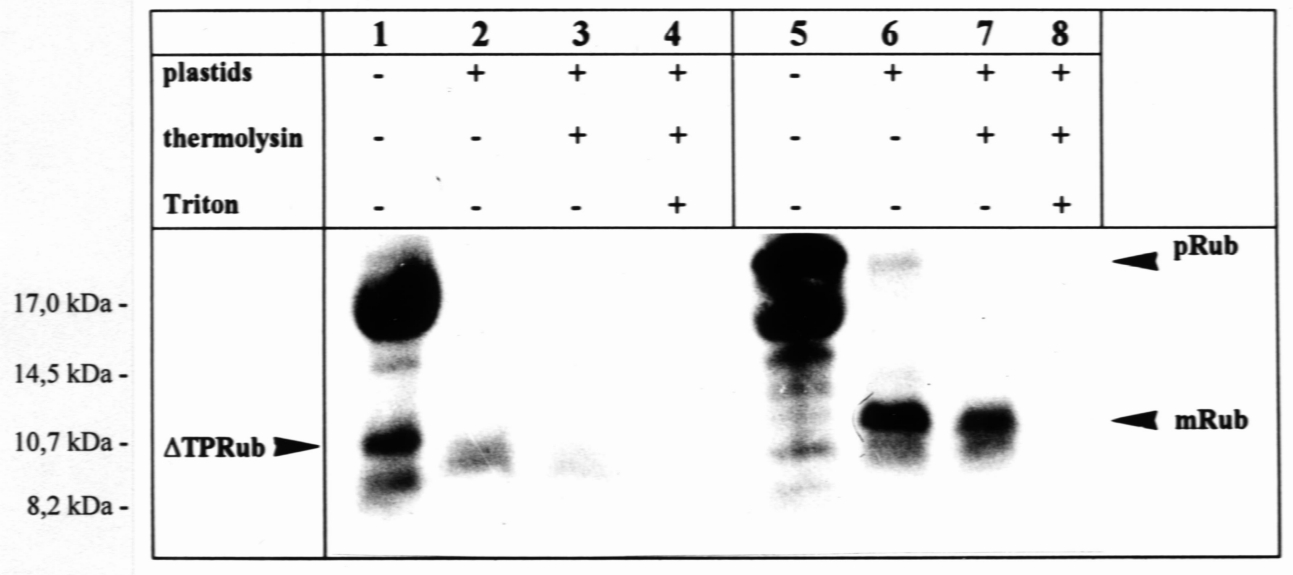
Zur Erstellung des Konstruktes wurde mittels PCR (94 °C, 50 sec; 54 °C, 50 sec; 72 °C; 30 sec; 25 Zyklen; siehe Kap.2.2.7) und den Primern *rub5*-2 und *rub3* (siehe Kap.2.1.9) der 209 bp grosse *orf* amplifiziert. Nach Klonierung des PCR-Produktes in pGEM-T (pΔTPRUB) war der *orf103* unter die Kontrolle des T7-Promotors gestellt und das Leseraster mittels Sequenzierung bestätigt.



**Abb. 3–7: Rubredoxin-Konstrukte.** Schematisch dargestellt sind die aus der jeweilig kodierenden Sequenz abgeleiteten Proteine. pRUB stellt das *full length* Konstrukt dar; pΔTPRUB ist am 5'-Ende um die kodierende Sequenz für die ersten 55 Aminosäuren verkürzt. pRUB-NMR ist das Konstrukt für die Expression der zentralen Domäne; dabei wurde neben der 5'-kodierenden Region für die N-terminale Extension auch die kodierende Sequenz für die C-terminale Domäne des Proteins durch Einfügen eines Stopcodons an der Position L127 entfernt (siehe Kap. 3.3.2)

Die beiden Konstrukte pRUB und pΔTPRUB wurden unter Verwendung des gleichen Protokolls wie in Kap.3.2.1 in einem Retikulozytenlysat in Anwesenheit von <sup>35</sup>S-Methionin *in vitro* transkribiert und translatiert. Markierte Präproteine wurden mit *G. theta* Plastiden unter gleichen physiologischen Bedingungen inkubiert, wie sie zum Import im heterologen System verwendet wurden (Kap.2.2.20.2). Lediglich die Zeitspanne, in der der homologe Transport mit isolierten *G. theta* Plastiden durchgeführt wurde, ist in diesem Experiment auf 10 min begrenzt worden. Wurde der Import in *G. theta* Plastiden zu zeitlich identischen Bedingungen durchgeführt, d. h. 30 min Inkubation der Plastiden mit Präprotein, konnte zwar reifes Protein, aber kein 18 kDa Präprotein nach SDS-PAGE und Autoradiographie detektiert werden, was auf das homologe System zurückzuführen ist (ohne Abb.).

Die Abb. 3–8 zeigt die Autoradiographie einer SDS-PAGE (17,5 %) mit den Proteinprofilen vor und nach Import der beiden Translationsprodukte (pRub und pΔTPRub) in *G. theta* Plastiden.



**Abb. 3–8: Homologer Import in isolierte *G. theta* Plastiden.** *In vitro* transkribiertes und translatiertes Präprotein von Nm-kodiertem *orf159* (pRUB) und einem Konstrukt ohne kodierende Sequenz für die N-terminale Extension (pΔTPRUB) wurden mit isolierten *G. theta* Plastiden (Kap.2.2.18.2) 10 min zu gleichen Bedingungen wie im heterologen System inkubiert (Kap.2.2.20.2). Die Autoradiographie nach SDS-PAGE (17,5 % Trenngel) zeigt in den Spuren 1 und 5 die Translationsprodukte ΔTPRub und pRub (mit Pfeilen markiert) und in den Spuren 2 und 6 das Proteinprofil nach Inkubation mit *G. theta* Plastiden. Spuren 3 und 7 zeigen die Proteinprofile isolierter Plastiden nach Thermolysinbehandlung. Spuren 4 und 8 zeigen den Kontrollverdau mit Thermolysin nach Solubilisierung der Membranen mit Triton X-100 (Kap.2.2.20.2). mRub zeigt das ca. 11 kDa grosse importierte, vor Proteolyse geschützte Protein nach Prozessierung in den *G. theta* Plastiden. Die Bande bei ca. 17 kDa stellt <sup>35</sup>S-markiertes Globin des Retikulozytenlysates dar (Spur 1; Spur 5), das weder an die Plastiden bindet noch importiert wird.

In Anwesenheit von transportkompetenten *G. theta* Plastiden zeigt die Autoradiographie nach SDS-PAGE neben dem 18 kDa grossen Präprotein des *full-length* Rubredoxins (pRub) eine weitere Bande bei ca. 11 kDa (Spur 6). Diese ist vor Thermolysinbehandlung geschützt (Spur 7). Dieses Protein entspricht in der Grösse der prozessierten Form des gleichen Proteins nach Import in Erbsenchloroplasten (siehe Kap.3.2.1; Abb. 3–4). Damit ist gezeigt, dass Nucleomorph-kodiertes Rubredoxin ein topogenes Signal besitzt, das sowohl eine Translokation in Erbsenchloroplasten als auch in *G. theta* Plastiden ermöglicht. Dass dieses topogene Signal am N-Terminus des Präproteins von Rubredoxin liegt, verdeutlicht die Importstudie mit dem N-terminal verkürzten Rubredoxin (pΔTPRub) in *G. theta* Plastiden (Abb. 3–8). Das *in vitro* Translationsprodukt mit einer molekularen Masse von ca. 11 kDa wird nicht importiert (Spur 2, Abb. 3–8).

Das zusätzliche <sup>35</sup>S-markierte Protein mit einer molekularen Masse von 17 kDa stellt *in vitro* transkribiertes und translatiertes Globin des Kaninchenretikulozytenlysates dar. Dieses Protein bindet nicht an die Plastiden und wird auch nicht transloziert und prozessiert, was in einem Kontrollansatz ohne Rubredoxinkonstrukte unter Importbedingungen getestet wurde (ohne Abb.).

Die Ergebnisse des Imports von Rubredoxin sowohl im heterologen als auch homologen System zeigen zudem, dass das Präprotein in beiden Plastidentypen zu gleich grossen, reifen Proteinen prozessiert wird.

Mit der Isolierung transportkompetenter Plastiden und der Etablierung des Importsystems zur Untersuchung der Translokation *G. theta* kodierter plastidärer Proteine wurde erstmals ein homologes System der Chlorophyll *a/c*-Linie entwickelt, das nicht wie etablierten Systeme Erbse und Spinat der Entwicklungslinie Chl. *a/b*-haltiger Pflanzen angehört.

### **3.3 Der NmOrf159 kodiert ein funktionelles Rubredoxin**

#### **3.3.1 Die Aminosäuresequenz von Rubredoxin zeigt im Vergleich zu den eubakteriellen Rubredoxinen eine N–terminale und eine C–terminale Extension**

Die zentrale Domäne des NmOrf159 ist hoch konserviert und wurde in den bislang charakterisierten Rubredoxinen als Eisenbindungsdomäne identifiziert. So sind 4 Eisen–chelatierende Cysteine und der Abstand der einzelnen Cysteine zueinander identisch. Deshalb wird der Nucleomorph–kodierte Orf159 zur Familie der Rubredoxine gezählt.

Im Verlaufe dieser Arbeit wurden in Datenbanken Einträge von *Arabidopsis thaliana* (AAD25628) und *Glycine max* (AI938789) hinterlegt, die ebenfalls Sequenzhomologie zu Rubredoxinen zeigen.

Ein Alignment des *G. theta* Rubredoxins mit den Homologen aus *Arabidopsis thaliana*, cyanobakteriellen und weiteren eubakteriellen Rubredoxinen zeigt, dass die beiden auf einem eukaryoten Genom kodierten im Gegensatz zu allen eubakteriellen Rubredoxinen jeweils eine N–terminale Extension besitzen (Abb. 3–9). Diese Domäne wurde im Falle von *G. theta* Rubredoxin in den vorangegangenen Kapiteln eindeutig als Transitpeptid charakterisiert.



Eine Membraninsertion des C-Terminus von Rubredoxin lässt für die subzelluläre Lokalisation des plastidären Proteins verschiedene Möglichkeiten zu:

- a) Insertion in der äusseren Plastidenmembran mit der Eisen-bindenden Domäne im Intermembranraum oder in das Cytoplasma orientiert
- b) Insertion in der inneren Membran mit aktiver Domäne im Intermembranraum oder Stroma
- c) Insertion in der Thylakoidmembran mit Orientierung der konservierten Eisen-bindenden Domäne im Stroma oder im Thylakoidlumen.

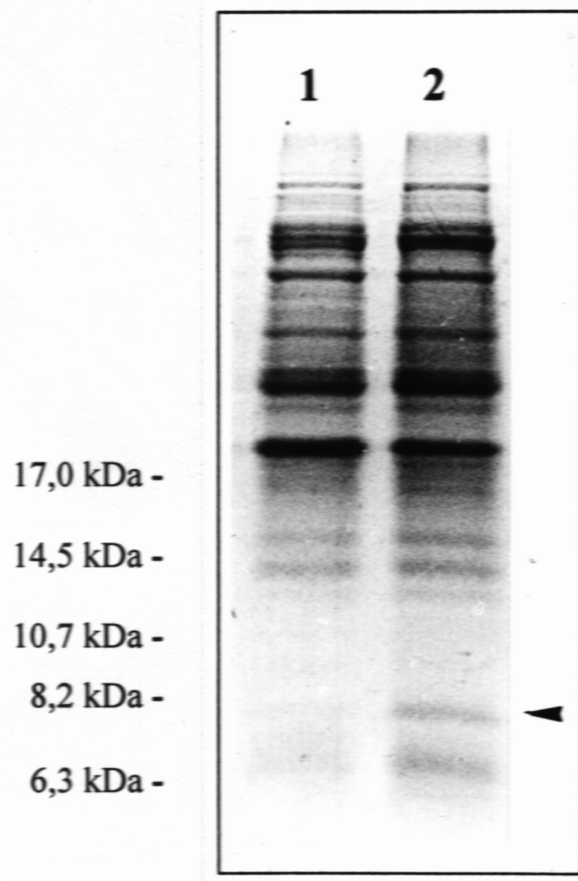
Immunologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen sollen die genaue subzelluläre Lokalisation von *G. theta* Rubredoxin klären. Dazu wurde rekombinantes Rubredoxin in *E. coli* exprimiert, gereinigt und zur Produktion eines Serums mit polyklonalen Antikörpern gegen rekombinantes Rubredoxin eingesetzt.

### 3.3.2 Expression rekombinanten Rubredoxins und Gewinnung eines polyklonalen Antiserums

Für die Expression von Rubredoxin in *E. coli* wurde ein rekombinantes Plasmid hergestellt. Dazu wurde *rub* an seinem 5'-Ende um die kodierende Sequenz für das Transitpeptid und am 3'-Ende um die der hydrophoben Domäne verkürzt (siehe Abb. 3–7). Die Auswahl dieses Bereiches für die Expression ohne die Extensionen lag darin begründet, die Aggregation des rekombinanten Proteins bei der Reinigung zu vermeiden und einer möglichen Unlöslichkeit des Proteins vorzubeugen. Zudem sollte die Expression eines Bereiches, der geringfügig länger ist als die katalytischen Domäne bisher bekannter Rubredoxine, die Reinigung nach etablierten Protokollen erleichtern.

Mit den Primern *rubNMR5* (siehe Kap.2.1.9), der eine 5'- gelegene *NcoI* Schnittstelle für eine gerichtete Klonierung in den Expressionsvektor pET28a (siehe Kap.2.1.10) besitzt, und *rubNMR3* (siehe Kap.2.1.9), das zusätzlich zu einer *Bpu1102I* Schnittstelle ein *Ochre-Codon* (TAA) anstelle des *Codons* für die Aminosäure Leucin in Position 127 im PCR-Produkt eingefügt hat, wurde ein 210 bp *orf*, der von M56 bis G126 des kompletten Rubrdoxins kodiert, mit Hilfe der PCR amplifiziert (siehe Kap.2.2.7). Die gerichtete Klonierung in den *NcoI/Bpu1102I* geöffneten pET28a-Vektor ergab das rekombinante Plasmid pRUB-NMR (siehe Abb. 3–7), dessen Insert mittels Sequenzierung auf den richtigen Leserahmen überprüft wurde.

Das Plasmid pRUB-NMR wurde in den Expressionsstamm *E.coli* BL21(DE3) transformiert (siehe Kap.2.2.3). Die Expression wurde durch Zugabe von 2 mM IPTG bei einer OD<sub>600</sub> von 0,6 induziert und über den Zeitraum von 4 Stunden verfolgt (siehe Kap.2.2.22). Wie aus Abb. 3–10 hervorgeht, wird nach Zugabe von IPTG die Expression eines Protein mit einer molekularen Masse von ca. 8 kDa induziert. Diese entspricht der molekularen Masse der aus der Nukleotidsequenz abgeleiteten Primärstruktur (70 Aminosäuren) des Inserts im Konstrukt pRUB-NMR.



**Abb. 3–10: Expression von rekombinanten Rubredoxin.** Der Expressionsstamm *E.coli* BL21(DE3)/pRUB–NMR wurde bei einer  $OD_{600}$  von 0,6 mit 2 mM IPTG (Endkonzentration) induziert. Rohextrakte (entsprechend 1 OD) wurden zum Zeitpunkt  $t=0$  Stunden (Spur 1) und 4 Stunden (Spur 2) präpariert und gelelektrophoretisch (15 % SDS–PAGE) analysiert. In Spur 2 ist die Expression eines ca. 8 kDa grossen Proteins nach Induktion sichtbar (Pfeil). Die Molekulare Masse entspricht der abgeleiteten Masse des 70 Aminosäuren kodierenden Konstruktes pRUB–NMR.

Die Reinigung des rekombinanten Rubredoxins erfolgte in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Silke Hoffmann am Lehrstuhl für Biopolymere der Universität Bayreuth analog zu bisherigen Protokollen zur Reinigung von Rubredoxinen aus Eubakterien (Wastl et al., eingereicht).

Zur eindeutigen Identifizierung des gereinigten Proteins als rekombinantes *G. theta* Rubredoxin wurde die N–terminale Aminosäuresequenz bestimmt. Dazu wurde gereinigtes Rubredoxin nach SDS–PAGE (15 % Trenngel) auf eine PVDF–Membran gebliedert (siehe Kap.2.2.16) und das Protein von Herrn Dr. D. Linder (Proteinanalytik, Universität Giessen) mittels Edman–Abbau ansequenziert. Die ermittelten 14 N–terminalen Aminosäuren stimmten mit der von der Nukleotidsequenz abgeleiteten Primärstruktur des Inserts im Konstrukt pRUB–NMR überein. Damit wurde die Expression und Reinigung rekombinanten Rubredoxins bestätigt.

Zur Generierung eines Antiserums mit polyklonalen Antikörpern gegen *G. theta* Rubredoxin wurde 1 mg des gereinigten Proteins eingesetzt. Dieses wurde zusammen mit 1 mg Immuno–Adjuvans (siehe Kap.2.2.23) in 3 ml PBS gelöst, zu je 300  $\mu$ l aliquotiert und einem Kaninchen subcutan injiziert (Herr Lothar Kremp, Abteilung für Parasitologie, Prof. Dr. K. Lingelbach, Philipps–Universität Marburg). Nach der Gewinnung des Antiserums durch finale Blutung und Zentrifugation wurde es auf seine Reaktivität mit gereinigtem rekombinanten *G. theta* Rubredoxin getestet. Rubredoxin wurde nach SDS–PAGE auf Nitrocellulosemembran transferiert (siehe Kap.2.2.16) und mit Antiserum inkubiert (siehe Kap.2.2.17). Die Detektion des primären Antiserums wurde mit Hilfe eines HRP–konjugierten Zweitantikörpers in einer ECL Detektion bestimmt (siehe Kap.2.2.17). Damit wurde die optimale Verdünnungsstufe des Antiserums zu 1:250 in 1 x PBS ermittelt (ohne Abb.). Eine unspezifische Kreuzreaktion des Zweitantikörpers mit rekombinantem Rubredoxin wurde nicht detektiert.

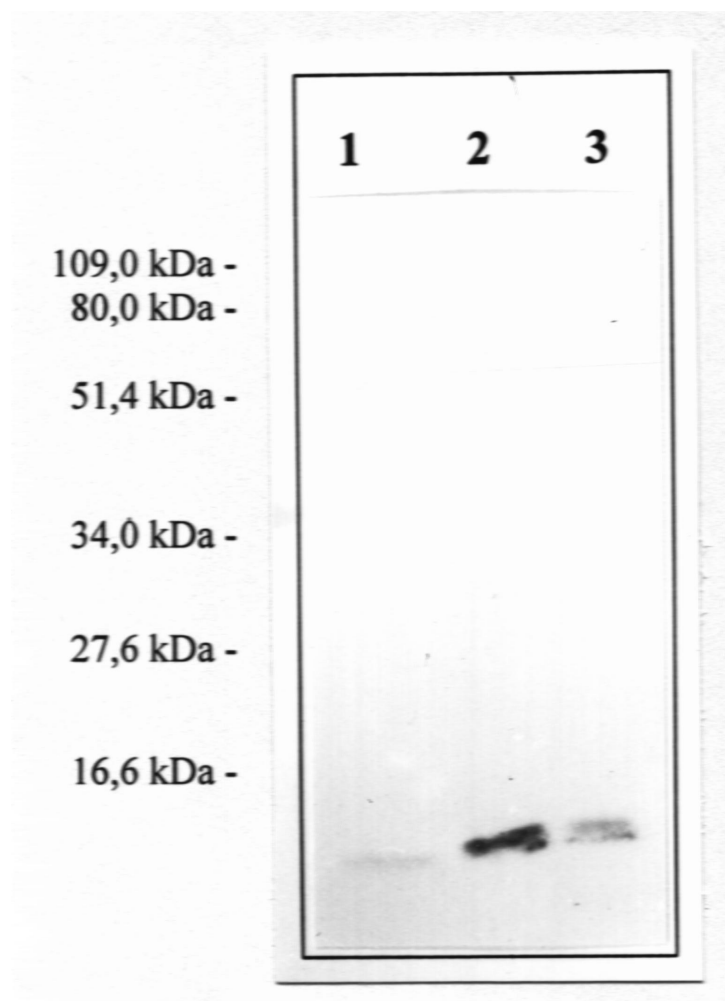
Das Antiserum wurde in den folgenden Experimenten zum Nachweis der subzellulären Lokalisation verwendet.

### 3.3.3 *in-vivo* Lokalisation von Rubredoxin

#### 3.3.3.1 Immunologischer Nachweis von Rubredoxin in *Guillardia theta*, *Synechocystis* und anderen Organismen mit oxygenen Photosynthese

In diesem Experiment wurde Proteinrohextrakt von *G. theta* auf die Existenz von Rubredoxin untersucht. Mit *Synechocystis* ist ein Cyanobakterium bekannt, das laut Sequenzanalyse der Datenbank ebenfalls ein Rubredoxin besitzt (slr2033, CyanoBase; Kap.2.1.15). In dem *Arabidopsis thaliana* Genomprojekt wurde vor kurzem ebenfalls eine Sequenz hinterlegt (Bevan et al., 1999), die sehr grosse Ähnlichkeit in der zentralen Domäne ihrer abgeleiteten Aminosäuresequenz mit Rubredoxinen aus *G. theta* (51 % Identität; 66 % Ähnlichkeit) und aus *Synechocystis* sp. PCC6803 (39 % Identität; 59 % Ähnlichkeit) besitzt.

Deshalb wurde sowohl *G. theta* als auch *Synechocystis* und *Arabidopsis thaliana* auf die Synthese von Rubredoxin untersucht. Aus den genannten Organismen mit oxygenen Photosynthese wurden Rohextrakte erstellt (siehe Kap.2.2.14) und auf den Gehalt an Rubredoxin immunologisch überprüft. Die Abb. 3-11 zeigt die Existenz eines Proteins sowohl in *Guillardia theta* als auch *Synechocystis*, das mit dem polyklonalem Antiserum gegen rekombinantes Rubredoxin reagiert. In beiden Rohextrakten ist eine spezifische Reaktion mit einem ca. 11 kDa grossen Protein detektierbar. In *Arabidopsis thaliana* ist eine wenig intensive Reaktion bei ebenfalls 11 kDa des *anti*-Rubredoxin Antiserums detektierbar.





**Abb. 3–11: ECL–Detektion von Proteinen mit Kreuzreaktivität mit polyklonalem Antiserum gegen rekombinantes *G. theta* Rubredoxin.** Proteinrohextrakte (50 µg) aus *Arabidopsis thaliana* (Spur 1), *Synechocystis* sp. PCC6803 (Spur 2) und *G. theta* (Spur 3) wurden im Anschluss an deren gelelektrophoretischen Auftrennung in SDS–PAGE (15 % Trenngel) auf Nitrocellulosemembran transferiert und mit polyklonalem Antiserum gegen rekombinantes *G. theta* Rubredoxin inkubiert und mit ECL detektiert (Kap.2.2.17). Bei *G.theta* und *Synechocystis*–Rohextrakten ergab sich eine Detektion einer Bande bei ca. 11 kDa. Bei *Arabidopsis* ergab sich eine schwache Reaktion bei ebenfalls 11 kDa.

Damit ist gezeigt, dass ein Protein mit polyklonalem Antiserum gegen Rubredoxin nicht nur in *G. theta*, sondern auch in *Synechocystis* reagiert, in dem Rubredoxin bisher nur als hypothetisches Protein aufgrund der Sequenzhomologien bekannt ist. Immunreaktionen mit dem Antiserum gegen rekombinantes *G. theta* Rubredoxin in Proteinextrakten weiterer Pflanzen (*Pisum sativum*, *Spinacia oleracea*, *Sinapis alba*) ergaben, dass in diesen ebenfalls spezifisch ein Protein der molekularen Masse von ca. 11 kDa mit dem Antiserum gegen rekombinantes *G. theta* Rubredoxin reagiert (ohne Abb.).

Zusätzlich getestete Proteinextrakte von Organismen mit Plastiden, die nicht mehr photosynthetisch aktiv sind, zeigen keine Kreuzreaktion mit dem Antiserum (ohne Abb.). So existiert mit *Chilomonas paramecium* EHRENBERG (SAG 977–2a) eine heterotrophe Cryptomonade, die dennoch eine Plastide besitzt. Diese, als Leukoplast bezeichnete Plastide dient rein biosynthetischen Zwecken und ist nicht mehr zur Photosynthese befähigt. Auch Vertreter der Apicomplexa, die photosynthetisch inaktive komplexe Plastiden (sogenannte Apicoplasten) beherbergen, sind auf Kreuzreaktion mit dem polyklonalem Antiserum gegen rekombinantes *G. theta* Rubredoxin untersucht worden. Im Gegensatz zu *G. theta* Rohextrakt zeigten die Proteinextrakte der beiden getesteten intrazellulären Parasiten *Plasmodium falciparum* (eingesetzte Zellzahl:  $1 \times 10^7$  Zellen) und *Toxoplasma gondii* ( $2 \times 10^7$  Zellen) keine Kreuzreaktion mit dem Rubredoxin Antiserum (ohne Abb.; Zellen wurden freundlicherweise von Frau Kerstin Paprotka und Herrn Dr. Stefan Baumeister, AG Prof. Dr. Lingelbach, Marburg, zur Verfügung gestellt). Bei *Toxoplasma gondii* wurden neben extrazellulären Parasiten auch infizierte und nicht infizierte Mausemakrophagen Wirtszellen (P388D1, nicht adhären, je  $2 \times 10^7$ ) als Kontrolle mitgeführt, deren Proteinextrakte keine Kreuzreaktion mit dem polyklonalen Antiserum zeigten.

### **3.3.3.2 *In situ*–Lokalisation von Rubredoxin in *Guillardia theta* und *Synechocystis* sp. PCC6803 mit Immunelektronenmikroskopie**

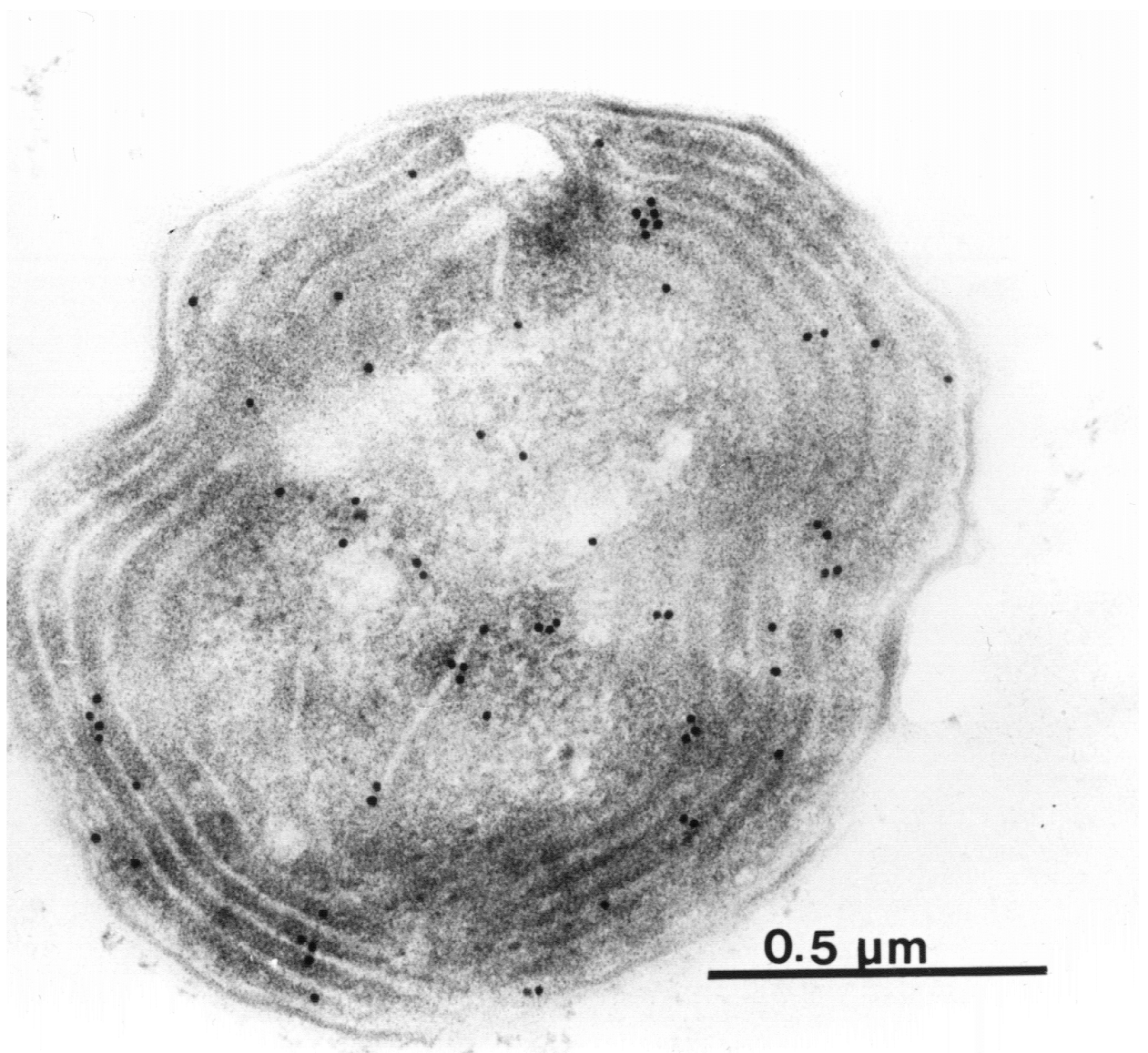
Für eine exakte Bestimmung der subzellulären Lokalisation von Rubredoxin in *G. theta* wurde die Immunelektronenmikroskopie verwendet. Dazu wurden Ultradünnschnitte von fixierten und in Lowicryl eingebetteten *G. theta* Zellen hergestellt und mit dem verdünnten Rubredoxin–Antiserum inkubiert (siehe Kap.2.2.24). Die Immundetektion erfolgte mit Gold–konjugiertem "goat–anti–rabbit IgG"–Antikörpern.

In Abb. 3–12 sind die elektronenmikroskopischen *in situ*–Lokalisationen von Rubredoxin in *G. theta* und *Synechocystis* dargestellt. Abb. 3–12A zeigt die Markierung in der Plastide von *G. theta*. Diese Markierung ist an dem internen, plastidären Membransystem, den Thylakoiden, sichtbar, wohingegen an den Plastidenhüllmembranen keine Signale beobachtet wurden. Auch in dem Cyanobakterium *Synechocystis* ist eine Kreuzreaktion des Antiserums mit einem Protein zu erkennen, das mit dem internen, photosynthetisch aktiven Thylakoidmembransystem assoziiert ist (Abb. 3–12B).

**A**



**B**



**Abb. 3–12: Elektronenmikroskopische *in situ*-Lokalisation von Rubredoxin durch ein Antiserum gegen rekombinantes *G. theta* Rubredoxin.** Ultradünnschnitte wurden mit polyklonalem Antiserum inkubiert und dieses mittels 15 nm Gold-konjugierter "goat-anti-rabbit IgG"-Antikörper detektiert (siehe Kap.2.2.24). A) In *G. theta* ist eine Markierung nur in der Plastide am Thylakoidmembransystem zu beobachten. B) In *Synechocystis* sp. PCC6803 ist ebenfalls eine Markierung des Thylakoidmembransystems erkennbar.

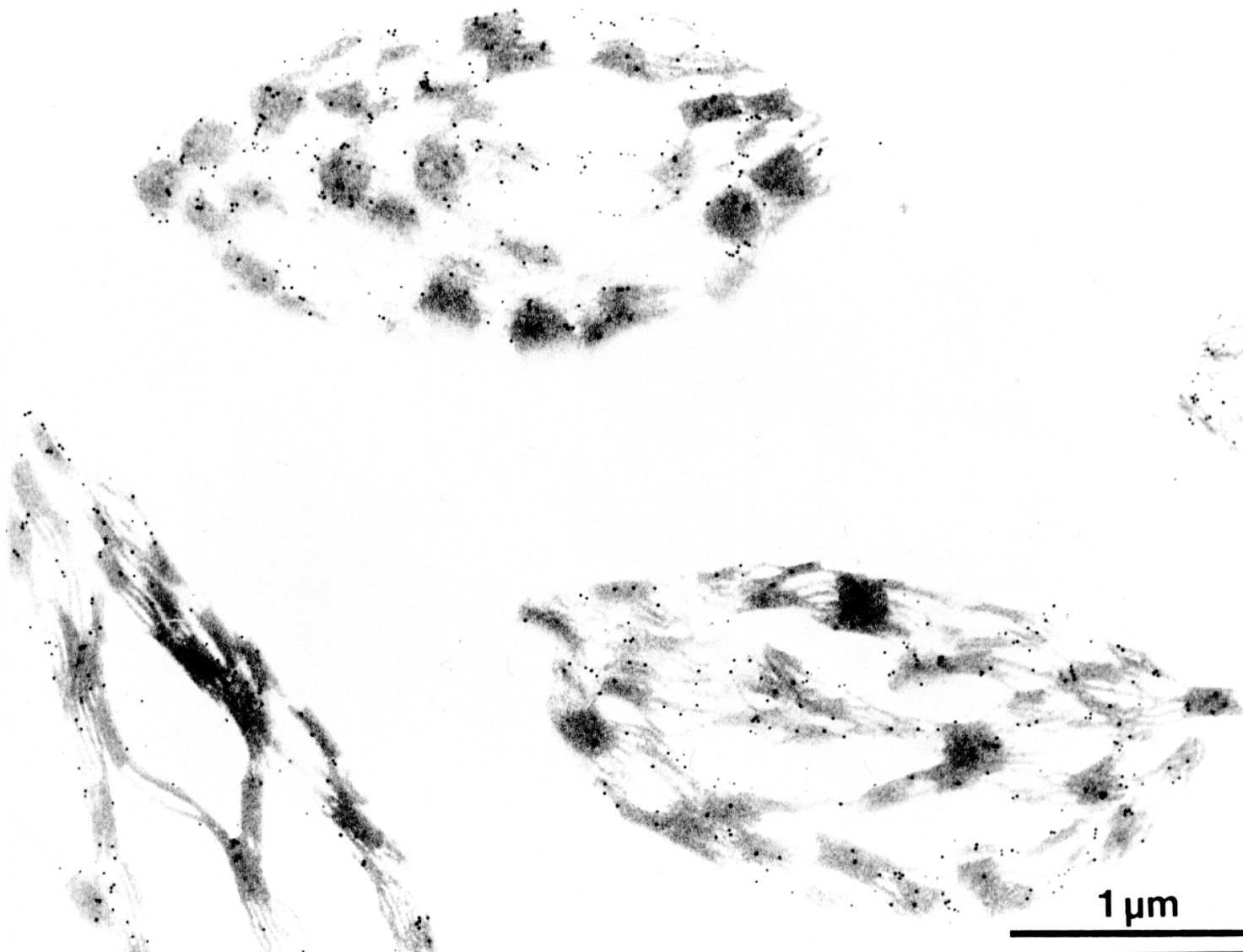
Diese Ergebnisse bestätigen die Existenz und Lokalisation eines Proteins in *G. theta* und *Synechocystis* sp. PCC6803, das mit Rubredoxin Antiserum reagiert. Aufgrund der spezifischen Kreuzreaktion handelt es sich bei diesem Protein um das 11 kDa grosse Protein, das in den Rohextrakten von *G. theta* und *Synechocystis* sp. PCC6803 bereits detektiert wurde (siehe Kap.3.3.3.1).

Die *in situ*-Lokalisation zeigt eine Assoziation dieses Proteins mit der Thylakoidmembran. Diese Beobachtung steht im Einklang mit dem Ergebnis zur Untersuchung der Rohextrakte photosynthetisch aktiver und inaktiver Organismen: Die Proteinextrakte der Organismen, die nicht photosynthetisch aktiv sind, zeigten keine Reaktion mit dem Antiserum gegen Rubredoxin (siehe Kap.3.3.3.1). Dies lässt auf eine Funktion von Rubredoxin in oder an der Thylakoidmembran schliessen, die die Komponenten der Photosynthese beherbergt.

### 3.3.3.3 Assoziierung von Rubredoxin mit dem Photosystem II

Für weitergehende Untersuchungen zur *in situ*-Lokalisation von Rubredoxin an der Thylakoidmembran sind *G. theta* und das Cyanobakterium *Synechocystis* weniger gut geeignet, da beide keine Unterscheidung in Stroma- und Granathylakoide zeigen. Im Gegensatz dazu ist die Unterteilung des Thylakoidsystems in höheren Pflanzen in Stroma- und Granathylakoide sehr gut ausgeprägt. Damit verbunden ist eine räumliche Trennung der Photosystemkomplexe (PS) I und II, dem Cytochrom *b<sub>6</sub>f*-Komplex und dem ATP-Synthase Komplex (Staehelin & DeWit, 1984). Für die ATP-Synthase und PS I wurde eine Lokalisation in Stromathylakoiden, für PS II dagegen eine überwiegende Lokalisation in Granathylakoiden beschrieben. Der Cytochrom *b<sub>6</sub>f*-Komplex ist über die gesamte Thylakoidmembran gleichverteilt.

Um nun zu untersuchen, ob Rubredoxin in Grana- oder Stromathylakoiden oder in beiden vorkommt und ob dessen Verteilung in Korrelation zu einem der verschiedenen Komplexe steht, wurde als weiteres Untersuchungsobjekt das Thylakoidsystem aus Chloroplasten von *Pisum sativum* isoliert, deren Proteinrohextrakt eine Reaktion mit Rubredoxin Antiserum zeigte (siehe Kap.3.3.3.1). Nach der Isolierung intakter Chloroplasten wurden diese schonend lysiert (siehe Kap.2.2.19.1.1), um daraus intakte Stroma- und Granathylakoide zu erhalten. Diese wurden anschliessend fixiert und eingebettet (siehe Kap.2.2.24) und für die *in situ*-Lokalisation mit Antiserum gegen Rubredoxin inkubiert. Die Markierung erfolgte mittels 15 nm goldmarkierten "goat-anti-rabbit IgG" Anikörper im Elektronenmikroskop (Abb. 3-13).



**Abb. 3-13: Elektronenmikroskopische *in situ*-Lokalisation von Rubredoxin in isolierten Erbsenthylakoiden.** Kreuzreaktion des polyklonalen Antiserums gegen rekombinantes *G. theta* Rubredoxin wurden mittels 15 nm Gold-konjugierter "goat-anti-rabbit IgG"-Antikörper detektiert (Kap.2.2.22). Markierungen sind sowohl an den Stroma- als auch an den Granathylakoidmembranen

sichtbar. Die prozentuale Verteilung der Markierung von Grana zu Stroma beträgt 83:17. Dieser Wert korreliert mit der Verteilung von Photosystem II-Komplexen zwischen Grana- und Stromathylakoiden.

Daraus ersichtlich ist eine Kreuzreaktion des polyklonalen Antiserums sowohl mit Stroma- als auch mit Granathylakoiden. Eine Auszählung von 16 elektronenmikroskopischen Aufnahmen isolierter Erbsenthylakoide nach *in situ*-Lokalisierung ergab einen Anteil von 17,3 % der Markierungen in Stromathylakoiden und 82,7 % in Granastapeln (Granathylakoide: 2322; Stromathylakoide: 485; Summe 2807).

Die in dieser Arbeit ermittelte Verteilung von Rubredoxin steht somit in Korrelation zu der Verteilung, die für PS II in den Thylakoiddomänen (85 % Grana, 15 % Stroma) bestimmt wurde.

Um nun zu untersuchen, ob eine Assoziation von Rubredoxin mit PS II Komplexen existiert, wurden unterschiedliche Präparationen von PS II aus *Spinacia oleracea* für weitere immunologische Untersuchungen verwendet. Dazu wurden aus Thylakoidmembranen sogenannte BBY-Partikel, OG-Core-Komplexe und Photosystem II-Dimer-Komplexe (DM-Partikel) aus *Spinacia oleracea* (siehe Kap.2.2.19.2) präpariert, die freundlicherweise von Frau Dr. Lucia Iuzzolino und Herrn Dr. Wolfgang Dörner (Arbeitsgruppe PD. Dr. Holger Dau, Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt wurden. BBY-Partikel wurden nach dem Protokoll von Berthold et al. (1981) hergestellt. Um OG-Core-Komplexe zu erhalten, wurden BBY-Partikel zusätzlich mit einem Detergenz (n-Octyl- $\beta$ -D-glucospyranosid) behandelt, um intakte Photosystem II-Komplexe aus der Membran zu lösen (Dörner, 1999). Aus diesen konnte durch eine zusätzliche Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation sogenannte PS II Dimere (DM-Partikel) von Membranen und PS II-Monomeren abgetrennt werden. Als Qualitätskontrolle für alle Fraktionen (BBY-Partikel, OG-Core-Komplexe und DM-Partikel) diente die Fähigkeit zur Wasserspaltung unter Lichteinfluss (Dörner, 1999). Für SDS-PAGE wurde eine Mengenabschätzung anhand des Chlorophyll *a* Gehalts der Partikel ermittelt (siehe Kap.2.2.19.2). Von den BBY-Partikeln, OG-Core-Komplexen und den DM-Partikeln wurden jeweils die Menge an Probe eingesetzt, die 3  $\mu$ g Chlorophyll *a* entsprach.

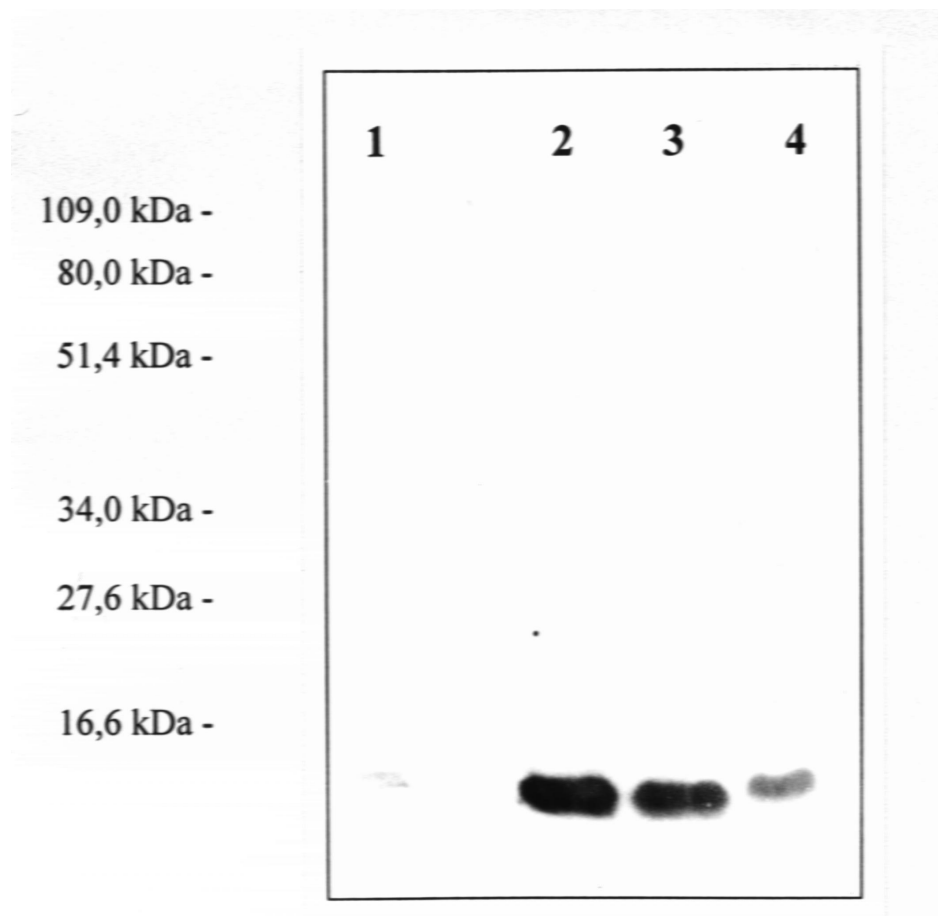


Abb. 3-14: Immundetektion von Thylakoid- und Photosystem II (PS II)-Präparationen aus *Spinacia oleracea* mit

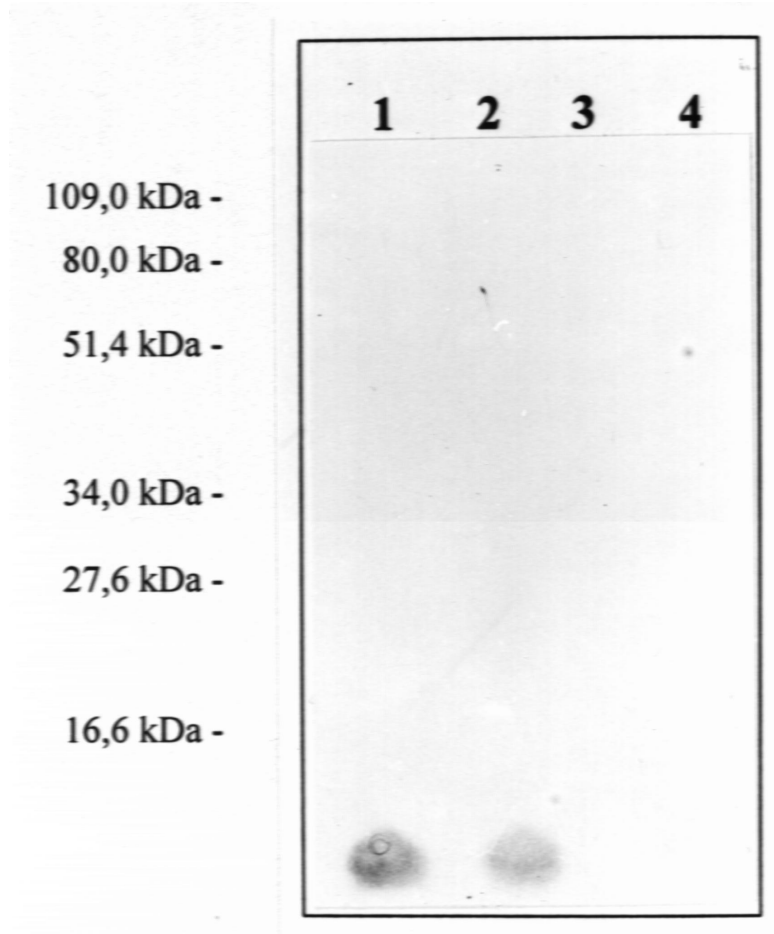
**polyklonalem Antiserum gegen rekombinantes Rubredoxin aus *G. theta*.** Für die SDS–PAGE (15 % Trenngel) wurde als Kontrolle *G. theta* Rohextrakt (Spur 1) eingesetzt. Von allen Proben wurde eine Menge entsprechend 3 µg Chl. *a* aufgetragen: BBY–Partikel (Spur 2), OG–Core–Komplexe aus PS II (Spur 3) und DM–Partikel aus PS II (Spur 4) aus *Spinacia oleracea*. Nach Immobilisierung der Proteine auf Nitrocellulosemembran (Kap.2.2.16) wurden diese mit polyklonalem Antiserum gegen Rubredoxin inkubiert und mittels ECL detektiert (Kap.2.2.17).

Die Abbildung 3–14 zeigt, dass eine Kreuzreaktion des Antiserums gegen Rubredoxin sowohl mit den BBY–Partikeln, den OG–Core–Komplexen als auch mit den Dimeren des gereinigten PS II–Komplexes aus *Spinacia oleracea* nachweisbar war. Die immunreaktive Bande in den unterschiedlichen Präparationen besitzt eine molekulare Masse von ca. 11 kDa, was der Grösse reifen Rubredoxins entspricht. Der Nachweis von Rubredoxin sowohl in den BBY–Partikel als auch den gereinigten PS II Komplexen (OG–Core Komplexen und DM–Partikel) deutet auf eine Assoziierung des Rubredoxins mit Komponenten des PS II hin.

### **3.3.3.4 Die Eisen–komplexierende Domäne des *G. theta* Rubredoxins ist im Stroma lokalisiert**

Rubredoxin ist in Organismen mit oxygener Photosynthese in der Thylakoidmembran lokalisiert (siehe Kap.3.3.3.2). Die Insertion wird vermutlich durch die C–terminale Domäne vermittelt. Für die konservierte Eisen–Bindedomäne des reifen Proteins ergeben sich damit zwei alternative Orientierungen: Einerseits kann der N–terminale Bereich des reifen Proteins in das Stroma, andererseits in das Lumen der Thylakoide ragen.

Um nun die Frage der Lokalisation der zentralen Domäne zu beantworten, wurden intakte Thylakoide aus *G. theta* isoliert (siehe Kap.2.2.19.1.2). Mittels proteolytischem Verdau mit Thermolysin in An– und Abwesenheit eines Detergenz und anschliessender Immunlokalisation sollte die Frage nach der Orientierung von Rubredoxin beantwortet werden. Bei einer stromalen Ausrichtung der Eisen–Bindedomäne sollten intakte Thylakoide nach Proteolyse keine Kreuzreaktion mit Rubredoxin Antiserum mehr zeigen, dass ausschliesslich gegen die zentrale Domäne gerichtet ist (siehe Kap.3.3.2). Ist Rubredoxin jedoch lumenal orientiert, wäre Rubredoxin Protease–insensitiv und nur nach Solubilisierung der Thylakoidmembran proteolytisch abbaubar.



**Abb. 3–15: Immundetektion von Thylakoidpreparationen aus *Guillardia theta* mit polyklonalem Antiserum gegen rekombinantes Rubredoxin aus *G. theta*.** Proteinextrakte aus *G. theta* (Spur 1), intakten Thylakoiden in Abwesenheit (Spur 2) und Anwesenheit von Thermolysin (Spur 3) und Thylakoiden nach Thermolysinverdau in Anwesenheit eines Detergenz (Spur 4) wurden nach SDS–PAGE (15 % Trenngel) auf Nitrocellulosemembran transferiert. Diese wurde mit Rubredoxin Antiserum inkubiert (Kap.2.2.16) und mittels ECL detektiert (Kap.2.2.17).

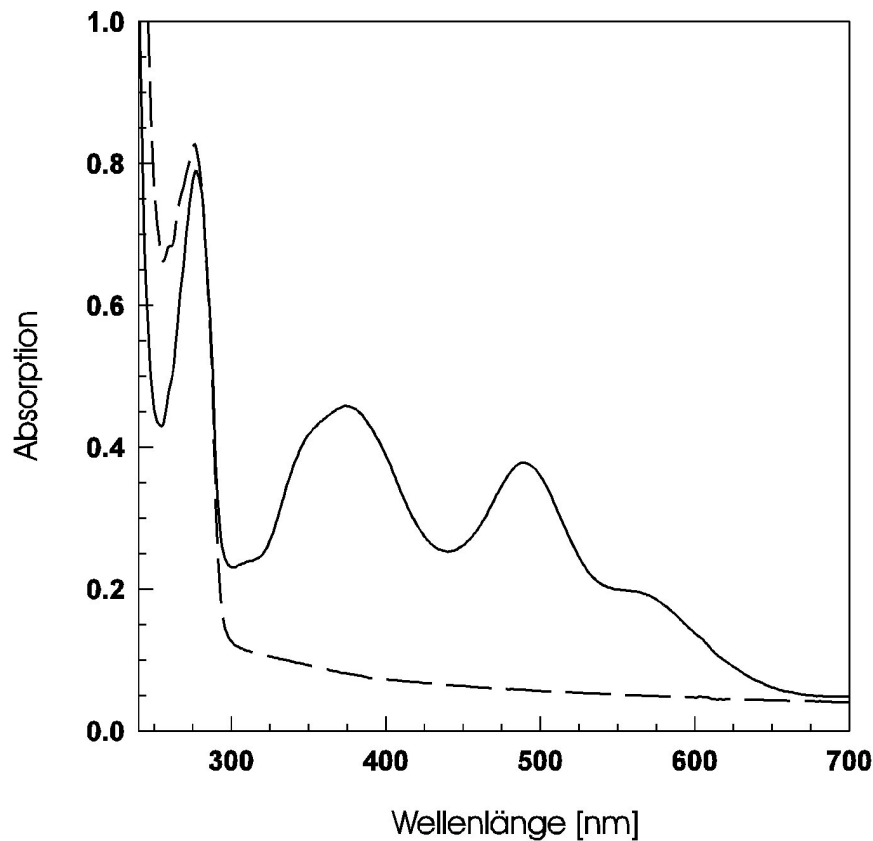
Wie aus Abb. 3–15 ersichtlich, ist die zentrale Domäne des Rubredoxins nicht vor Proteolyse geschützt. Lediglich der Proteinextrakt unbehandelter Thylakoide reagierte mit dem Rubredoxin–Antiserum. Damit konnte gezeigt werden, dass die zentrale Domäne des in der Thylakoidmembran verankerten *G. theta* Rubredoxins in Richtung Stroma orientiert ist. Das gleiche Ergebnis wurde mit isolierten intakten Erbsenthylakoiden erzielt, die für die *in situ*–Lokalisation verwendet wurden (Abb. 3–13).

### 3.3.4 Rubredoxin enthält Redox–aktives Eisen als Kofaktor

#### 3.3.4.1 UV/Vis–Spektrum

Entscheidend für die Klassifizierung als Rubredoxin ist die konservierte, zentrale Domäne, die in den bislang charakterisierten Rubredoxinen für die Bindung des Eisenkofaktors zuständig ist. Wie das Rubredoxin–Alignment (siehe Abb. 3–9) verdeutlicht, liegen die für die Eisenkoordination essentiellen vier Cysteine auch in *G. theta* Rubredoxin vor. Um zu überprüfen, ob rekombinantes Rubredoxin Eisen enthält, wurde ein UV/Vis–Spektrum von gereinigtem Rubredoxin (siehe Kap.3.3.2) aufgenommen. Wie in Abb. 3–16 dargestellt, enthält Rubredoxin Absorptionsmaxima bei 280, 390 und 490 nm. Das Maximum bei 280 nm wird durch die im Protein enthaltenen aromatischen Aminosäuren hervorgerufen. Die Maxima bei 390 und

490 nm zeigen, dass Eisen in oder am rekombinanten Rubredoxin gebunden ist. In der Literatur sind UV/Vis-Spektren nativer als auch rekombinanter Rubredoxine aus Eubakterien beschrieben, die ebenfalls Absorptionsmaxima bei 280, 390 und 490 nm besitzen (Eidsness et al., 1992). Das UV/Vis-Spektrum Zink-substituierten rekombinanten Rubredoxins zeigt keine Absorptionsmaxima bei 390 und 490 nm. Die Zink-Substitution in rekombinantischem Rubredoxin wurde vorgenommen, um das Protein mit NMR strukturell zu charakterisieren (S. Hoffmann, persönliche Mitteilung).



**Abb. 3-16: UV/Vis-Spektrum rekombinanten *G. theta* Rubredoxins.** Gereinigtes rekombinantes Rubredoxin (durchgezogene Linie) und eine Zink-substituierte Form rekombinanten Rubredoxins (gestrichelte Linie) wurden bei Raumtemperatur gemessen. Das Spektrum rekombinantischem Rubredoxins besitzt im Vergleich zur Zink-substituierten Form zusätzliche Absorptionsmaxima bei 390 und 490 nm, die auf gebundenes Eisen zurückzuführen sind.

Das Spektrum belegt, dass in rekombinantischem *G. theta* Rubredoxin Eisen gebunden ist. Ob dieses durch die vier Cysteine komplexiert wird, und ob dieses Eisen als Redox-aktiver Kofaktor fungieren kann, kann anhand des UV/Vis-Spektrums nicht geklärt werden.

### 3.3.4.2 Elektronenspinresonanzmessungen

Für die Untersuchung metallhaltiger Proteine ist die Elektronenspinresonanzspektrometrie (EPR) eine geeignete Methode, um die Anordnung des metallischen Kofaktors zu bestimmen und Übergangsmetalle und angeregte Zustände zu ermitteln. EPR-Messungen wurden bereits vielfach zur Charakterisierung des Redox-aktiven Eisens in Rubredoxinen. Dabei wurden für Rubredoxin charakteristische  $g$ -Werte von  $g=4,3$  und  $g=9,6$  ermittelt (zum Beispiel in *Clostridium pasteurianum*, Eidsness et al., 1999). Rekombinantisches Rubredoxin aus *G. theta* (70 aa) wurde zu gleichen Bedingungen, wie bei Eidsness et al. (1999) beschrieben, bei einer Temperatur von 4,5 K analysiert. Die Messungen wurden am EPR-Spektrometer des MPI für terrestrische Mikrobiologie, Marburg, unter der Anleitung von Herrn Dr. Evert Duin durchgeführt (siehe

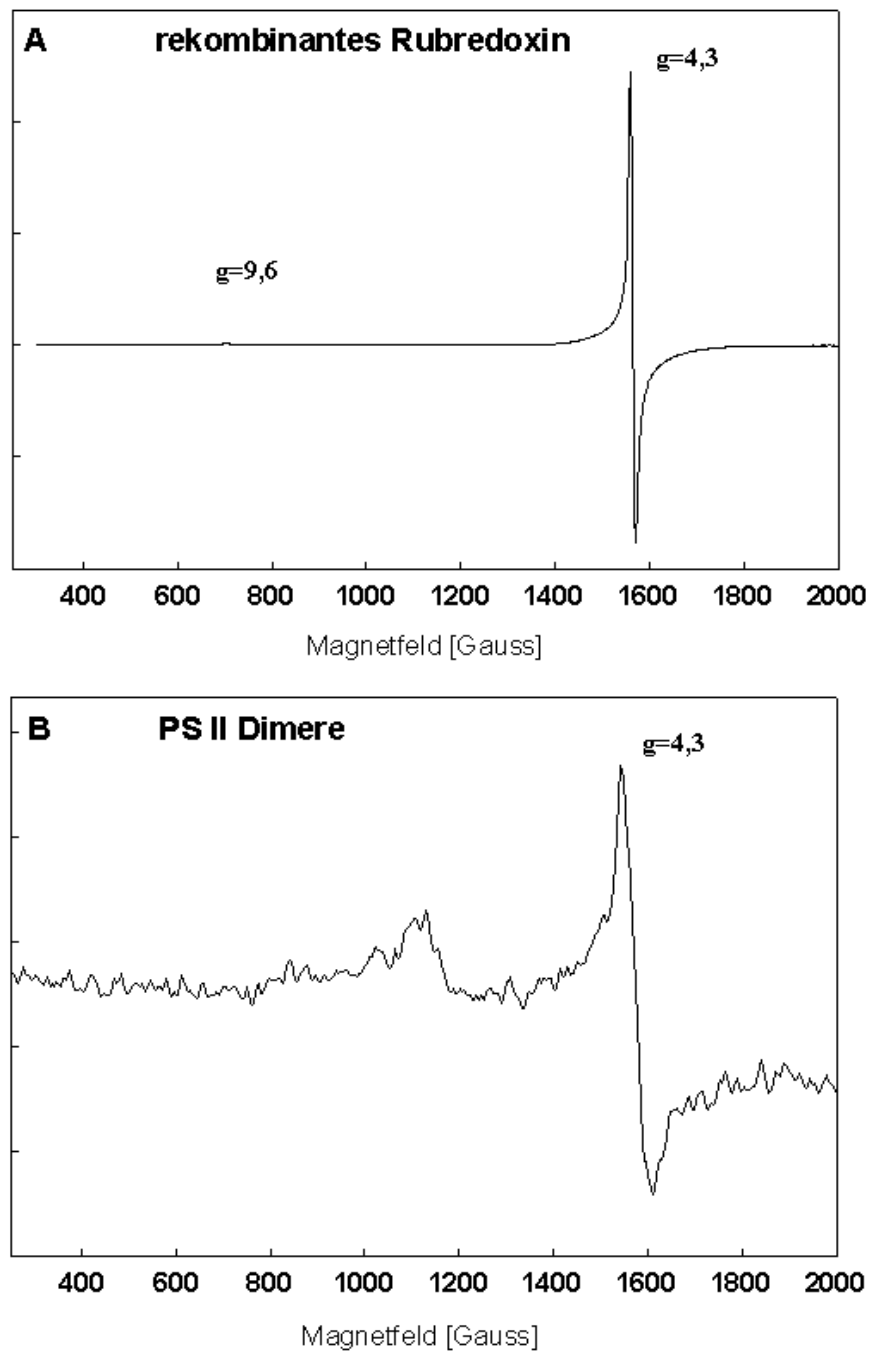


Kap.2.2.25).

Die Abbildung 3–16 zeigt das EPR–Spektrum rekombinanten Rubredoxins. Die ermittelten  $g$ –Werte von 9,6 und 4,3 bestätigen die Anordnung des Eisenkofaktors im rekombinanten Rubredoxin als tetraedrisch gebundenes Eisen (III) mit einem  $S$ –Wert von  $5/2$  (ungepaartes Elektron mit Spin). Damit konnte für rekombinantes Rubredoxin aus *G. theta* der Eisenkofaktor in einer identischen Form der Anordnung ermittelt werden, wie sie auch in bereits charakterisierten Rubredoxinen aus Eubakterien bestimmt wurden.

Aufgrund des immunologischen Nachweises von Rubredoxin in gereinigten PS II–Komplexen (siehe Kap.3.3.3) ist eine vergleichende EPR–Messung mit PS II–Präparationen durchgeführt worden. Bisherige EPR–Messungen an Photosystem II ergaben ein Signal EPR–aktiven Eisens mit einem  $g$ –Wert von ebenfalls 4,3 (Miller & Brudvig, 1991), was in der Literatur bislang auf Eisenkontamination in der Präparation zurückgeführt wurde. Die in der Literatur beschriebenen Messungen an Photosystem II lassen aufgrund des gewählten Magnetfeldes jedoch keinen Vergleich zu den bisherigen Messungen an Rubredoxin zu. Mit Thylakoidpräparationen aus *Spinacia oleracea* (siehe Kap.2.2.17.2) und gereinigten PS II–Komplexen (sowohl OG–Core Komplexe, als auch DM–Partikel) wurden zu identischen Bedingungen wie bei Rubredoxin EPR–Spektren aufgenommen. Wie in Abb. 3–17 ersichtlich, besitzen DM–Partikel den für Eisen (III) charakteristischen  $g$ –Wert von 4,3. Aufgrund der wesentlich geringeren Signalintensitäten im Bereich bei 700 Gauss ist eine Zuordnung des Rubredoxinsignals bei  $g=9,6$  nicht möglich.

Mit den EPR–Messungen an rekombinanten Rubredoxin aus *G. theta* konnte gezeigt werden, dass sowohl rekombinantes Rubredoxin als auch PS II Dimere ein Redox–aktives Eisen in einer Anordnung enthalten, die bereits für eubakterielle Rubredoxine beschrieben wurde.



**Abb. 3–17: EPR–Spektren rekombinanten Rubredoxins aus *G. theta* und von PS II–Dimeren aus *Spinacia oleracea*.**  
 A) Das gereinigte rekombinante, 70 Aminosäuren grosse Rubredoxin aus *G. theta* wurde in oxidierte Form bei 4,5 K gemessen (siehe Kap.2.2.25). Im Vergleich dazu zeigt B das EPR–Spektrum gereinigter PS II Dimere aus *Spinacia oleracea*. Beide zeigen das charakteristische Eisensignal bei  $g=4,3$ .

### 3.4 Kern–kodierte plastidäre Proteine

Ausgehend von der Genomanalyse von *Synechocystis* sp. PCC6803 und der zunehmenden Fülle an Information in den Datenbanken, rechnet man mit ca. 2000–3000 plastidären Proteinen, die zu der Aufrechterhaltung aller plastidären Funktionen notwendig sind (Martin & Herrmann, 1998). Zieht man die Kodierungskapazitäten des Plastoms von *G. theta* (Douglas & Penny, 1999) und des Nucleomorphs für plastidäre Orfs (Tab. 3–1; Tab. 3–2) in Betracht, so muss der Grossteil der Plastidenproteine im Nucleus der Wirtszelle kodiert sein. Deren Genprodukte müssen, im Gegensatz zu den Nucleomorph–kodierten, insgesamt vier Membranen überqueren, um in das Stroma der Plastide zu gelangen.

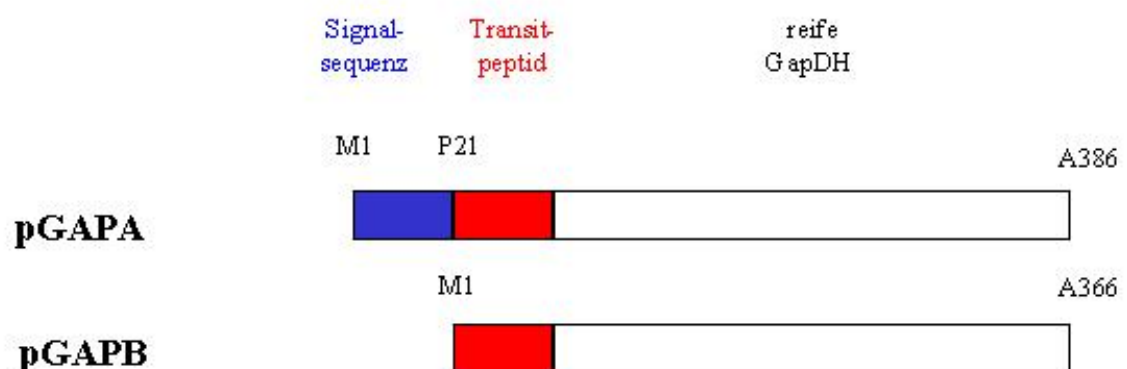
### 3.4.1 Transitpeptide Kern–kodierter Proteine in *Guillardia theta* sind zweigeteilt

Bislang war über den Transport Kern–kodierter Proteine in die komplexe Plastide von *G. theta* nichts bekannt. Zu Beginn dieser Arbeit war lediglich die Glycerinaldehydphosphat–Dehydrogenase (GapDH) als Kern–kodiertes, plastidär lokalisiertes Protein in *G. theta* beschrieben (Liaud et al., 1997).

Erste heterologe Importstudien zum Vier–Membrantransport wurden vor kurzem mit Präproteinen aus der Kieselalge *Odontella sinensis* (Lang et al., 1998) durchgeführt. In *Toxoplasma gondii*, einem Vertreter der Apicomplexa, wurde erstmals *in vivo* die subzelluläre Lokalisation Kern–kodierter und Apicoplast–lokalisierter Proteine durch GFP–Konstrukte nachgewiesen (Waller et al., 1998). Die *targeting*–Information zum Überqueren von vier Membranen wurde in beiden Fällen von sogenannten zweigeteilten Transitpeptiden vermittelt.

Auch die GapDH aus *G. theta* besitzt eine zweigeteilte N–terminale Extension: An deren N–terminalen Ende befindet sich ein 18 Aminosäure langes Peptid, das der Suchalgorithmus (PSORT, siehe Kap.2.1.15) als Signalsequenz erkennt; daran schliesst sich ein Bereich an, der in Suchalgorithmen (ChloroP, siehe Kap.2.1.15) als Transitpeptid erkannt wird.

Um nun die Proteintranslokation eines Kern–kodierten Proteins in *G. theta* zu untersuchen, wurden zwei Konstrukte des *gapC1*–Gens erstellt. Ausgehend von einer Gesamt–RNA Präparation von *G. theta* (siehe Kap.2.2.4.4) wurde die kodierende Sequenz mittels RT–PCR amplifiziert. Als 5′–Primer nach der Erststrangsynthese mit dem *gap3* Oligonukleotid (siehe Kap.2.1.9) diente zum einen der Primer *gap5a*, der die kodierende Sequenz mit dem kompletten zweigeteilten Transitpeptid mit dem 3′–Primer amplifiziert. Ein zweiter 5′–Primer wurde so gewählt, dass mittels Einfügen eines neuen Translationsstartes an der Position 21 ein um die Signalsequenz verkürztes Konstrukt erstellt wurde, das an seinem 5′–Ende mit der kodierenden Sequenz des potentiellen Transitpeptides beginnt. Der "neue" N–Terminus dieser verkürzten GapDH (pGAPB, Abb.3–18) wird laut Suchalgorithmus (ChloroP, Kap.2.1.15) als Transitpeptid vorhergesagt.



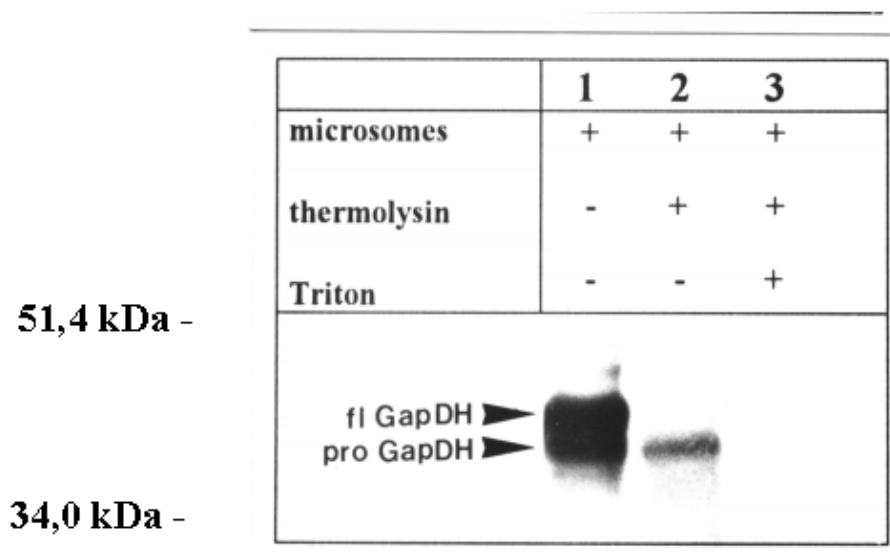
**Abb. 3–18: Glycerinaldehydphosphat–Dehydrogenase Konstrukte.** Schematisch dargestellt sind die aus der jeweilig kodierenden Sequenz abgeleiteten Proteine der GapDH aus *G. theta*. pGAPA stellt das *full length* Konstrukt mit einem zweigeteilten Transitpeptid

dar; pGAPB ist am 5'-Ende um die kodierende Sequenz für die ersten 20 Aminosäuren verkürzt. Anstelle von P21 wurde ein neuer Translationsstart eingefügt. Mit Alanin an Position 38 des GapDH-Präproteins bzw. mit Alanin 18 des verkürzten Präproteins beginnen die jeweiligen reifen GapDH-Proteine (nach vorhergesagter Prozessierung, ChloroP, Kap.2.1.15)

### 3.4.2 Kern-kodierte *Guillardia theta* GapDH wird kotranslational in Mikrosomen transportiert

Die ersten 18 Aminosäuren der N-terminalen Extension der GapDH werden als Signalsequenz, wie sie Proteine besitzen, die in das ER-Lumen kotranslational inseriert werden, von PSORT vorhergesagt (siehe Kap.2.1.15). Um die Funktion dieses Peptids als Signalsequenz zu verifizieren, wurde der experimentelle Ansatz des heterologen Imports der *G. theta* GapDH in Mikrosomen gewählt.

Für die Synthese markierten GapDH Präproteins wurde mittels RT-PCR die vollständige kodierende Sequenz der GapDH amplifiziert (siehe Kap.2.2.8), unter die Kontrolle des SP6 Promotors in pGEM-T gerichtet kloniert (pGAPA) und zur Überprüfung des Leserahmens doppelsträngig sequenziert (siehe Kap.2.2.9). Das pGAPA-Konstrukt wurde in der Anwesenheit von <sup>35</sup>S-Methionin *in vitro* transkribiert und translatiert. Nach 90 min bei 30°C Expression im Retikulozytenlysat unter Anwesenheit von Mikrosomen (siehe Kap.2.2.21) ergibt sich nach SDS-PAGE und anschließender Autoradiographie des getrockneten Geles, das in Abb. 3-19 gezeigte Proteinprofil.



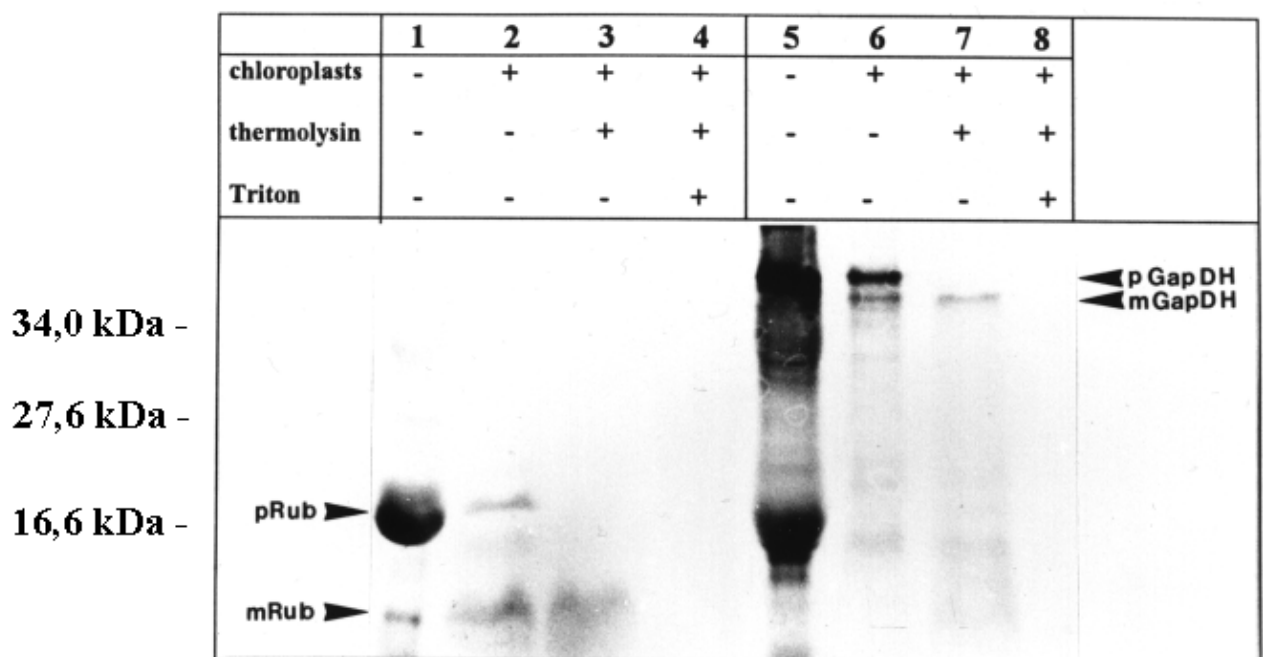
**Abb. 3-19: Kotranslationaler Transport der *G. theta* GapDH in Mikrosomen.** Gezeigt ist die Autoradiographie nach SDS-PAGE (12 % Trenngel). In Anwesenheit von 6  $\mu$  Mikrosomen (siehe Kap.2.2.21) ist neben dem Präprotein, das das *full-length* Produkt (fl GapDH) mit einer molekularen Masse von 43 kDa darstellt, eine um ca. 3 kDa verkürzte Bande (proGapDH) sichtbar. Dieses prozessierte Protein ist vor Proteolyse durch Thermolysin im Gegensatz zu dem Vorläuferprotein geschützt (Spur 2). Bei zusätzlicher Solubilisierung der Mikrosomen mit Triton X-100 unterliegt proGapDH der Proteolyse durch Thermolysin.

Das Protease-resistente Protein repräsentiert eine prozessierte Form der GapDH. Die molekulare Masse entspricht mit ca. 40 kDa der aus der Primärsequenz errechneten molekularen Masse nach Abspaltung der Signalsequenz. Damit ist die kotranslationale Translokation der GapDH im heterologen System *in vitro* gezeigt.

Eine Verifizierung des N-Terminus als Signalsequenz im homologen System *G. theta* ist aus unterschiedlichen Gründen nicht durchführbar: Zum einen können keine intakten Vier-Membran-Plastiden aus *G. theta* isoliert werden, da die äusserste Membran der komplexen Plastide ein Kontinuum mit der Kernhülle bildet. Zum anderen sind *in vivo* Experimente mittels Transformation von *G. theta*-Zellen mit geeigneten Konstrukten (Genfusionen potentieller Signalsequenzen mit kodierenden Sequenzen von Markerproteinen) nicht etabliert.

### 3.4.3 Heterologer Import der GapDH mit verkürztem Transitpeptid in Erbsenplastiden

Der C-terminale Bereich des zweigeteilten Transitpeptides zeigt nach dem Algorithmus ChloroP (siehe Kap.2.1.15) Eigenschaften eines Transitpeptides mit einer potentiellen Prozessierungsstelle nach Aminosäure 38 in pGAPA (Abb. 3-18). Um nun zu überprüfen, ob dieses topogene Signal ausreichend ist, ein Präprotein über die beiden innersten Membranen der komplexen Plastide zu translozieren, wurde ein GapDH-Konstrukt ohne Signalsequenz hergestellt. Die Deletion umfasste die ersten 20 Aminosäuren, so dass die kodierende Sequenz des Konstruktes mit dem mittels PCR eingeführten Methionin anstelle des Prolins an Position 21 des *full-length* Proteins begann (siehe Abb. 3-19). Dazu wurde mit dem 5'-Primer *gapC1-5B* (siehe Kap.2.1.9), der mit dem *codon* für Methionin anstelle des P21 modifiziert wurde, und *gapC1-3* (siehe Kap.2.1.9) aus Gesamt-RNA mittels RT-PCR die Sequenz amplifiziert (siehe Kap.2.2.8). Diese wurde durch Klonierung in pGEM-T unter die Kontrolle des T7 Promotors gestellt und die Sequenz des Leserahmens im Konstrukt pGAPB kontrolliert (siehe Kap.2.2.9). Das Konstrukt pGAPB wurde in Retikulozytenlysat in Anwesenheit von <sup>35</sup>S Methionin transkribiert und translatiert (siehe Kap.2.2.20.1). Anschliessend wurde das markierte Translationsprodukt mit isolierten, transportkompetenten Erbsenchloroplasten (siehe Kap.2.2.20.2) inkubiert. Als Kontrolle diente Rubredoxin, dessen *in vitro* Transport in Chloroplasten bereits gezeigt wurde (siehe Kap.3.2.1). Für die gelelektrophoretische Analyse wurde ein 15 %-iges Trenngel gewählt, um sowohl Rubredoxin als auch GapDH in einer SDS-PAGE analysieren zu können. Die Autoradiographie des getrockneten Gels ergab das in Abb. 3-20 gezeigte Proteinprofil.



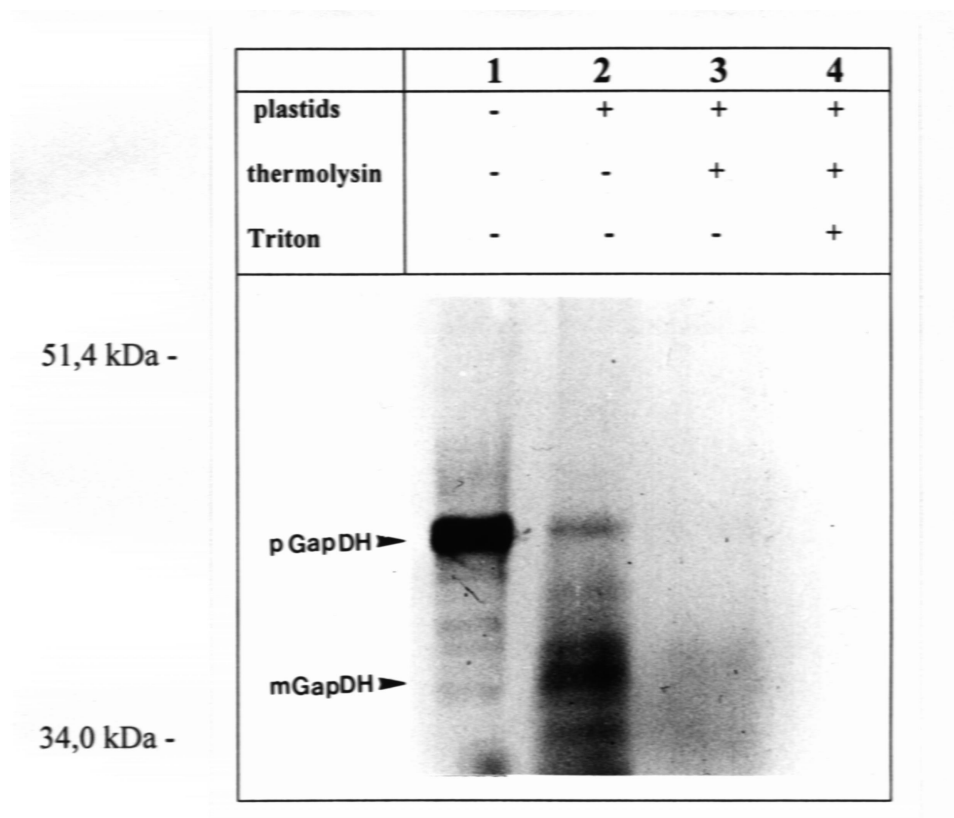
**Abb. 3-20: Heterologer Import in isolierte Erbsenchloroplasten.** *In vitro* transkribierte und translatierte Präproteine von Nucleomorph-kodiertem Rubredoxin (pRub) und vom Kern-kodierten GapDH-Konstrukt pGAPB ohne Signalsequenz (pGapDH)

wurden mit isolierten Erbsenchloroplasten (Kap.2.2.18.1) 30 min inkubiert (siehe Kap.2.2.20.2). Die Autoradiographie nach SDS-PAGE (15 % Trenngel) zeigt die jeweiligen Translationsprodukte ohne (Spuren 1 und 5) und nach Inkubation mit Erbsenchloroplasten (Spuren 2 und 6). Spuren 3 und 7 zeigen die Import-Proteinprofile isolierter Plastiden nach Thermolysinbehandlung. Spuren 4 und 8 zeigen den Kontrollverlauf nach Solubilisierung der Membranen mit Triton X-100. mRub bezeichnet das ca. 11 kDa grosse, vor Proteolyse geschützte Protein nach Prozessierung, mGapDH das reife Protein der GapDH mit ca. 36 kDa. Das radioaktiv markierte Protein mit einer molekularen Grösse von 17 kDa in den Spuren 1 und 5 ist auf die Synthese von Globin im Retikulozytenlysat zurückzuführen.

Die Spuren 1–4 zeigen für Rubredoxin das gleiche Proteinmuster wie in Abb. 3–4 (Kap.3.2.1). Unter identischen Importbedingungen zeigen sowohl das Rubredoxin-Präprotein (pRub) als auch das reife, thermolysinresistente, Rubredoxin (mRub) die jeweilig gleiche molekulare Massen wie bereits in Kap.3.2.1 gezeigt. Für das markierte Präprotein pGapDH ergibt sich nach Inkubation mit Erbsenchloroplasten unter Importbedingungen eine zusätzliche, verkürzte Bande <sup>35</sup>S-Methionin markierten Proteins (mGapDH). Dieses ist vor Proteolyse geschützt (Spur 7, Abb. 3–20). Der Kontrollansatz (Spur 8, Abb. 3–20) zeigt, dass nach Solubilisierung der Plastiden mGapDH der Proteolyse durch Thermolysin unterliegt. Damit ist gezeigt, dass das ca. 36 kDa Protein mGapDH *in vitro* in das Stroma der Chloroplasten transloziert worden ist mGapDH stellt somit das um das Transitpeptid verkürzte Precursorprotein der GapDH dar.

### 3.4.4 Homologer Import der GapDH in *G. theta* Plastiden

In Kap.3.2.2.2 konnte bereits anhand von <sup>35</sup>S-markierten Rubredoxin die Proteintranslokation eines Nucleomorph-kodierten Präproteins im homologen System gezeigt werden. Mit Translokationsstudien im homologen System soll nun die Funktion des Transitpeptids eines Kern-kodierten plastidären Proteins in *G. theta* untersucht werden. Dazu wurde das Konstrukt pGAPB, dessen markiertes Genprodukt in Erbsenchloroplasten importiert werden konnte (siehe Kap.3.4.3), *in vitro* transkribiert und in Anwesenheit von <sup>35</sup>S-Methionin translatiert (siehe Kap.2.2.20.1). *G. theta* Plastiden wurden nach Kap.2.2.18.2 isoliert. Die Bedingungen des Imports entsprachen den des Imports von pGapDH im heterologen System. Die gelelektrophoretische Analyse wurde in einem 10 %-igen Trenngel durchgeführt.



**Abb. 3–21: Homologer Import von pGapDH in isolierte *G. theta* Plastiden.** Das Konstrukt pGAPB wurde in Anwesenheit von <sup>35</sup>S-Methionin *in vitro* transkribiert und translatiert (siehe Kap.2.2.20.1). Das Präprotein wurde mit isolierten *G. theta* Plastiden (siehe

Kap.2.2.18.2) 10 min zu gleichen Importbedingungen wie im heterologen System inkubiert. Die Autoradiographie nach SDS-PAGE (10 % Trenngel) zeigt in der Spur 1 das Translationsprodukt (mit Pfeilen markiert) und in Spur 2 das Proteinprofil nach Inkubation mit *G. theta* Plastiden. Spur 3 zeigt das Proteinprofil isolierter Plastiden nach Thermolysinbehandlung. Spur 4 zeigt den Kontrollverdau mit Thermolysin nach Solubilisierung der Membranen mit Triton X-100 (Bedingungen siehe Kap. 2.2.20.2). mGapDH stellt das importierte, vor Proteolyse geschützte Protein nach Prozessierung in den *G. theta* Plastiden dar.

Wie die Abb. 3-21 verdeutlicht, wird das artifizielle GapDH-Präprotein (ohne Signalsequenz) im homologen System der *G. theta* Plastiden importiert. In der Spur 2 in der Autoradiographie der Abbildung 3-21 ist nach Inkubation mit *G. theta* Plastiden ein prozessiertes Protein mit der molekularen Masse reifer GapDH zu erkennen (mGapDH). Nach Proteolyse der Plastiden mit Thermolysin ist eine schwache Bande mit der molekularen Masse prozessierter GapDH zu erkennen. Bei gleichzeitiger Solubilisierung der *G. theta* Plastiden mit Triton X-100 wird mGapDH proteolytisch verdaut.

Anhand der Translokationsstudien an *G. theta* Plastiden konnte somit gezeigt werden, dass nicht nur Nucleomorph-kodierte Präproteine (Rubredoxin, siehe Kap.3.2.2.2), sondern auch Kern-kodierte plastidäre Proteine im homologen System *in vitro* importiert werden.

### 3.5 Vergleichende Darstellung der topogenen Signale und des *plastid-targeting* von Nucleomorph- und Nucleus-kodierten Proteinen in *Guillardia theta*

Abschliessend gibt die Abb. 3-21 eine Zusammenfassung der Ergebnisse zum Transport plastidenlokalisierter Proteine wieder. Dabei werden anhand des Beispiels Nucleomorph-kodierten Rubredoxins und Kern-kodierter Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase aus *G. theta* die Charakteristika der jeweiligen topogenen Signale dargestellt.

	<b>Rubredoxin</b>	<b>GapDH</b>
Genom	Nucleomorph	Nucleus
Anzahl der überquerten Membranen	2	4
topogenes Signal	einfach	zweigeteilt
Signalsequenz	-	+
Transitpeptid	+	+
Vorhersage als Transitpeptid	-	+
phosphorylierbare Aminosäuren	+	+
Vorhersage der Prozessierung	-	+
Prozessierung	+	+

**Abb.3–21: Vergleich der topogenen Signale plastidär lokalisierter Präproteine aus *G. theta*.** Dargestellt sind die Charakteristika der topogenen Signale von Nucleomorph–kodiertem Rubredoxin und Kern–kodierter GapDH aus *G. theta*.



## 4 Diskussion

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht die Identifizierung und Charakterisierung plastidärer Funktionen, die zur Aufrechterhaltung der komplexen Plastide von *Guillardia theta* notwendig sind. Vor dem theoretischen Hintergrund der sekundären Endocytobiose, bilden die zwei eukaryoten Genome der Cryptomonade *G. theta* und die unterschiedliche Lokalisation der Gene für plastidäre Proteine den Ausgangspunkt einer vergleichenden Analyse des Protein-*targeting*. Die Charakterisierung der jeweiligen topogenen Signale gibt Aufschluss über die Wege des Proteintransportes in die komplexe Plastide.

### 4.1 Das Plastiden-*targeting* in *Guillardia theta*

#### 4.1.1 Der Aufbau der Präproteine für plastidäre Funktionen in *Guillardia theta*

Die Evolution der Plastiden wurde von einer drastischen Reduzierung der Plastome des photosynthetisch aktiven Endosymbionten begleitet. Die Vielzahl der Gene für plastidäre Funktionen ist auf den Nucleus der Wirtszelle transferiert worden (siehe Kap.1.1). Im Zuge der polyphyletischen Evolution komplexer Plastiden wurde bei mindestens zwei Algengruppen das sogenannte periplastidäre Kompartiment mit einem DNA-haltigen Restkern, dem Nucleomorph, aufrecht erhalten. Die Existenz des Nucleomorphs wurde mit der Kodierung essentieller plastidärer Proteine begründet (Häuber et al., 1994). Diese Hypothese wurde durch die Sequenzierung der Chromosomen des Nucleomorphs der Cryptomonade *G. theta* bestätigt (Zauner et al., 2000; Zauner, in Vorbereitung). Neben Genen für bereits bekannte plastidäre Funktionen wie z.B. *ftsZ* (Fraunholz et al., 1998) und *cpn60* (diese Arbeit; Wastl et al., 1999) wurden auch bislang unbekannte plastidäre Proteine, wie zum Beispiel Rubredoxin (Wastl et al., eingereicht), in dieser Arbeit identifiziert und charakterisiert.

Nucleomorph-kodierte Plastidenproteine müssen wie die Kern-kodierten, plastidären Proteine der Glaucocystophyten, der Rotalgen, der Grünalgen und der höheren Pflanzen die zwei Membranen der Plastidenhülle überqueren, um das Stroma zu erreichen. Aus der Analyse zur Translokation Kern-kodierter Proteine in Grünalgen und höheren Pflanzen ist bekannt, dass ein N-terminales topogenes Signal, das sogenannte Transitpeptid, die Funktion des zielgerichteten Transportes von plastidenbestimmten Proteinen einleitet (Soll & Tien, 1998). Nucleomorph-kodierte Proteine besitzen ebenfalls eine N-terminale Extension für solche Proteine (siehe Kap.3.1.3). Diese Extension weist die gleichen Eigenschaften wie Transitpeptide höherer Pflanzen auf: So konnten zum Beispiel mit Serin und Threonin Aminosäuren identifiziert werden, die eine Phosphorylierung des N-Terminus erlauben. An Transitpeptiden höherer Pflanzen konnte nachgewiesen werden, dass das Kriterium der Phosphorylierung von essentieller Bedeutung für die Funktion ist (Waegemann & Soll, 1996).

Das Nucleomorph in *G. theta* ist der extrem reduzierte Nucleus des Endosymbionten, dessen Restgenom einen gemeinsamen Vorfahren mit den Rotalgen besitzt, wie 18S-rRNA-Analysen gezeigt haben (Douglas et al., 1991, Maier et al., 1991; Van de Peer et al., 1996). Für einen Vergleich der Nucleomorph-kodierten N-terminalen Extensionen stehen nur wenig Beispiele Kern-kodierter plastidärer Proteine aus Rotalgen zur Verfügung. Die Funktionalität einer N-terminalen Extension als Transitpeptid eines Präproteins aus Rotalgen ist erstmalig von Apt et al. (1993) durch die Fusion des N-Terminus der  $\gamma$ -Untereinheit des Phycoerythrins aus *Aglaothamnion neglectum* mit der kleinen Untereinheit der RubisCO aus Erbse und deren Import in Erbsenchloroplasten gezeigt worden.

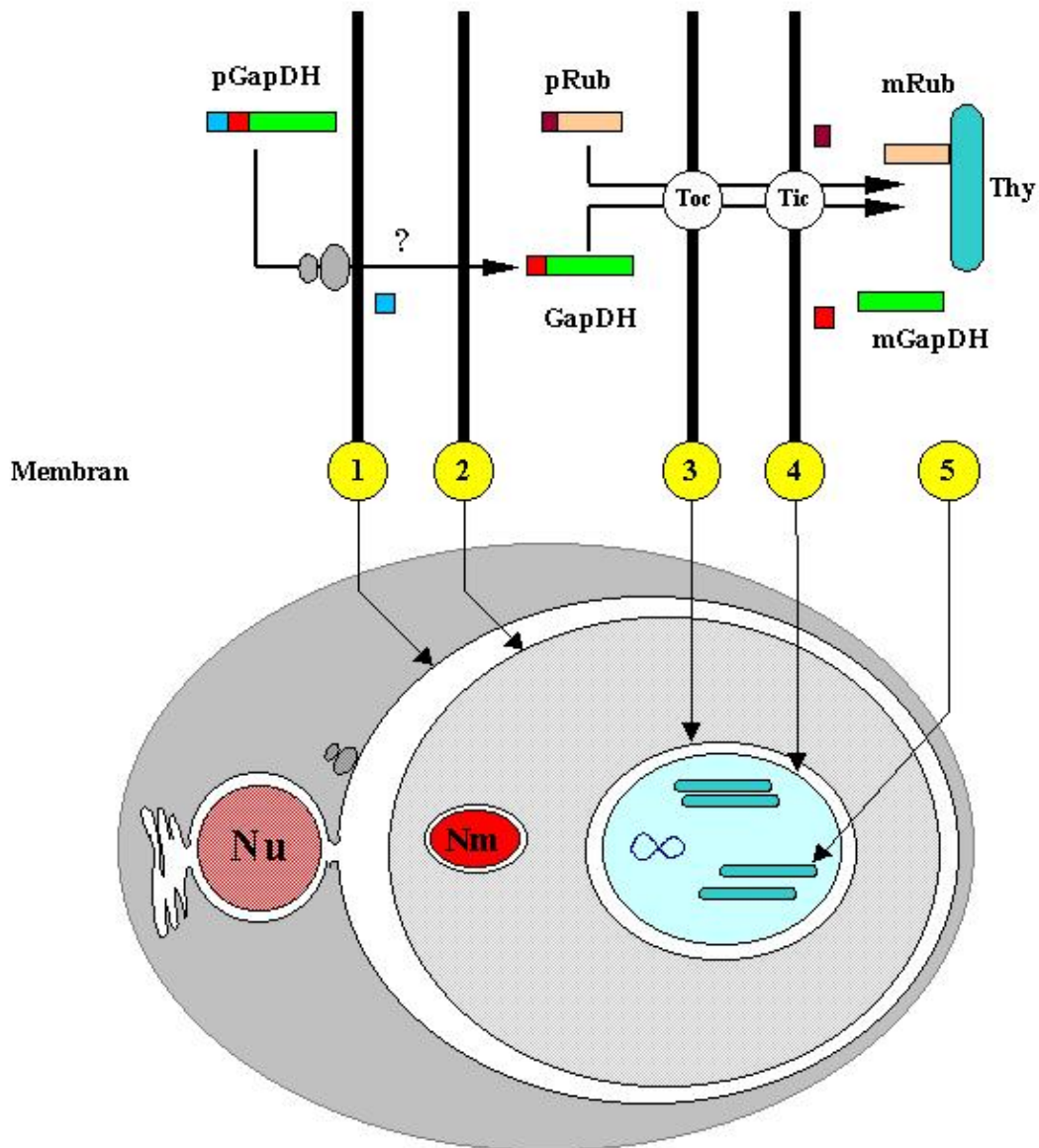
In dieser Arbeit konnte sowohl in Erbsenchloroplasten als auch in *G. theta* Plastiden mit Rubredoxin erstmals ein Präprotein aus einem Organismus der Chlorophyll *alc*-Linie importiert werden. Damit wurde *in vitro* die Funktion des N-Terminus eines Nucleomorph-kodierter Präproteins als Transitpeptid und eine plastidäre Lokalisation des Genprodukts nachgewiesen.

Ausgehend von einer Gesamtzahl von ca. 2000–3000 unterschiedlichen Proteinen in einer Plastide (Martin & Herrmann, 1998), reichen die Nucleomorph-kodierten (35 Orfs, Tab. 3–1; Tab. 3–2) zusammen mit den 130

Plastom-kodierten Orfs der Plastide von *G. theta* (Douglas & Penny, 1999) bei weitem nicht für die Aufrechterhaltung der Plastidenfunktionen in diesem Organismus aus. Daher muss ein Grossteil der plastidären Funktionen im Nucleus der Cryptomonade kodiert sein. In *G. theta* wurden bisher die Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase (GapDH; Liaud et al., 1997) und das *light harvesting complex protein* (LHCP; Durnford et al., 1999) beschrieben. Diese Proteine müssen neben der Plastidenhülle zwei weitere Membranen überqueren (siehe Abb. 4–1).

Im Gegensatz zu den Nucleomorph-kodierten besitzen diese Kern-kodierten Proteine N-terminal ein zweigeteiltes Transitpeptid. Dieses beginnt mit einem Bereich mit Ähnlichkeiten zu einer Endoplasmatischen Retikulum Signalsequenz und daran anschliessend, einem Transitpeptid zum Transport über die *plastid envelope*. Der initiale Schritt der Translokation Kern-kodierter Proteine in die komplexe Plastide von *G. theta* ist die kotranslationale Insertion an der ersten Membran der komplexen Plastide, was experimentell mit der *G. theta* GapDH an Mikrosomen *in vitro* verifiziert wurde (siehe Kap.3.4.2; Wastl & Maier, eingereicht). Auch bei der  $\gamma$ -Untereinheit der plastidären ATPase aus *Odontella sinensis*, die ebenfalls ein zweigeteiltes Transitpeptid besitzt, konnte gezeigt werden, dass der initiale Schritt zur Translokation in das Stroma der komplexen Plastide kotranslational erfolgt (Lang et al., 1998). Damit beschreiten die für das Stroma der komplexen Plastide bestimmten Proteine des Wirtes anfangs den sekretorischen Weg, der definitionsgemäss als Export bezeichnet wird (Schatz & Dobberstein, 1996).

Zusätzliche Evidenz für die kotranslationale Initiation des Transportes Kern-kodierter Plastidenfunktionen in *G. theta* liefern elektronenmikroskopische Daten: So bildet die äusserste Membran der komplexen Plastide in Cryptomonaden ein Kontinuum mit der Kernhülle (und damit mit dem ER) und ist mit Ribosomen besetzt (McFadden et al., 1994). Versuche mit dem Pilztoxin Brefeldin A (Chardin & McCormick, 1999) zeigen, dass bei Inkubation von *G. theta* Zellen mit Brefeldin A der Intermembranraum zwischen der ersten und der zweiten Membran wie ein ER-Lumen in Anwesenheit von Brefeldin A anschwillt (Wastl & Maier, eingereicht). Dieser Effekt von Brefeldin A auf das ER wurde mehrfach in der Literatur beschrieben (Yasuhara et al., 1995; Matsuoka et al., 1995).



**Abb 4-1: Schematische Darstellung des Plastiden-targeting in *G. theta*.**

Abkürzungen: Nu: Nucleus; Nm: Nucleomorph; GapDH: Glycerinaldehydphosphat-Dehydrogenase; Rub: Rubredoxin; Thy: Thylakoid; Toc: Translocon outer chloroplast membrane; Tic: Translocon inner chloroplast membrane; p bzw. m vor dem Protein bezeichnen die Präproteinform bzw. das reife Protein.

- ■ zweigeteiltes Transitpeptid
- Signalsequenz
- Transitpeptid (Nucleus)
- Transitpeptid (Nucleomorph)

Nach kotranslationaler Insertion in Mikrosomen konnte eine Prozessierung des GapDH-Präproteins beobachtet werden (siehe Kap.3.4.2). Die Abspaltung der Signalsequenz führt zur Freisetzung des C-terminalen Anteils des zweigeteilten Transitpeptids. Für diesen wurde der funktionelle Nachweis als Transitpeptid der *G. theta* GapDH sowohl im homologen als auch heterologen System erbracht (siehe Kap.3.4.3; Kap.3.4.4). Dies bedeutet für das Plastiden-targeting Kern-kodierter Proteine in *G. theta*, dass

zum einen das Plastiden-*targeting* in die komplexe Plastide durch eine Kombination von Translokationsereignissen bewerkstelligt wird und dabei bereits etablierte Wege des Proteintransportes benutzt werden. Zum anderen sind die Signalsequenz und das Transitpeptid notwendig und hinreichend, das *targeting* sowohl über die erste, als auch die beiden innersten Membranen zu bewerkstelligen.

Damit ist aber die Translokation an der zweiten Membran, die die cytoplasmatische Membran des Endosymbionten darstellt (Whatley et al., 1979, Cavalier-Smith, 1982) nicht geklärt (Abb.4-1). Über eine Proteintranslokationsmaschinerie in dieser Membran ist bislang nichts bekannt. Für das topogene Signal der Nucleus-kodierten Proteine, die in das Stroma dirigiert werden müssen, ergeben sich für den Transport über diese zweite Membran der komplexen Plastide folgende Alternativen:

a) Existenz bislang unbekannter topogener Signale

Primärsequenzvergleiche der hoch konservierten GapDH zeigen keine zusätzlichen Signale der plastidären GapDH in *G. theta* im Vergleich zu den plastidär lokalisierten GapDH-Proteinen höherer Pflanzen oder der Rotalgen (Liaud et al., 1997). Aus diesem Grund scheint ein zusätzliches topogenes Signal im Sinne einer Primärsequenz unwahrscheinlich. Der N-Terminus der *G. theta* GapDH selbst besitzt neben dem zweigeteilten Transitpeptid keine zusätzlichen topogenen Signale. Das Beispiel der kleinen Untereinheit der RubisCO aus *Pisum sativum* zeigt jedoch, dass topogene Signale für den Transport in Plastiden nicht nur am N-Terminus des Proteins lokalisiert sein müssen. Unlängst wurden C-terminale Aminosäurebereiche dieses Präproteins charakterisiert, die in Interaktion mit der Importmaschinerie stehen und den Import beziehungsweise dessen Effizienz beeinflussen (Dabney-Smith et al., 1999). Ob *G. theta* GapDH auch solche Domänen besitzt und ob jene ausreichend für einen Transport über die zweite Membran wären, ist nicht geklärt.

b) Translokation an einer Pore

Alternativ wurde für den Transport über die zweite Membran von Lang et al. (1998) eine Pore diskutiert, die unspezifisch den Proteinen die Passage durch diese Membran ermöglichen sollte. Dies ist unwahrscheinlich, da eine Pore aufgrund fehlender Spezifität zu einer Vielzahl fehlgeleiteter Proteine vom ER-Lumen in das periplastidäre Kompartiment führen würde. Zudem bleibt auch die Fragen unbeantwortet, wie im Falle einer Pore das Zellmilieu des periplastidäres Kompartimentes aufrechterhalten werden sollte.

c) Mehrfachverwendung der Signalsequenz

Theoretisch könnte die Signalsequenz auch das topogene Signal für die Translokation an der zweiten Membran darstellen. Aus der Literatur ist bekannt, dass Signalsequenzen nicht nur für den Export an einer Membran fungieren, sondern durchaus variabel und vielfältig in ihrer Funktion sein können (Martoglio & Dobberstein, 1998). Um die Translokation an der zweiten Membran zu initiieren, müsste die Signalsequenz am Präprotein verbleiben und erst nach Transport über die zweite Membran abgespalten werden. Gegen diese Hypothese sprechen jedoch die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur kotranslationalen Insertion der GapDH in Mikrosomen, bei denen das Präprotein prozessiert wird (siehe Kap.3.4.2). Auch bei Untersuchungen zum Transport der plastidenlokalisierten  $\gamma$ -Untereinheit der ATPase in *Odontella sinensis* wurde ein Prozessieren der Präproteins nach kotranslationalem Import in Mikrosomen beobachtet (Lang et al., 1998).

Eine sofortige Prozessierung des Präproteins nach Übertritt an der ersten Membran schließt eine Signalsequenz-vermittelte Translokation über die zweite Membran jedoch nicht aus. Möglich wäre ein gekoppelter Transport über die Membran eins und zwei. Dies würde aber zu einer Vielzahl fehlgeleiteter Proteine führen. Es würden Proteine, die z.B. für die Exocytose bestimmt sind, in das periplastidäre Kompartiment transportiert, das nicht deren Zielort darstellt.

Die vorliegenden experimentellen Befunde lassen vermuten, dass zwischen Membran eins und zwei (Abb.4-1) lediglich das Transitpeptid als topogenes Signal für die Plastiden-bestimmten Proteine vorliegt. Anhand dieses Signals könnte auch eine Unterscheidung im Lumen zwischen den der ersten und zweiten Membran (Kontinuum mit dem ER-Lumen) erfolgen. Dort befindet sich eine Vielzahl an Proteinen, die mit unterschiedlichen Signalen versehen sind. Nur Proteine mit dem plastidärer Lokalisation besitzen ein derartiges Signal. Damit könnte ein spezifischer Transport über die zweite Membran erfolgen, unter der Voraussetzung, dass das Transitpeptid nicht vom Präprotein abgespalten wird. Ansonsten wäre die Information für die Translokation an den beiden inneren Membranen nicht mehr vorhanden. Dass das Transitpeptid den Import in das Stroma bewerkstelligt, konnte anhand der Importstudien mit GapDH in *G.*

*theta* Plastiden gezeigt werden (siehe Kap.3.4.4).

Zweigeteilte Transitpeptide sind auch für Kern-kodierte plastidäre Proteine anderer Algengruppen beschrieben worden, die aus sekundären Endocytobiosen entstanden sind. So zeichnen sich Vertreter der Euglenophyta und Dinophyta durch komplexe Plastiden aus, die nur von drei Membranen umgeben sind. Diese komplexen Plastiden besitzen kein periplastidäres Kompartiment und kein Nucleomorph und sind als Reduktion von Vier-Membran-Plastiden (nach sek. Endocytobiose) zu erklären (Schwartzbach et al., 1998). In *Euglena* sind Kern-kodierte plastidäre Proteine bekannt, die sich durch eine mehrfache tandemartige Aneinanderreihung der Aminosäuresequenz des reifen Proteins auszeichnen. Die Besonderheit dieser Präproteine, den sogenannten Polyproteinen, besteht darin, dass sie nur ein zweigeteiltes Transitpeptid am N-Terminus des Präproteins besitzen, wie erstmals am Beispiel der kleinen Untereinheit der RubisCO aus *Euglena* gezeigt wurde (Chan et al., 1990). Diese Polyproteine wurden bislang nur in Euglenophyta und Dinoflagellaten beschrieben.

In *Euglena* wurden erstmals *in vivo* Untersuchungen zum Plastiden-targeting von Präproteinen durchgeführt. Mittels *pulse-chase* Experimenten zur Proteinmarkierung und anschließender Subfraktionierung konnte die Beteiligung des sekretorischen Weges zu Beginn des Plastiden-targeting in Drei-Membran-Plastiden nachgewiesen werden (Sulli & Schwartzbach, 1995). Ein Vesikelfluss vom Golgi-Apparat zur komplexen Plastide wird daher für *Euglena* mit Drei-Membran-Plastiden postuliert (Sulli & Schwartzbach, 1995; Schwartzbach et al., 1998), wonach die Vesikel mit der äussersten der drei Membranen fusionieren und die Präproteine zwischen der ersten und der zweiten Membran der komplexen Plastide freisetzen. Der Transport der Präproteine über die beiden inneren Membranen wird von dem Transitpeptid vermittelt.

Ein Fusion von Vesikeln mit der äussersten der vier Membranen in *G. theta* ist unwahrscheinlich, da die äusserste Membran mit Ribosomen besetzt ist und eine Abschnürung von Vesikeln in der komplexen Plastide von *G. theta* den Ergebnissen zur Proteintranslokation von GapDH an den *plastid envelopes* der Erbsenchloroplasten und der *G. theta* Plastiden widerspricht.

Aufgrund des Kontinuums der äusseren Membran mit der Kernhülle und dem ER können keine intakte komplexe Plastiden mit 4 Membranen aus *G. theta* isoliert werden (Abb. 4-1). Molekularbiologische Ansätze zur Transformation von *G. theta* sind bislang nicht etabliert.

Eine Möglichkeit, den Vier-Membran-Transport dennoch *in vivo* analysieren zu können, zeigen Untersuchungen zum Protein-targeting in *Toxoplasma gondii*, einem obligat intrazellulären Parasiten, der mit dem sogenannten Apicoplast eine photosynthetisch inaktive komplexe Plastide besitzt, die von vier Membranen umgeben ist (McFadden et al., 1996; Köhler et al., 1997; McFadden & Waller, 1997). Kern-kodierte und Apicoplast-lokalisierte Proteine sowohl in *Toxoplasma gondii* als auch *Plasmodium falciparum* besitzen ebenfalls eine N-terminale zweigeteilte Transitpeptidsequenz wie an Präproteinen für die Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Reduktase (FNR) und für die Fettsäurebiosynthese FabH und FabZ gezeigt werden konnte (Vollmer, 1999; Waller et al., 1998). *Toxoplasma* bietet die Möglichkeit das Apicoplast-targeting *in vivo* mittels Konstrukten mit dem *Green Fluorescent Protein* zu untersuchen (Striepen et al., 1998). Anhand von verschiedenen Fusionsproteinen der topogenen Signale von FabH mit GFP konnte *in vivo* dessen Lokalisation gezeigt werden (Waller et al., 1998). Damit konnte nachgewiesen werden, dass in *Toxoplasma gondii* das zweigeteilte Transitpeptid notwendig und ausreichend ist, Proteine über vier Membranen zu translozieren.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass in der Cryptomonade *G. theta* sowohl Kern-kodierte als auch Nucleomorph-kodierte plastidäre Funktionen in die Plastide importiert werden. Dazu werden Präproteine synthetisiert, die nach Translokation über die Plastidenhülle durch Entfernen des Transitpeptides zu reifen Proteinen prozessiert werden (Kap.3.2.2.2; Kap.3.4.3; Kap.3.4.4). Vermittelt wird die Translokation an den beiden inneren Membranen in *G. theta* durch das Transitpeptid Nucleomorph-kodierter Präproteine und die C-terminale Domäne des zweigeteilten Transitpeptids Kern-kodierter Präproteine (Abb. 4-1).

#### **4.1.2 Existenz einer Importmaschinerie in den beiden inneren Membranen der komplexen Plastide**

Diese Arbeit beschreibt erstmals den *in vitro* rekonstituierten homologen Transport von plastidär lokalisierten Proteinen in Chlorophyll *a/c* haltigen Organismen. Mit der Etablierung des Imports im homologen System in *G. theta* steht ein System zur Verfügung, das neben der Importmaschinerie in Plastiden Chlorophyll *a/b* haltiger Pflanzen (siehe Einleitung), homologe Translokationsstudien sowohl Kern-kodierter als auch Nucleomorph-kodierter plastidärer Proteine in *G. theta* erlaubt.

In der Chl. *a/c* Linie und in Rotalgen ist über eine Importmaschinerie respektive deren Komponenten in den Plastidenmembranen nichts bekannt. Bislang existiert kein Genomprojekt an Rotalgen, das Aufschluss über Gene geben könnte, die Proteine des Translocons kodieren. Damit stellt die komplette Sequenz des Nucleomorphs, das Restgenoms des Endosymbionten, die ersten Sequenzdaten bezüglich Rotalgengenomen dar. Wie in der Tab. 3-1 und Tab. 3-2 gezeigt, sind mit Tic22 und Iep110 zwei Homologe zu bekannten Komponenten der Translokationsmaschinerie auf dem Nucleomorph kodiert. Neben NmTic22 sind lediglich drei andere Tic22 bekannt, davon ein cyanobakterielles Homolog in *Synechocystis* (Kouranov et al., 1998; Bevan, M et al., 1999; May & Soll, 1999). Nm-Iep110 stellt das erste Sequenzhomolog zu der erstmals aus Erbse identifizierter Komponente des Tic-Translocons dar (Lübeck et al., 1996). Für Iep110 existiert kein bislang bekanntes Homolog in Cyanobakterien. Es wird angenommen, dass neben Iep110 die meisten Komponenten der Translokationsmaschinerie auf Entwicklungen eukaryoter Organismen zurückzuführen sind, da bislang keine Proteinimportmaschinerie in prokaryoten Plasmamembranen bekannt sind (Heins & Soll, 1998).

Damit stellen Nm-Tic22 und Nm-Iep110 die beiden ersten identifizierten Komponenten des Plastiden-Translocons in *G. theta* beziehungsweise der Chl. *a/c* Linie dar. Deren Ähnlichkeiten zu bekannten Komponenten des Modell-Translocons in Erbse legen den Schluss nahe, dass eine Importmaschinerie bzw. Komponenten dieses Translocons keine erstmalige Entwicklung in der Chl. *a/b* Linie war, sondern bereits in einem frühen Stadium der primären Endosymbiose eine Importmaschinerie in der *plastid envelope* evolvierte.

Nach sekundärer Endocytobiose und im Zuge der Reduzierung des Endosymbionten zum periplastidären Kompartiment und zum Nucleomorph wurden die meisten Komponenten der Maschinerie funktionell von Kern-kodierten Proteinen ersetzt. Ob parallel zur Reduktion des Endosymbionten-Nucleus ein Gentransfer dieser Komponenten und aller anderen plastidären Funktionen auf den Zellkern der Wirtszelle erfolgte, oder der Wirt über einen lateralen Gentransfer das Genmaterial für diese Proteine erhalten hat, wird später diskutiert.

Die zunehmende Fülle an Sequenzdaten aus pflanzlichen Genomprojekten und deren funktionelle Analyse werden die Import-Komplexe strukturell und funktionell näher charakterisieren. *Cross-linking* Experimente, mit denen bereits Intermediate der Proteintranslokation fixiert und beteiligte Proteine, wie zum Beispiel Oep86 und Iep110, identifiziert werden konnten (Akita et al., 1997), repräsentieren eine Möglichkeit, weitere Komponenten des Translocons in den beiden inneren Membranen der komplexen Plastide von *G. theta* zu identifizieren. Die Sequenzdaten und die Experimente in dieser Arbeit zum Import der Präproteine in die Plastide (Kap.3.2, Kap.3.4) lassen vermuten, dass in den beiden inneren Membranen der komplexen Plastide eine Importmaschinerie vorhanden ist, die den bisher bekannten und charakterisierten aus Chl. *a/b* haltigen Pflanzen funktionell äquivalent ist.

Zusätzliche Wege für die Translokation von Proteinen sind damit jedoch nicht ausgeschlossen. So ist zum Beispiel über den Import von Proteinen in den Intermembranraum bislang wenig bekannt. Es existieren hierfür mindestens zwei Möglichkeiten des Protein-*targeting*: Zum einen konnte an OEP75 gezeigt werden, dass nach dem Import in das Stroma der Plastide ein Export in den Intermembranraum und in die äussere Membran erfolgt (Tranel & Keegstra, 1996). Zum anderen existiert eine direkte Insertion des Proteins in die *outer* oder *inner envelope*. Dieser Weg wird z.B. für Oep86 in der *outer envelope* (Muckel & Soll, 1996) und für Tic22 in der *inner envelope* von Chloroplasten aus *Arabidopsis thaliana* beschrieben (Kouranov et al., 1999). Ob dieser auch für NmTic22 zutrifft, bleibt zu überprüfen.

### 4.1.3 Prozessierung der Präproteine

Nach dem Import über die *plastid envelope* werden die Proteine von Chaperonen in ihren nativen Zustand überführt (May & Soll, 1999). Vor der Überführung in seine aktive Form wird das Präprotein von einer stromalen Signalpeptidase (SSP) durch Abspaltung des Transitpeptides zum reifen Protein prozessiert.

Gavel & von Heijne (1991) verglichen die N-Termini plastidärer Präproteine und ermittelten einen "Konsensus" für eine Schnittstelle, die das Motiv V/I-X-A/C aufweist. Anhand der Primärsequenz der in dieser Arbeit importierten Proteine kann im Falle der GapDH eine Prozessierungsstelle zwischen Aminosäure 37 und 38 des Präproteins detektiert werden (Suchalgorithmus ChloroP; Kap.2.1.15). Für Rubredoxin, wie auch für weitere Nucleomorph-kodierte Präproteine, existiert dieses Motiv nicht. Die Prozessierung könnte durch eine alternative SSP vollzogen werden, die spezifisch die vom Nucleomorph-kodierten plastidären Präproteine im Stroma der komplexen Plastide von *G. theta* prozessiert. Die Ergebnisse zum Import in Erbsenchloroplasten zeigen jedoch, dass auch in diesem heterologen System Rubredoxin-Präprotein aus *G. theta* verkürzt wird (siehe Kap.3.2.1). Theoretisch ergeben sich daher zwei Alternativen: Entweder existiert auch in Erbsenchloroplasten eine weitere SSP, oder die Schnittstelle beziehungsweise ihre Umgebung zeichnet sich vielmehr durch strukturelle Eigenschaften aus (im Falle der Transitpeptide durch deren "random coil"; von Heijne & Nishikawa, 1991). Die "Strukturlosigkeit" von Transitpeptiden wurde mit spektroskopischen Methoden (NMR, CD-Spektroskopie) am Ferredoxin-Präprotein aus *Silene pratensis* untersucht und bestätigt (Wienk et al., 1999).

Anhand der Importsstudien mit Rubredoxin lässt sich die Lage der Prozessierungsstelle auf ca. 50 Aminosäuren nach Translationsstart eingrenzen. Ein Vergleich der C-terminalen Bereiche der Transitpeptide von Rubredoxin und weiteren NmOrfs zeigt eine Häufung von Arginin und Lysin (siehe Kap.3.1.3). Deren Anordnung, beziehungsweise ein Wechsel von hydrophiler zu hydrophober Umgebung könnte ein Motiv für eine SSP darstellen. So konnten Clark & Lamppa (1991) am LHCP-Präprotein aus Erbse zeigen, dass basische Aminosäuren im Transitpeptid essentiell sind, um das Präprotein zu prozessieren. Durch gezieltes Einfügen von basischen Aminosäuren (Lysin oder Arginin) konnten die Autoren eine Prozessierung weiterer Präproteine aufgrund dieses basischen Aminosäure-Motivs zeigen.

#### 4.1.4 Thylakoid-targeting in *Guillardia theta*

Plastiden zeichnen sich durch ein internes Membransystem aus, dem sogenannten Thylakoidmembransystem, in dem unter anderem auch die Prozesse der Photosynthese ablaufen. Komponenten der Photosystemkomplexe I und II und andere Proteine, die im Lumen der Thylakoide oder integral in deren Membran verankert sind, werden zumeist mit Hilfe von plastidären Exportmechanismen an ihren Zielort transloziert (Robinson et al., 1998): Neben Transportwegen, die sich bakterieller Komponenten bedienen (z.B. Sec-abhängiger Weg; SRP-abhängiger Weg), wurde auch spontaner Export am Beispiel der PS II-Komponente PsbW aus Spinat beschrieben (Lorkovic et al., 1995).

Durch die Erstellung einer EST-Datenbank von *G. theta* sind mit LHCP und der  $\alpha$ -Untereinheit des Phycoerythrins (CpeA) zwei Kern-kodierte Thylakoid-Proteine auf Transkriptebeine nachgewiesen worden (Fraunholz, Zauner, Dübel, persönliche Mitteilungen). CpeA zeichnet sich wie die GapDH durch den Besitz eines zweigeteilten Transitpeptides aus. Das Präprotein besitzt zusätzlich an dessen C-terminalen Ende ein potentiell Thylakoid-targeting Signal (*twin-arginine* motif; Brink et al., 1998). Damit stellt die N-terminale Extension des CpeA ein dreigeteiltes Transitpeptid dar.

Im Gegensatz zu CpeA konnte in der Sequenz von LHCP kein Thylakoid-targeting Signal identifiziert werden. Auchincloss et al. (1992) konnten zeigen, dass LHCP kein zusätzliches Signal benötigt, um in der Thylakoidmembran inseriert zu werden. Im Falle von LHCP ist es dennoch kein rein spontaner Prozess der Insertion. Schuenemann et al. (1998) konnten einen sogenannten "Transit Komplex" identifizieren, der aus LHCP und stromalen Faktoren bestand, der die Insertion des LHCP in die Thylakoidmembran vermittelt.

Kern-kodierte, Thylakoid-lokalisierte Proteine in *G. theta* müssen somit fünf Membranen überqueren, um an ihren Zielort zu gelangen, im Gegensatz zu Nucleomorph-kodierten thylakoid-lokalisierten Proteinen, die drei Membranen zu überqueren haben.

Die Sequenzanalyse des Nucleomorphgenoms zeigt, dass dieses mit Rubredoxin, Ycf48 und SecE mindestens drei Thylakoidproteine kodiert. So stellt Ycf48 ein Protein dar, für das in *Arabidopsis thaliana* eine lumenale Lokalisation nachgewiesen wurde (Meurer et al., 1998), während SecE ein integrales Thylakoidmembranprotein darstellt, das an der Proteintranslokation an der Thylakoidmembran beteiligt ist (Schuenemann et al., 1999).

Das in dieser Arbeit untersuchte Nucleomorph-kodierte Rubredoxin ist ebenfalls in der Thylakoidmembran verankert (siehe Kap.3.3.3.2), wobei die Eisen-komplexierende Domäne stroma-orientiert ist (siehe Kap.3.3.3.4). Die Primärstruktur zeigt kein bislang in der Literatur beschriebenes Thylakoid-*targeting* Signal.

Möglicherweise liegt im reifen Rubredoxin die Information für die zielgerichtete spezifische Insertion in die Thylakoidmembran vor. In allen Rubredoxinen aus Organismen mit oxygener Photosynthese ist der Aminosäurebereich zwischen der Eisenbindedomäne und dem Membrananker (siehe Abb. 3–9) konserviert. Dieser könnte als spezifisches Thylakoid-*targeting* Signal fungieren. In der Literatur sind mehrere Proteine beschrieben, deren gerichtete Insertion in das vielfältige plastidäre Membransystem durch Bereiche des reifen Proteins vermittelt werden. So konnte durch gezielte Deletion von Bereichen eines 37 kDa *plastidinner envelope* Proteins aus Spinat ein falsches *targeting* des reifen Proteins beobachtet werden (Brink et al., 1995).

## 4.2 Rubredoxin in Organismen mit oxygener Photosynthese

In dieser Arbeit wurde erstmals ein auf einem eukaryoten Genom kodiertes Rubredoxin auf molekularbiologischer und proteinbiochemischer Ebene charakterisiert. Die Zuordnung zur Klasse der Rubredoxine beruht auf der konservierten, zentralen Domäne, die mittels 4 Cysteinen ein mononukleares Eisen chelatiert. Der experimentelle Nachweis eines immunreaktiven Proteins mit Rubredoxin Antiserum belegt die Translation des *G. theta* Rubredoxins (siehe Kap.3.3.3). In dieser Arbeit konnte auch gezeigt werden, dass Rubredoxin nicht nur in *G. theta*, sondern auch in anderen phototrophen Organismen synthetisiert wird und plastidär lokalisiert ist (siehe Kap.3.3.3.1; Kap.3.3.3.3).

Neben der N-terminalen Extension, die in dieser Arbeit als Transitpeptid charakterisiert wurde (siehe Kap.3.2.1; Kap.3.2.2.2), besitzt das kleine "Nicht-Häm-Eisen"-Protein einen C-terminalen Membrananker (siehe Kap.3.3.1). Nur Rubredoxine cyanobakterieller und weiterer Organismen, die zu oxygener Photosynthese befähigt sind, besitzen diese Extension. Der Nachweis der Insertion in der Thylakoidmembran (siehe Kap.3.3.3.2) legt die Vermutung nahe, dass Rubredoxin im Zusammenhang mit Photosynthese oder damit verknüpften Reaktionen steht. Weiterführende Analysen ergaben eine Assoziation mit dem Photosystem II (PS II) Komplex. Dies konnte anhand von immunologischen und elektronenmikroskopischen Daten (siehe Kap.3.3.3.3) gezeigt werden.

Die vergleichende Kofaktoruntersuchung an rekombinanten Rubredoxin und gereinigten PS II Komplexen aus *Spinacia oleracea* kommt zu dem gleichen Ergebnis: Anhand von EPR-Messungen konnte in Rubredoxin ein Redox-aktives Eisen detektiert werden (siehe Kap.3.3.4.2). Die Signale des mononuklearen Eisens ( $g=4,3$ ;  $g=9,6$ ) sind identisch mit denen bislang charakterisierter Rubredoxine aus Eubakterien (Eidsness et al., 1999). Ein Eisensignal mit  $g=4,3$  wurde auch in EPR-Messungen an PS II-Präparationen detektiert, das als Stärkeverunreinigung diskutiert wurde (Miller & Brudvig, 1991). Die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen zeigen, dass die EPR-Spektren von gereinigten PS II-Dimeren und von *G. theta* Rubredoxin unter identischen Bedingungen ebenfalls das gleiche Eisensignal zeigen (siehe Kap.3.3.4.2). Damit unterstützt die spektrale Analyse die Ergebnisse zur Assoziation von Rubredoxin mit PS II mittels *in situ*-Lokalisation und Immundetektion.

In einer elektronenkristallographischen Untersuchung an PS II (Rhee et al., 1998) wurde Rubredoxin nicht als integrale Strukturkomponente in dem PS II-Komplex identifiziert. In der mit 8 Ångström aufgelösten Struktur konnten jedoch nur 3 von mindestens 25 Komponenten des PS II eindeutig identifiziert (Rhee et al., 1998). Dieser untersuchte Komplex besaß keine wasserspaltende Aktivität mehr (Rhee et al., 1998), was auf das Fehlen maßgeblicher Komponenten von PS II zurückzuführen ist. In Proteinextrakten aus angereicherten PS II-Dimeren, die über eine wasserspaltende Aktivität verfügen (Dörner, 1999) konnte in dieser Arbeit mit polyklonalem Rubredoxin Antiserum (siehe Kap.3.3.2) ein Protein spezifisch detektiert werden, dessen



molekulare Masse dem des Rubredoxins entspricht (siehe Kap.3.3.3.3). Eine direkte Beteiligung von Rubredoxin an der Wasserspaltung ist jedoch unwahrscheinlich, da die dafür notwendigen Komponenten im Thylakoidlumen lokalisiert sind (Seibert et al., 1987), Rubredoxin aber mit seiner katalytischen Domäne stromaorientiert ist (siehe Kap.3.3.3.4).

Einen weiteren Hinweis für eine Beteiligung von Rubredoxin an PS II assoziierten Prozessen liefert die Sequenzanalyse des Chromosoms von *Synechocystis* sp. PCC6803 (Kaneko et al., 1996). Auf dessen Chromosom sind die Gene *rub* und *ycf48* in einem potentiellen Operon mit den Genen *psbEFLJ* angeordnet. Sowohl für Ycf48, der auch auf dem Nucleomorph-Chromosom II kodiert (siehe Tab.3-1), als auch für PsbE wurde eine Funktion in der PS II-Assemblierung nachgewiesen (Meurer et al., 1998; Morais et al., 1998). Eine Funktion von Rubredoxin im *assembly* von PS II ist somit nicht auszuschließen. Der lumenale Assemblierungsfaktor Ycf48 ist lediglich in Stromathylakoiden, aber nicht in Granathylakoiden mit PS II immunologisch nachweisbar (Meurer et al., 1998). Rubredoxin liegt jedoch stets im gleichen prozentualen Verhältnis zu PS II in der Thylakoidmembran vor (siehe Kap.3.3.3.3). Deshalb ist eine reine Assemblierungsfunktion von Rubredoxin an PS II, wie sie für Ycf48 gezeigt wurde, unwahrscheinlich.

Im Zusammenhang mit der Identifizierung der Funktion liefert die Analyse der Aminosäuresequenz des Rubredoxins aus *G. theta* weitere Hinweise: Zwischen der stromal orientierten zentralen Domäne und dem Membrananker befindet sich ein ca. 20 Aminosäuren langer Bereich, (siehe Kap.3.3.1; Wastl et al., eingereicht), der in allen bislang bekannten Rubredoxinen aus Organismen mit oxygener Photosynthese hoch konserviert ist. Diese Domäne könnte für eine Interaktion mit einem anderem Protein verantwortlich sein. So könnte der Bereich für eine Proteininteraktion zur spezifischen Insertion von Rubredoxin in die Thylakoidmembran (als Thylakoid-*targeting* Signal; siehe Kap.4.1.4) notwendig sein oder mit einem Protein interagieren, das in metabolischem Zusammenhang mit Rubredoxin steht.

Untersuchungen zur Funktion von Rubredoxinen in Eubakterien zeigen eine grosse funktionelle Vielfalt dieser Nicht-Häm-Eisen-Proteine: So sind Rubredoxine als Redoxpartner zum Beispiel an der Alkanoxidation in *Acinetobacter* sp. ADP1 (Geissdörfer et al., 1999), in Hydrogenasen in *Ralstonia eutropha* (*Alcaligenes eutrophus*; Kortluke et al., 1994) und in der Methanogenese in *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Nölling et al., 1995) beteiligt. Vor kurzem konnte die Funktion des Rubredoxins in einem anaerob phototrophen grünen Schwefelbakterium (Yoon et al., 1999) bestimmt werden: In *Chlorobium tepidum* ist Rubredoxin an der Decarboxylierung von Pyruvat zu Acetyl-CoA und Kohlendioxid beteiligt, indem Rubredoxin als Elektronenakzeptor der Pyruvat-Ferredoxin-Oxidoreduktase dient.

Die Beispiele zeigen, dass Rubredoxin als Redox-aktives Protein an vielfältigen Reaktionen beteiligt ist. Deshalb wäre eine von Rubredoxin katalysierte Redoxreaktion, die Elektronen aus PS II bezieht, in Organismen mit oxygener Photosynthese durchaus denkbar. Die EPR-Messungen bestätigen eine Redox-aktive Form des Eisens in rekombinanten Rubredoxin (siehe Kap.3.3.4.2).

Eine mögliche Funktion von Rubredoxin in der Thylakoidmembran von *G. theta* (und anderen aerob phototrophen Organismen) könnte eine Beteiligung als Redoxpartner im Xanthophyll-Zyklus sein. Im Xanthophyll-Zyklus wird auf der stromalen Seite der Thylakoidmembran Zeaxanthin (9 Doppelbindungen) zu Violaxanthin (7 Doppelbindungen) epoxidiert, wohingegen im Lumen der Thylakoide die De-Epoxidierung stattfindet (Demmig-Adams & Adams III, 1996). Diese Reaktionen bilden eine Schutzfunktion für PS II gegen Photoinhibition. Rubredoxin, das nachweislich stromal orientiert ist (siehe Kap.3.3.3.4), könnte als Elektronendonator für die Epoxidation der stromalen Reaktion dieses Zyklusses dienen.

Eine weitere Möglichkeit wäre eine Beteiligung an der Fettsäurebiosynthese, die auch einen maßgeblichen Effekt auf den *turnover* der PS II-Strukturkomponente D1 hat (Sippola et al., 1998). So konnte am Beispiel des Cyanobakteriums *Synechococcus* gezeigt werden, dass der Sättigungsgrad der Fettsäuren in der Membran die Integrität intakter PS II-Komplexe beeinflusst. Durch eine Beteiligung am Fettsäuremetabolismus könnte Rubredoxin eine assemblierende und regulative Funktion in der Biogenese von PS II zukommen.

Alternativ könnte Rubredoxin einen Redoxsensor des PS II darstellen. Es ist bekannt, dass Eisen-Schwefel-Proteine eine Sensorfunktion für den Redoxzustand einzelner Photosystemkomplexe inne haben können (Pfannschmidt et al., 1999; Race et al., 1999). Für PS I konnte diese Funktion den Eisenschwefelproteinen Ferredoxin und Thioredoxin zugewiesen werden (Herrmann, 1996), die auf posttranskriptionaler Ebene die Synthese der PS I-Strukturkomponente PsbA regulieren. In der Grünalge

*Dunaliella tertiolecta* konnte von Escoubas et al. (1995) gezeigt werden, dass der Redoxzustand des Plastochinon *pools* an der Regulation der Transkription der Kern-kodierten Chlorophyll *a/b*-bindenden Proteine beteiligt ist. Möglicherweise stellt Rubredoxin als redoxaktives Protein ebenfalls einen Redoxsensor dar, der indirekt die Transkription von Genen für Photosyntheseproteine reguliert (z.B. die *psb*-Gene, siehe kotranskriptionale Anordnung von *rub* mit den *psb*-Genen in *Synechocystis*).

Aufschluss über die genaue Funktion werden Versuche sowohl mit Deletionsmutanten in *Synechocystis* sp. PCC6803 und Komplementationsversuche mit Nucleomorph-kodierten Rubredoxin als auch Rubredoxin-*antisense* Mutanten in *Arabidopsis thaliana* liefern.

### **4.3 Nucleomorph-kodierte Orfs sind essentiell für die Aufrechterhaltung der Plastide**

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass essentielle Funktionen für den Erhalt der Plastide auf dem Nucleomorph kodiert sind (Tab. 3-1; Tab. 3-2). Diese Orfs stellen den entscheidenden Faktor dar, das Nucleomorph und somit das periplastidäre Kompartiment mit einem funktionellen Transkriptions- und Translationsapparat aufrecht zu erhalten.

Im Bezug auf die Gesamtzahl von ca. 2000–3000 plastidären Proteinen (Martin & Hermann, 1998) ist die Anzahl an Orfs, die auf den Chromosomen des Nucleomorphs plastidäre Proteine kodieren (siehe Kap.3.1.1), keinesfalls ausreichend, um alle Funktionen der Plastide zu gewährleisten. Die meisten plastidären Funktionen werden vom Wirtsgenom kodiert.

Eine Aufstellung der NmOrfs (Tab. 3-1; Tab. 3-2) zeigt zum einen, dass die Funktion einer Vielzahl dieser Orfs noch unbekannt ist. Dies verdeutlicht, dass mit diesem Genomprojekt neue, bislang unbekannte plastidäre Proteine als *orfs* mit Homologien zu cyanobakteriellen Genen identifiziert und charakterisiert werden konnten (Bsp.: Rubredoxin). Zum anderen ist die Verteilung der bereits bekannten Nucleomorph-kodierten plastidären Funktionen interessant (Abb. 4-2). Ein Grossteil der Orfs sind an Transportprozessen, DNA-Modifikation und stromaler Transkription/Translation beteiligt. Auffallend ist, dass kein Nmorf strukturelle Komponenten der Photosysteme, des Energiemetabolismus und des plastidären Primär- und Sekundärmetabolismus kodiert.

Unter Berücksichtigung der prozentualen Anteile dieser drei Kategorien in *Synechocystis* (Photosynthese 12,2 %; Biosynthesen 27 %; Energiemetabolismus 7,8 %; zusammen 47 %; nach Martin & Herrmann, 1998) sollte man in etwa die Hälfte aller NmOrfs mit Funktionen dieser Kategorien erwarten. Diese Erwartung wäre allerdings nur dann zulässig, wenn ein unabhängiger, jeweils gleich wahrscheinlicher Gentransfer zu postulieren wäre. Dass dies nicht der Fall ist, zeigt die Analyse vollständig sequenzierter Plastome (Martin et al., 1998). Vor allem Gene für Photosynthese-Funktionen sind nicht auf den Wirtszellkern transferiert worden.

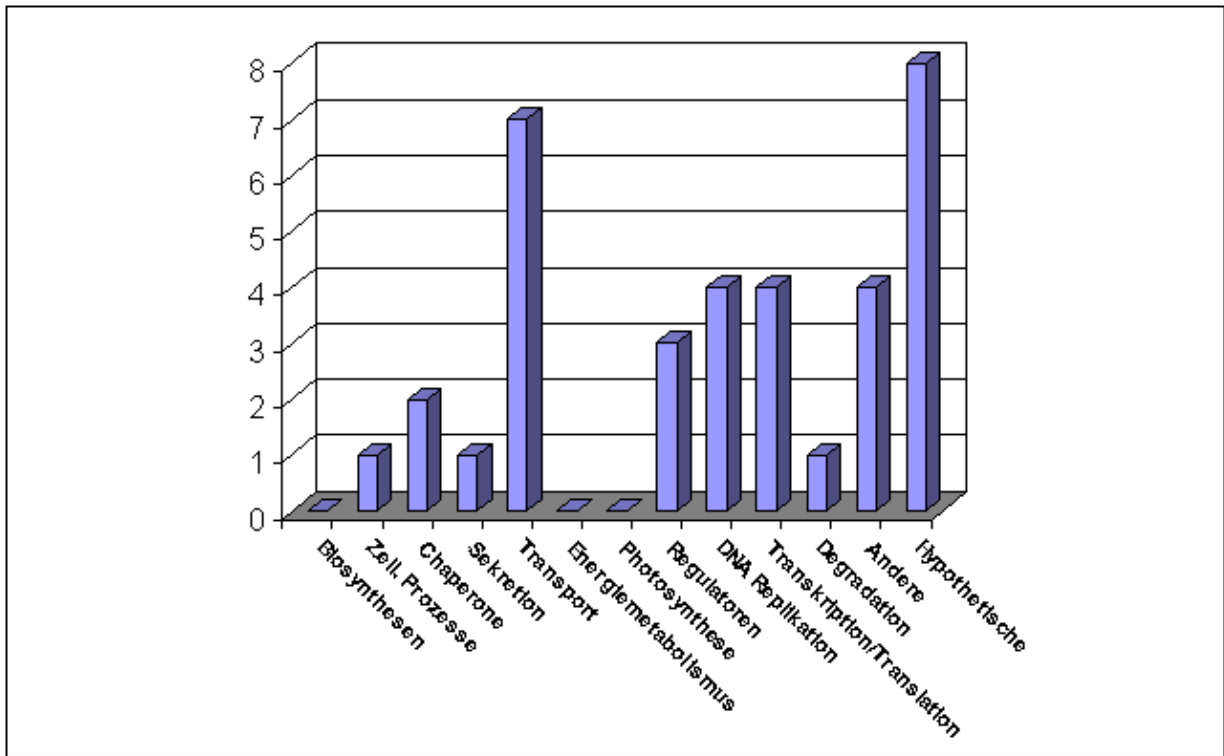


Abb. 4–2: Funktionen der Nucleomorph-kodierten plastidären Proteine in *G. theta*. Die Einteilung der plastidären Proteine aus Tab. 3–1 und Tab. 3–2 erfolgte in funktionellen Kategorien, die von Kaneko et al., (1996) für *Synechocystis* sp. PCC6803 verwendet wurden. Proteine, die kein cyanobakterielles Homolog besitzen, wurden wie folgt eingeteilt: Iep110 (Transport), CbbX und CysR (Regulation), Orf186 (Andere). Rubredoxin wurde in die Kategorie der "Regulatoren" aufgenommen. In die Kategorie "Hypothetische" wurden alle NmOrfs aufgenommen, die ein cyanobakterielles Homolog besitzen, von dem keine Funktion bekannt ist.

Es sind insgesamt 70 Gene bekannt, die auf allen bislang sequenzierten Plastomen Funktionen der Photosynthese kodieren (Martin & Herrmann, 1998). Da bei *G. theta* die vollständige Plastomsequenz bekannt ist (Douglas & Penny, 1999), lässt sich der genaue "Genverlust" für das *G. theta* Plastom angeben: 92 Gene (von 138) für Funktion in der Photosynthese. Für Biosynthesen lässt sich der Verlust auf 305 Gene (von 310 bekannten) beziffern. Unter der Voraussetzung, dass diese Gene nach primärer Endocytobiose auf den Kern des primären Wirtes transferiert wurden, sind diese von dort wiederum eliminiert worden (nach sekundärer Endocytobiose), da das rezente Restgenom (= Nucleomorph) keine Proteine dieser Kategorien mehr kodiert (Tab. 3–1, Tab. 3–2). Im Gegensatz dazu besitzen 35 % der auf dem Nucleomorph verbliebenen plastidären Proteine eine regulatorische und Transportfunktionen (Abb. 4–2). Dieser Anteil ist relativ (nicht absolut) höher als der Anteil dieser Kategorien in *Synechocystis* sp. PCC6803 (26%).

### Findet auch nach der sekundären Endocytobiose noch ein Transfer von Plastomgenen auf das Nucleomorph statt?

Es ist allgemein anerkannt, dass ein horizontaler Gentransfer zwischen Plastomen und deren Wirtsgenomen stattfand (Palmer, 1985). Bestätigung für diese Hypothese zeigen die Sequenzierungsprojekte an Plastomen (Martin et al., 1998) und die Analyse Kern-kodierter plastidärer Funktionen.

Theoretisch scheint der Transfer der Sequenzinformation von Plastom auf das Nucleomorphgenom weiterhin möglich. Bedingung für eine Etablierung im Nucleomorph wäre allerdings, dass die kodierende Sequenz mit einem Transitpeptid versehen wird, um die Translokation in das Stroma zu bewerkstelligen. Gegen eine Etablierung von Plastomgenen auf dem Nucleomorph nach sekundärer Endocytobiose sprechen die Sequenzdaten und die Plastomphylogenie, die von Martin et al. (1998) anhand komplett sequenzierter Plastome beziehungsweise eines Datensatzes aus 41 gemeinsamen Proteinen aller Plastome aufgestellt wurde. Dabei sind bereits viele der rezent Nucleomorph-kodierten plastidären Funktionen "früh" in der Plastidenevolution auf den Wirtskern des primären Wirtes, dem "heutigen" Nucleomorph transferiert worden (wie z. B. Rubredoxin, SigA, FtsZ). Keine dieser Funktionen wurde bislang auf einem Plastom detektiert. Nur

auf dem Cyanellengenom der Glaucocystophyceae *Cyanophora paradoxa* (Stirewalt et al., 1996), einer entwicklungsgeschichtlich sehr alten Linie, sind Proteine kodiert, die in *G. theta* auf dem Nucleomorph kodiert sind (Ycf48, Rps15 und ClpP). Andererseits konnte keines der Plastomgene, die "spät" in der Plastidenevolution vom Plastom eliminiert wurden, im Nucleomorphgenom detektiert werden.

### **Die Etablierung plastidärer Funktionen auf dem Wirtsgenom**

Das Szenario des horizontalen Gentransfers geht von dem Transfer von Sequenzinformation eines prokaryoten Genoms auf ein eukaryotes Genom aus. Die Tatsache, dass Plastiden-DNA in Wirtsgenom von Spinat gefunden wurde (Timmis & Scott, 1983; 1984), stützt diese Hypothese für den DNA-Transfer nach primärer Endocytobiose.

Nach dem Modell der sekundären Endocytobiose nimmt die phagozytierende Zelle eine bereits eukaryote, phototrophe Zelle auf. In Folge der Integration und der Etablierung des Endosymbionten unterlag dessen Genom einer extremen Reduktion und das Wirtszellgenom beherbergt die Vielzahl der Gene für die Aufrechterhaltung der Plastide. Es stellen sich hier nun folgende Fragen:

–Wie erhält der Wirtszellkern die kodierenden Sequenzen für plastidäre Funktionen ?

–Warum sind nicht alle auf dem Nucleomorph ersetzt worden ?

Für die Nucleuskodierung der Plastidenfunktionen gibt es zwei Möglichkeiten (Wastl et al., akzeptiert): Zum einen könnte sich der phagozytierende Wirt bereits durch eine photoautotrophe Lebensweise ausgezeichnet haben (Häuber et al., 1994; siehe Abb. 4–3B). Dies würde die zeitweilige Koexistenz zweier Plastiden in einer Zelle bedeuten, wobei eine aus einem primären, die andere aus einem sekundären Endocytobioseereignis entstanden wäre. In einem Szenario, in dem die effektivere Plastide die ineffiziente primäre Plastide verdrängt, hätte der Wirt nun genug Zeit, seine Kern-kodierten plastidären Proteine, die über ein Transitpeptid verfügen, mit der zusätzlichen Information zum Überqueren der zusätzlichen Membranen der komplexen Plastide auszustatten. Im Zuge dessen könnten nun die Gene der Nucleomorph-kodierten homologen Plastidenproteine eliminiert werden. Vorteile dieser Hypothese sind, dass die Evolution zweigeteilter Transitpeptide in zwei voneinander unabhängigen Ereignissen stattfinden könnte und kein Gentransfer von einem eukaryoten Genom auf ein anderes postuliert werden muss (Wastl et al., akzeptiert). Unter der Voraussetzung, dass alle Kern-kodierten plastidären Funktionen des Wirts die des Nucleomorphs ersetzen können, kommt es zu einer kompletten Eliminierung des Restgenoms des Endosymbionten und des periplastidären Kompartimentes. Das Ergebnis wäre eine komplexe Plastide, wie sie rezent in Haptophyta, Heterokontophyta und Apicomplexa vorliegt (Abb. 4–3).

Wenn nun diese Gen-Ausstattung an plastidären Funktionen im Wirtszellkern aber nicht über das Ausmass verfügt, die das Plastom der komplexen Plastide bereits an das Genom des Endosymbionten (späteres Nucleomorph) verloren hat, dann kann der Wirt nicht alle Nucleomorph-kodierten plastidären Funktionen ersetzen. Damit wäre er auf die Expression dieser Funktionen im periplastidären Kompartiment weiterhin angewiesen. Dies würde bedeuten, dass das periplastidäre Kompartiment aufrecht erhalten werden muss, wie es bei den Cryptophyta und Chlorarachniophyta der Fall ist.

Konträr stellt sich die Situation bei einem heterotrophen Wirt dar, der nicht auf einen *pool* bereits vorhandener Gene für Plastidenfunktionen zurückgreifen kann (Abb. 4.3A). In diesem Falle muss für die Etablierung plastidärer Funktionen auf dem Wirtsgenom ein lateraler Gentransfer zwischen eukaryoten Genomen postuliert werden (Nucleomorph zu Nucleus). Bislang existieren nur wenige Kern-kodierte plastidäre Proteine, die Aufschluss über die Art des Gentransfers geben können. Mit LHCP aus *G. theta* (Durnford et al., 1999) konnten Aussagen über die Phylogenie eines Kern-kodierten plastidären Proteins in *G. theta* getroffen werden. Stammbaumberechnungen ergaben, dass *G. theta* LHCP mit den LHCPs aus Rotalgen einen gemeinsamen Vorläufer besitzt. Anhand von 18S-rRNA-Analysen konnte der Endosymbiont aus *G. theta* auch der Rotalgen-Linie zugeordnet werden (Douglas et al., 1991; Maier et al., 1991; Van de Peer et al., 1996). Deshalb wird ein Gentransfer von Nucleomorph zu Nucleus angenommen (Deane et al., eingereicht).

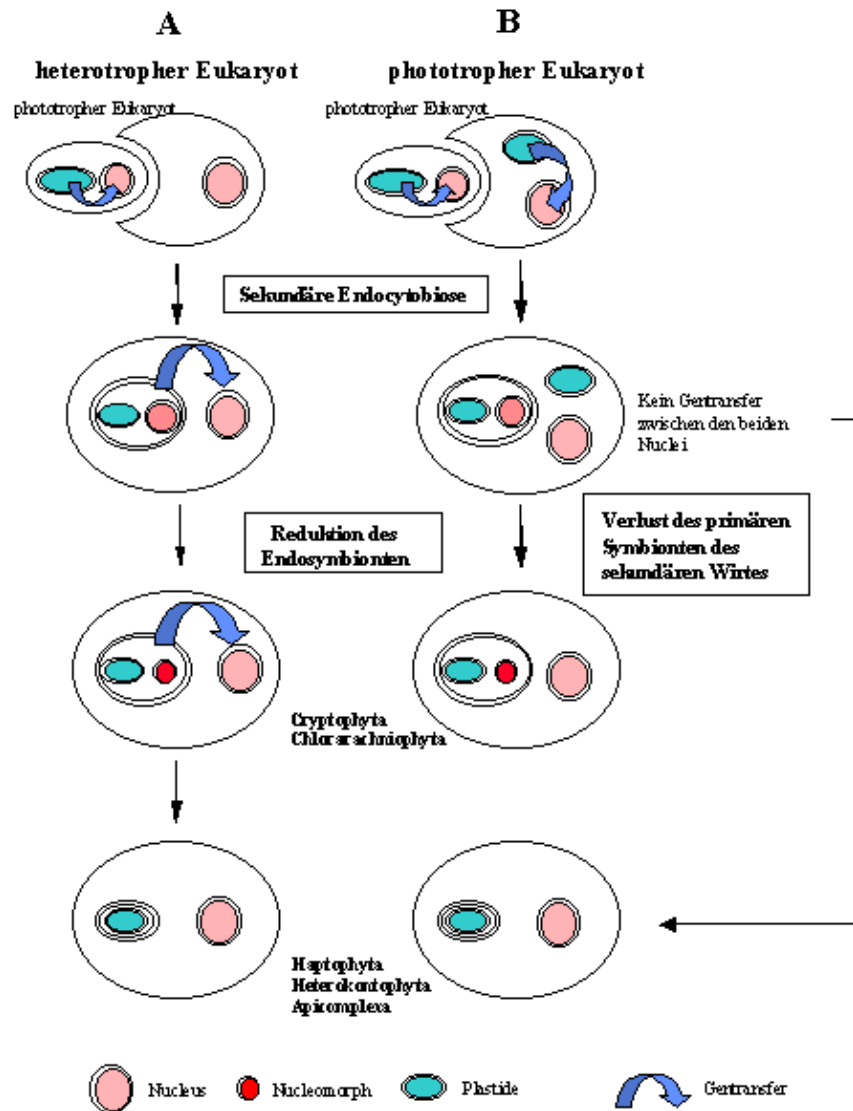


Abb. 4-3: Unterschiedliche Szenarien zur Evolution komplexer Plastiden.

Eine phototrophe eukaryote Zelle wird entweder von einer heterotrophen Zelle (A) oder einer bereits phototrophen eukaryoten Zelle (B) phagozytiert (modifiziert nach Wastl et al., akzeptiert)

Eine andere Hypothese ist, dass der Wirt zwar über das plastidäre Protein verfügt, aber das homologe, Nucleomorph-kodierte Protein funktionell nicht ersetzen kann. Möglicherweise sind

Komponenten für eine spezifische Proteininteraktion von essentieller Bedeutung, wie zum Beispiel NmTic22. Eine Interaktion von *Arabidopsis thaliana* Tic22 mit den Präproteinen während des Importes konnte anhand von *cross-linking* Experimenten bereits nachgewiesen werden (Kouranov & Schnell, 1997). Möglicherweise ist NmTic22 für den Import der Nucleomorph-kodierten Präprotein essentiell und es existiert ein weiteres Tic22 des Wirtes, das spezifisch für die Kern-kodierten plastidären Proteine funktionell ist.

Ein weiteres Beispiel für essentielle plastidäre Funktionen, die vom Nucleomorph kodiert sind, stellt das Chaperonin Cpn60 dar (diese Arbeit; Wastl et al., 1999). Das Nucleomorph-kodierte Cpn60 ist zusammen mit dem Plastom-kodierten GroEL in der Plastide funktionell nicht zu ersetzen (siehe Kap.3.1.2.2) und

deshalb ist *G. theta* von der Expression des Nucleomorph-kodierten Cpn60 abhängig. Auch die Sequenzanalyse des Chromosoms von *Synechocystis* sp. PCC6803 zeigt zwei divergente GroEL-Homologe, die als GroEL1 und GroEL2 bezeichnet. Die Stammbaumanalyse zeigt, dass Nucleomorph-kodiertes Cpn60 mit GroEL2, das in *G. theta* Plastom-kodierte GroEL mit dem GroEL1 aus *Synechocystis* gruppiert (siehe Kap.3.1.2.2).

Neben dem Plastom-kodierten GroEL in *G. theta* wurde in allen bislang sequenzierten Plastidengenomen der Chl. *a/c*/Phycobiliprotein-Linie ein GroEL identifiziert, dass in der Stammbaumanalyse ebenfalls mit GroEL1 aus *Synechocystis* gruppiert. Im Gegensatz dazu wurde auf keinem bislang sequenzierten Plastom der Chl. *a/b*-Linie ein Hsp60-Homolog identifiziert. Die phylogenetische Analyse zeigt, dass in der Chl. *a/b*-Linie zwei divergente Cpn60-Homologe evolvierten. Diese in Cpn60 $\alpha$  und Cpn60 $\beta$  eingeteilten Moleküle gruppieren mit dem cyanobakteriellen Homolog GroEL2, was auf ein frühes Genduplikationsereignis in der Chl. *a/b* Linie hinweist (Wastl et al., 1999). Sowohl Cpn60 $\alpha$  und Cpn60 $\beta$  in der Chl. *a/b*-Linie, als auch Nucleomorph-kodiertes Cpn60 und Plastom-kodiertes GroEL in *G. theta* sind für die Aufrechterhaltung der Plastide erforderlich. In allen Organismen, die ein plastom-kodiertes GroEL besitzen, muss deshalb ein Kern-kodiertes Cpn60 postuliert werden.

### **Ist auch das periplastidäre Kompartiment Ziel des Protein-targeting der Wirtszelle?**

Das Nucleomorph besitzt eine Kodierungskapazität von 550 kb. Die Sequenzanalyse zeigt, dass hauptsächlich Funktionen kodiert sind, die die Transkriptions- und Translationsmaschinerie des periplastidären Kompartimentes konstituieren (Zauner, persönliche Mitteilung). Ob alle notwendigen Funktionen hierfür vom Nucleomorph kodiert werden, wird mit der kompletten Sequenzanalyse der drei Nucleomorph Chromosomen beantwortet werden.

Wenn Gene für *house keeping* Funktionen auf dem Nucleomorph fehlen, müssen deren Genprodukte vom Wirt zur Verfügung gestellt werden, mit der Konsequenz, dass auch das periplastidäre Kompartiment Ziel des Protein-targeting in *G. theta* darstellt: Interessant wird sein, wie und auf welchem Weg das targeting in das periplastidäre Kompartiment stattfindet und wie das topogene Signal beschaffen ist, das diese Proteine in das periplastidäre Kompartiment dirigiert.

## 5 Zusammenfassung

Die Cryptomonade *Guillardia theta* entstand nach einer sekundären Endocytobiose und besitzt eine komplexe Plastide, die zwischen der zweiten und dritten Membran das periplastidäre Kompartiment mit einem funktionellen DNA-haltigen Restzellkern, dem Nucleomorph, besitzt. Damit verfügt *G. theta* über zwei eukaryote Genome, die für plastidäre Funktionen kodieren. Anhand der Kern-kodierten GapDH konnte gezeigt werden, dass ein zweigeteiltes Transitpeptid für die Translokation in das Stroma der komplexen Plastide zuständig ist. Für den N-Terminus dieses zweigeteilten Transitpeptids konnte *in vitro* eine Funktion als Signalsequenz für eine kotranslationale Insertion des Präproteins in Mikrosomen nachgewiesen werden. Der C-terminale Bereich des zweigeteilten Transitpeptids fungiert als topogenes Signal für den Import der GapDH in Erbsenchloroplasten. Für Nucleomorph-kodierte plastidäre Funktionen konnte am Beispiel des Rubredoxins ebenfalls gezeigt werden, dass die N-terminale Extension des Präproteins eine Proteintranslokation an der *plastid envelope* der Erbsenchloroplasten bewirkt.

Neben den Proteinimportstudien im heterologen System an Erbsenchloroplasten gelang es durch die Isolierung transportkompetenter Plastiden aus *G. theta* Untersuchungen am homologen System durchzuführen. Sowohl für die Kern-kodierte GapDH als auch für das Nucleomorph-kodierte Rubredoxin konnte *in vitro* die Translokation an der dritten und vierten Membran der komplexen Plastide nachvollzogen werden. Die experimentellen Daten und die Sequenzanalyse Nucleomorph-kodierter plastidärer Funktionen belegen, dass im inneren Membranenpaar der komplexen Plastide eine Proteinimportmaschinerie existiert, die funktionell den Toc/Tic-Komplexen in der *plastid envelope* höherer Pflanzen gleicht.

Für das Nucleomorph-kodierte Rubredoxin wurde die subzelluläre Lokalisation in der Plastide bestimmt. Anhand eines in dieser Arbeit hergestellten Antiserums gegen rekombinantes Rubredoxin konnte immunologisch und elektronenmikroskopisch eine Insertion in der Thylakoidmembran festgestellt werden. Die katalytische Domäne ist stromal orientiert und enthält ein Redox-aktives Eisen. Sowohl die spektroskopischen Kofaktor-untersuchungen als auch immunologische Daten lassen auf eine Assoziation von Rubredoxin mit dem Photosystem II in der Thylakoidmembran schliessen. Mit Nucleomorph-kodierten Rubredoxin wurde erstmals ein Vertreter dieser Nicht-Häm-Eisen-Proteine nicht nur in der Plastide von *G. theta*, sondern auch in weiteren Organismen mit oxygenener Photosynthese nachgewiesen.

## 6 Literatur

1. Akita M, Nielsen E, Keegstra K. (1997). Identification of protein transport complexes in the chloroplastic envelope membranes via chemical cross-linking. *J. Cell Biol.* **136**:983–994.
2. Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. (1997). Gapped-BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nuc. Acids Res.* **25**:3389–3402.
3. Apt KE, Hoffman NE, Grossman AR. (1993). The gamma subunit of R-phycoerythrin and its possible mode of transport into the plastid of red algae. *J. Biol. Chem.* **268**:16208–16215.
4. Arimura S, Takusagawa S, Hatano S, Nakazono M, Hirai A, Tsutsumi N. (1999). A novel plant nuclear gene encoding chloroplast ribosomal protein S9 has a transit peptide related to that of rice chloroplast ribosomal protein L12. *FEBS Lett.* **450**:231–234.
5. Auchincloss AH, Alexander A, Kohorn BD. (1992). Requirement for three membrane-spanning alpha-helices in the post-translational insertion of a thylakoid membrane protein. *J. Biol. Chem.* **267**:10439–10446.
6. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. (1996). Analysis of Proteins. Current Protocols in Molecular Biology. New York, John Wiley & Sons.
7. Baldauf S, Manhart J, Palmer JD. (1990). Different fates of the chloroplast *tufA* gene following its transfer to the nucleus in green algae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**:5317–5321.
8. Berthold DA, Babcock GT, Yocum CF. (1981). A highly resolved oxygen-evolving Photosystem II preparation from spinach thylakoid membranes. *FEBS Lett.* **134**:231–234.



9. Bevan M, Bancroft I, Mewes HW, Martienssen R, McCombie R. (1999). Clearing a path through the jungle: progress in Arabidopsis genomics. *BioEssays* **21**:110–120.
10. Bhattacharya D, Medlin L. (1995). The phylogeny of plastids: a review based on comparisons of small-subunit ribosomal RNA coding regions. *J. Phycol.* **31**:489–498.
11. Bonk M, Hoffmann B, Von Lintig J, Schledz M, Al-Babili S, Hobeika E, Kleinig H, Beyer P. (1997). Chloroplast import of four carotenoid biosynthetic enzymes in vitro reveals differential fates prior to membrane binding and oligomeric assembly. *Eur. J. Biochem.* **247**:942–950.
12. Bradford MM. (1979). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding. *Analyt. Biochem.* **72**: 248–254.
13. Brink S, Fischer K, Klösken RB, Flüge UI. (1995). Sorting of nuclear–encoded chloroplast membrane proteins to the envelope and the thylakoid membrane. *J. Biol. Chem.* **270**:20808–20815.
14. Brink S, Bogsch EG, Edwards WR, Hynds PJ, Robinson C. (1998). Targeting of thylakoid proteins by the delta pH–driven twin–arginine translocation pathway requires a specific signal in the hydrophobic domain in conjunction with the twin–arginine motif. *FEBS Lett.* **434**:425–430.
15. Cavalier–Smith T. (1982). The origin of plastids. *Biol. J. Linn. Soc.* **17**:289–306.
16. Cavalier–Smith T. (1995). Membrane heredity, symbiogenesis, and the multiple origins of algae. In *Biodiversity and evolution*. Tokyo, National Science Museum. 75–114.

17. Chan RL, Keller M, Canaday J, Weil JH, Imbault P. (1990). Eight small subunits of *Euglena* ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase are translated from a large mRNA as a polyprotein. *EMBO J.* **9**:333–338.
  
18. Chardin P, McCormick F. (1999). Brefeldin A: the advantage of being uncompetitive. *Cell* **97**:153–157.
  
19. Chitnis PR, Nelson N. (1991). Molecular cloning of the genes encoding two chaperone proteins of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *J. Biol. Chem.* **266**:58–65.
  
20. Clark SE, Lamppa GK. (1991). Determinants for cleavage of the chlorophyll *a/b* binding protein precursor: a requirement for a basic residue that is not universal for chloroplast imported proteins. *J. Cell Biol.* **114**:681–688.
  
21. Dabney-Smith C, Van Den Wijngaard PW, Treece Y, Vredenberg WJ, Bruce BD. (1999). The C-terminus of a chloroplast precursor modulates its interaction with the translocation apparatus and PIRAC. *J. Biol. Chem.* **274**:32351–32359.
  
22. Deane JA, Fraunholz M, Su V, Maier U-G, Martin W, Durnford DG, McFadden GI. (1999). Evidence for nucleomorph to host nucleus gene transfer: light-harvesting complex proteins from cryptomonads and chlorarachniophytes. Eingereicht bei *Protist*.
  
23. Delwiche CF, Palmer JD. (1997). The origin of plastids and their spread via secondary endosymbiosis. In: Bhattacharya D. (ed.): *Origins of algae and their plastids*. Vienna, New York: Springer Verlag. 53–86.

24. Demmig-Adams B, Adams III WW. (1996). The role of xanthophyll cycle carotenoids in the protection of photosynthesis. *Trends Plant Sci.* **1**:21–26.
25. Douglas SE, Penny S. (1999). The plastid genome of the cryptophyte alga, *Guillardia theta* : complete sequence and conserved synteny groups confirm its common ancestry with red algae. *J. Mol. Evol.* **48**:236–244.
26. Dörner W. (1999) Zur Struktur und Funktion des Mangankomplexes im Photosystem II. Spektroskopische Untersuchungen an intakten und teilweise Mangan-verarmten Core-Präparationen. Dissertation, Philipps-Universität Marburg.
27. Doyle JJ, Doyle JL. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* **12**:13–15.
28. Durnford DG, Deane JA, Tan S, McFadden GI, Gantt E, Green BR. (1999). A phylogenetic assessment of the eukaryotic light-harvesting antenna proteins, with implications for plastid evolution. *J. Mol. Evol.* **48**:59–68.
29. Eidsness MK, O'Dell SE, Kurtz DMJ, Robson RL, Scott RA. (1992). Expression of a synthetic gene coding for the amino acid sequence of *Clostridium pasteurianum* rubredoxin. *Protein Eng.* **5**:367–371.
30. Eidsness MK, Burden AE, Richie KA, Kurtz DM Jr, Scott RA, Smith ET, Ichiye T, Beard B, Min T, Kang C. (1999). Modulation of the redox potential of the [Fe(SCys)<sub>4</sub>] site in rubredoxin by orientation of a peptide dipole. *Biochemistry* **38**:14803–14809.
31. Eschbach S, Hofmann CJB, Maier U-G, Sitte P, Hansmann P. (1991). A eukaryotic genome of 660 kb: electrophoretic karyotype of nucleomorph and cell nucleus of the cryptomonad alga *Pyrenomonas salina*. *Nuc. Acids Res.* **19**:1779–1781.

32. Escoubas J–M, Lomas M, LaRoche J, Falkowski PG. (1995). Light intensity regulation of cab gene transcription is signalled by the redox state of the plastoquinone pool. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:10237–10241.
33. Feinberg AP, Vogelstein B. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analyt. Biochem.* **132**:6–13.
34. Feinberg AP, Vogelstein B. (1984). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum. *Analyt. Biochem.* **137**:266–267.
35. Felsenstein J. (1989). PHYLIP — Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* **5**: 164–166.
36. Felsenstein J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* **39**: 783–791.
37. Fraunholz M. (1999) Das Nucleomorph Chromosom II der Cryptomonade *Guillardia theta*: Struktur, Sequenzanalyse und evolutionäre Implikation. Dissertation, Philipps–Universität Marburg.
38. Fraunholz MJ, Mörschel E, Maier U–G. (1998). The chloroplast division protein FtsZ is encoded by a nucleomorph gene in cryptomonads. *Mol. Gen. Genet.* **260**:207–211.
39. Fraunholz MJ, Wastl J, Zauner S, Rensing SA, Scherzinger MM, Maier U–G. (1997). The evolution of cryptophytes. *Plant Syst. and Evol.* (Suppl.) **11**:163–174.

40. Gavel Y, von Heijne G. (1990). A conserved cleavage-site motif in chloroplast transit peptides. *FEBS Lett.* **261**:455–458.
  
41. Geissdörfer W, Kok RG, Ratajczak A, Hellingwerf KJ, Hillen W. (1999). The genes *rubA* and *rubB* for alkane degradation in *Acinetobacter* sp. strain ADP1 are in an operon with *estB*, encoding an esterase, and *oxyR*. *J. Bacteriol.* **181**:4292–4298.
  
42. Gibbs SP. (1978). The chloroplast of *Euglena* may have evolved from symbiotic green algae. *Canad. J. Biol.* **56**:2883–2889.
  
43. Gibbs SP. (1981). The chloroplast of some algal groups may have evolved from endosymbiotic eukaryotic algae. *Ann NY. Acad. Sci.* **361**:193–201.
  
44. Gibbs SP. (1983). The cryptomonad nucleomorph: Is it the vestigial nucleus of a eukaryotic endosymbiont? in *Endocytobiology II. Intracellular space as an oligogenetic system. Proc. 2nd Int. Colloquium Endocytobiology*. Berlin, New York, de Gruyter.987–992.
  
45. Gillot MA. (1990). Phylum *Cryptophyta* (Cryptomonads). In *Handbook of Protoctista*. Boston, Jones & Bartlett.139–151.
  
46. Gilson P, Maier U–G, McFadden GI. (1997). Size isn't everything: lessons in genetic miniaturisation from nucleomorphs. *Curr. Opin. in Genet. & Develop.* **7**:800–806.
  
47. Gray MW. (1992). The Endosymbiont Hypothesis Revisited. *Int. Rev. Cyt.* **141**:233–357.

48. Greenwood AD. (1974). The Cryptophyta in relation to phylogeny and photosynthesis. In *Electron microscopy*. Canberra, Australian Academy of Sciences.566–567.
49. Guillard RRL. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. in *Culture of Marine Invertebrate Animals*. New York, Plenum Press.29–60.
50. Guillard RRL, Ryther JH. (1962). Studies on Marine Planktonic Diatoms. I. *Cyclotella nana*, Hustedt and *Detomula confervacea* (Cleve). *Gran. Can. J. Microbiol.* **8**:229–239.
51. Hallick RB, Hong L, Drager RG, Favreau MR, Monfort A, Orsat B, Spielmann A, Stutz E. (1993). Complete sequence of *Euglena gracilis* chloroplast DNA. *Nucl. Acids Res.* **21**:3537–3544.
52. Hansmann P, Eschbach S. (1990). Isolation and preliminary characterization of the nucleus and the nucleomorph of a cryptomonad, *Pyrenomonas salina*. *Eur. J. Cell Biol.* **52**:373–378.
53. Häuber MM, Müller SB, Speth V, Maier U–G. (1994). How to evolve a complex plastid? A hypothesis. *Bot. Acta* **107**:383–386.
54. Heins L, Collinson I, Soll J. (1998). The protein translocation apparatus of chloroplast envelopes. *Trends Plant Sci.* **3**:56–61.
55. Heins L, Soll J. (1998). Chloroplast biogenesis: Mixing the prokaryotic and the eukaryotic? *Curr. Biol.* **8**:R215–R217.
56. Herrmann RG. (1996). In: Andersson B. (ed.) *Molecular genetics in photosynthesis*. Oxford: University Press.1–44.

57. Hibberd DJ, Norris RE. (1984). Cytology and ultrastructure of *Chlorarachnion reptans* (*Chlorarachniophyta* divisio nova, *Chlorarachniophyceae* classis nova). *J. Phycol.* **20**:310–330.
58. Hofmann CJB, Rensing SA, Häuber MM, Martin WF, Müller SB, Couch J, McFadden GI, Igloi GL, Maier U–G. (1994). The smallest known eukaryotic genomes encode a protein gene: towards an understanding of nucleomorph functions. *Mol. Gen. Genet.* **243**:600–604.
59. Holmes DS, Quigley M. (1981). A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Analyt. Biochem.* **114**:193–197.
60. Jakowitsch J, Neumann–Spallart C, Ma Y, Steiner J, Schenk HE, Bohnert HJ, Löffelhardt W. (1996). *In vitro* import of pre–ferredoxin–NADP<sup>+</sup>–oxidoreductase from *Cyanophora paradoxa* into cyanelles and into pea chloroplasts. *FEBS Lett.* **381**:153–155.
61. Jeanmougin F, Thompson JD, Gouy M, Higgins DG, Gibson TJ. (1998). Multiple sequence alignment with Clustal X. *Trends Biochem. Sci.* **23**:403–405.
62. Jeffrey SW, Humphrey GF. (1975). New Spectrophotometric Equations for Determining Chlorophyll *a*, *b*, *c*1 and *c*2 in Higher Plants, Algae and Natural Phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen* **167**:191–194.
63. Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirose M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M, and Tabata S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein–coding regions. *DNA Res.* **3**:109–136.

64. Keeling PJ, Deane JA, Hink-Schauer C, Douglas SE, Maier U-G, McFadden GI. (1999). The secondary endosymbiont of the cryptomonad *Guillardia theta* contains alpha, beta, and gamma-tubulin genes. *Mol. Biol. Evol.* **9**:1308–1313.
65. Kessler F, Blobel G, Patel HA, Schnell DJ. (1994) Identification of two GTP-binding proteins in the chloroplast protein import machinery. *Science* **266**:1035–1039.
66. Kishore R, Muchal US, Schwartzbach SD. (1993). The presequence of *Euglena* LHCPII, a cytoplasmically synthesized chloroplast protein, contains a functional endoplasmic reticulum-targeting sequence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:11845–11849.
67. Köhler S, Delwiche CF, Denny PW, Tilney LG, Webster P, Wilson RJ, Palmer JD, Roos DS. (1997). A plastid of probable green algal origin in Apicomplexan parasites. *Science* **275**:1485–1489.
68. Kortluke C, Horstmann K, Schwartz E, Rohde M, Binsack R, Friedrich B. (1992). A gene complex coding for the membrane-bound hydrogenase of *Alcaligenes eutrophus* H16. *J. Bacteriol.* **174**:6277–6289.
69. Kouranov A, Schnell DJ. (1996). Protein translocation at the envelope and thylakoid membranes of chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **271**:31009–31012.
70. Kouranov A, Schnell DJ. (1997). Analysis of the interactions of preproteins with the import machinery over the course of protein import into chloroplasts. *J. Cell Biol.* **139**:1677–1685.
71. Kouranov A, Chen X, Fuks B, Schnell DJ. (1998). Tic20 and Tic22 are new components of the protein import apparatus at the chloroplast inner envelope membrane. *J. Cell Biol.* **143**:991–1002.



72. Kouranov A, Wang H, Schnell DJ. (1999). Tic22 is targeted to the Intermembrane Space of chloroplasts by a novel pathway. *J. Biol. Chem.* **274**:25181–25186.
73. Kourtz L, Ko K. (1997). The early stage of chloroplast protein import involves Com70. *J. Biol. Chem.* **272**:2808–2813.
74. Kowallik KV, Stoebe B, Schaffran I, Kroth–Pancic P, Freier U. (1995). The chloroplast genome of a chlorophyll *a+c*-containing alga, *Odontella sinensis*. *Plant. Mol. Biol. Rep.* **13**:336–342.
75. Kourtz L, Ko K. (1997). The early stage of chloroplast protein import involves Com70. *J. Biol. Chem.* **272**:2808–2813.
76. Laemmli UK. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680–685.
77. Lang M, Apt KE, Kroth PG. (1998). Protein transport into "complex" diatom plastids utilize two different targeting signals. *J. Biol. Chem.* **273**:30973–30978.
78. Lehel C, Los D, Wada H, Gyorgyei J, Horvath I, Kovacs E, Murata N, Vigh L. (1993). A second *groEL*-like gene, organized in a *groESL* operon is present in the genome of *Synechocystis* sp. PCC6803. *J. Biol. Chem.* **268**:1799–1804.
79. Liaud M–F, Brandt U, Scherzinger MM, Cerff R. (1997). Evolutionary origin of cryptomonad microalgae: two novel GAPDH genes as potential markers of ancestral endosymbiont and host cell components. *J. Mol. Evol.* **44**(Suppl.):28–37.

80. Long M, de Souza S, Rosenberg C, Gilbert W. (1996). Exon shuffling and the origin of the mitochondrial targeting function in plant cytochrome *c1* precursor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:7727–7731.
81. Lorkovic ZJ, Schröder WP, Pakrasi HB, Irrgang KD, Herrmann RG, Oelmüller R. (1995). Molecular characterization of PsbW, a nuclear–encoded component of the photosystem II reaction center complex in spinach. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**:8930–8934.
82. Lübeck J, Soll J, Akita M, Nielsen E, Keegstra K. (1996). Topology of IEP110, a component of the chloroplastic protein import machinery present in the inner envelope membrane. *EMBO J.* **15**:4230–4238.
83. Lübeck J, Heins L, Soll J. (1997). A nuclear–encoded chloroplastic inner envelope membrane protein uses a soluble sorting intermediate upon import into the organelle. *J. Cell Biol.* **137**:1279–1286.
84. Ludwig M, Gibbs SP. (1987). Are the nucleomorphs of cryptomonads and Chlorarachnion the vestigial nuclei of eukaryotic endosymbionts? *Ann. New York Acad. Sci.* **501**:198–211.
85. Ludwig M, Gibbs SP. (1989). Evidence that the nucleomorphs of *Chlorarachnion reptans* (Chlorarachniophyceae) are vestigial nuclei: morphology, division and DNA–DAPI fluorescence. *J. Phycol.* **25**:385–394.
86. Maier U–G, Hofmann CJB, Eschbach S, Wolters J, Igloi GL. (1991). Demonstration of nucleomorph–encoded eukaryotic small subunit ribosomal RNA in cryptomonads. *Mol. Gen. Genet.* **230**:155–160.
87. Maier U–G, Fraunholz M, Zauner S, Penny S, Douglas S. (2000). A nucleomorph–encoded CbbX and the phylogeny of RuBisCO regulators. *Mol. Biol. Evol.*, im Druck.

88. Margulis L. (1970) Origin of eukaryotic cells. New Haven: Yale University Press. vol. 349.
89. Martin W, Herrmann RG. (1998). Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens, and why? *Plant Physiology* **118**:9–17.
90. Martin W, Stöbe B, Goremykin V, Hansmann S, Hasegawa M, Kowallik KV. (1998). Gene transfer to the nucleus and evolution of chloroplasts. *Nature* **393**:162–165.
91. Martoglio B, Dobberstein B. (1998). Signal sequences: more than just greasy peptides. *Trends Cell Biol.* **8**:410–415.
92. Matsuoka K, Watanabe N, Nakamura K. (1995). O-glycosylation of a precursor to a sweet potato vacuolar protein, sporamin, expressed in tobacco cells. *Plant J.* **8**:877–889.
93. May T, Soll J. (1999) Chloroplast precursor protein translocon. *FEBS Lett.* **452**:52–56.
94. McFadden GI, Douglas SE. (1994). The photosynthetic endosymbiont in cryptomonad cells produce both chloroplast and cytoplasmic-type ribosomes. *J. Cell Sci.* **107**:649–657.
95. McFadden GI, Gilson PR, Hofmann CJB, Adcock GJ, Maier U-G. (1994). Evidence that an amoeba acquired a chloroplast by retaining part of an engulfed eukaryotic alga. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:3690–3694.

96. McFadden GI, Reith ME, Lang-Unnasch N. (1996). Plastids in human parasites. *Nature* **381**: 482.
97. McFadden GI, Waller RF. (1997). Plastids in parasites of humans. *BioEssays* **19**:1033–1040.
98. McFadden GI, Waller RF, Reith ME, Lang-Unnasch N. (1997). Plastids in apicomplexan parasites. *Plant Syst. and Evol. (Suppl.)* **11**:261–287.
99. Mereschkowsky VC. (1905). Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biologisches Centralblatt* **25**:593–604.
100. Meurer J, Plucken H, Kowallik KV, Westhoff P. (1998). A nuclear-encoded protein of prokaryotic origin is essential for the stability of photosystem II in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* **17**:5286–5297.
101. Miller A-F, Brudvig GW. (1991). A guide to electron paramagnetic resonance spectroscopy of photosystem II membranes. *Biochim. et Biophys. Acta* **1056**:1–18.
102. Morais F, Barber J, Nixon PJ. (1998). The chloroplast encoded alpha subunit of cytochrome *b*-559 is required for assembly of the photosystem two complex in both the light and the dark in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **273**:29315–29320.
103. Muckel E, Soll J. (1996). A protein import receptor of chloroplasts is inserted into the outer envelope membrane by a novel pathway. *J. Biol Chem.* **271**:23846–23852.
104. Nölling J, Ishii M, Koch J, Pihl TD, Reeve JN, Thauer RK, Hedderich R. (1995). Characterization of a 45-kDa flavoprotein and evidence for a rubredoxin, two proteins that could participate in electron

transport from H<sub>2</sub> to CO<sub>2</sub> in methanogenesis in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Eur. J. Biochem.* **231**:628–638.

105. Ohta H, Okumura A, Okuyama S, Akiyama A, Iwai M, Yoshihara S, Shen JR, Kamo M, Enami I. (1999). Cloning, expression of the *psbU* gene, and functional studies of the recombinant 12-kDa protein of photosystem II from a red alga *Cyanidium caldarium*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* **260**:245–250.
  
106. Ortiz W, Reardon EM, Price CA. (1980). Preparation of chloroplasts from *Euglena* highly active in protein synthesis. *Plant Physiol.* **66**:291–294.
  
107. Palmer JD. (1985). Comparative organization of chloroplast genomes. *Annual Rev. Genet.* **19**:325–354
  
108. Palmer JD. (1991). Plastid chromosomes: structure and evolution. In: Bogorad L, Vasil IK. (eds.): *The molecular biology of the plastids*, San Diego, Academic Press.5–53.
  
109. Perry SE, Li H–M, Keegstra K. (1991). *In vitro* reconstitution of protein transport into chloroplasts. *Methods Cell Biol.* **34**:327–344.
  
110. Pfannschmidt T, Nilsson A, Allen JF. (1999). Photosynthetic control of chloroplast gene expression. *Nature* **397**:625–628.
  
111. Race HL, Herrmann RG, Martin W. (1999). Why have organelles retained genomes? *Trends Genet.* **15**:364–370.

112. Reith ME, Munholland J. (1995). Complete nucleotide sequence of the *Porphyra purpurea* chloroplast genome. *Plant. Mol. Biol. Rep.* **13**:333–335.
113. Reumann S, Keegstra K. (1999). The endosymbiotic origin of the protein import machinery of chloroplastic envelope membranes. *Trends Plant Sci.* **4**:302–307.
114. Rhee K–H, Morris EP, Barber J, Kühlbrandt W. (1998). Three–dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 Å resolution. *Nature* **396**:283–286.
115. Robinson C, Hynds P, Robinson D, Mant A. (1998). Multiple pathways for the targeting of thylakoid proteins in chloroplasts. *Plant. Mol. Biol.* **38**:209–221.
116. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
117. Schatz G, Dobberstein B. (1996). Common principles of protein translocation across membranes. *Science* **271**:1519–1526.
118. Schindler C, Hracky R, Soll J. (1987). Protein transport in chloroplasts: ATP is a prerequisite. *Z. Naturforsch.* **42c**:103–108.
119. Schnell DJ, Kessler F, Blobel G. (1994). Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. *Science* **266**:1007–1012.
120. Schnell D, Blobel G, Keegstra K, Kessler F, Ko K, Soll J. (1997). A consensus nomenclature for the protein–import components of the chloroplast envelope. *Trends Cell Biol.* **7**:303–304.

121. Schnell DJ. (1998). Protein targeting to the thylakoid membrane. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **49**:97–126.
  
122. Schuenemann D, Gupta S, Persello–Cartieaux F, Klimyuk VI, Jones JDG, Nussaume L, Hoffman NE. (1998). A novel signal recognition particle targets light–harvesting proteins to the thylakoid membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:10312–10316.
  
123. Schuenemann D, Amin P, Hartmann E, Hoffman NE. (1999). Chloroplast SecY is complexed to SecE and involved in the translocation of the 33–kDa but not the 23–kDa subunit of the oxygen–evolving complex. *J. Biol. Chem.* **274**:12177–12182.
  
124. Schwartzbach SD, Osafune T, Löffelhard W. (1998). Protein import into cyanelles and complex chloroplasts. *Plant Mol. Biol.* **38**:247–263.
  
125. Seibert M, DeWit M, Staehelin LA. (1987). Structural localization of the O<sub>2</sub>–evolving apparatus to multimeric (tetrameric) particles on the luminal surface of freeze–etched photosynthetic membranes. *J. Cell Biol.* **105**:2257–2265.
  
126. Sippola K, Kanervo E, Murata N, Aro EM. (1998). A genetically engineered increase in fatty acid unsaturation in *Synechococcus* sp. PCC7942 allows exchange of D1 protein forms and sustenance of photosystem II activity at low temperature. *Eur. J. Biochem.* **251**:641–648.
  
127. Sitte P. (1993). Symbiogenetic evolution of complex cells and complex plastids. *Eur. J. Protistol.* **29**:131–143.

128. Sitte P, Baltes S. (1990) Morphometric analysis of two cryptomonads. Quantitative evaluation of fine-structural changes in an endocytobiotic system. In: Nardon P, Gianinazzi-Pearson V, Grenier AM, Margulis L, Smith DC. (eds.): *Endocytobiology IV*. Paris:229–233.
129. Soll J, Tien R. (1998). Protein translocation into and across the chloroplastic envelope membranes. *Plant Mol. Biol.* **38**:191–207.
130. Southern EM. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* **98**:503–517.
131. Staehelin LA, DeWit M. (1984). Correlation of structure and function of chloroplast membranes at the supramolecular level. *J. Cell. Biochem.* **24**:261–269.
132. Stirewalt VL, Michalowski CB, Löffelhardt W, Bohnert HJ, Bryant DA. (1995). Nucleotide sequence of the cyanelle genome from *Cyanophora paradoxa*. *Plant. Mol. Biol. Rep.* **13**:327–332.
133. Striepen B, He CY, Matrajt M, Soldati D, Roos DS. (1998). Expression, selection and organellar targeting of the green fluorescent protein in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* **92**:328–338.
134. Sulli C, Schwartzbach SD. (1995). The polyprotein precursor to the *Euglena* light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein is transported to the Golgi apparatus prior to chloroplast import and polyprotein processing. *J. Biol. Chem.* **270**:13084–13090.
135. Theg SM, Geske FJ. (1992). Biophysical characterization of a transit peptide directing chloroplast protein import. *Biochemistry* **31**:5053–5060.



136. Thorbjornsen T, Villand P, Kleczkowski L, Olsen O-E. (1996). A single gene encodes two different transcripts for the ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit from barley (*Hordeum vulgare*). *Biochem. J.* **313**:149–154.
137. Timmis JN, Scott NS. (1983). Spinach nuclear and chloroplast DNAs have homologous sequences. *Nature* **305**:65–67.
138. Timmis JN, Scott NS. (1984). Promiscuous DNA: sequence homologies between DNA of separate organelles. *Trends Biochem. Sci.* **9**:271–273.
139. Tranel P, Keegstra K. (1996). A novel, bipartite transit peptide targets OEP75 to the outer membrane of the chloroplastic envelope. *Plant Cell* **8**:2093–2104.
140. Van de Peer Y, Rensing SA, Maier U-G, De Wachter R. (1996). Substitution rate calibration of small subunit ribosomal RNA identifies chlorarachniophyte endosymbionts as remnants of green algae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:7732–7736.
141. Vollmer M. (1999). Klonierung des Genes der Ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-Oxidoreduktase aus *Toxoplasma gondii*. Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg.
142. von Heijne G, Nishikawa K. (1991). Chloroplast transit peptides: the perfect random coil? *FEBS Lett.* **278**:1–3.
143. von Heijne G, Hirai T, Klösgen R-B, Steppuhn H, Bruce B, Keegstra K, Herrmann R. (1991). CHLPEP- A database of chloroplast transit peptides. *Plant Mol. Biol. Rep.* **9**:104–126.

144. Waagemann K, Paulsen K, Soll J. (1990). Translocation of proteins into isolated chloroplasts requires cytosolic factors to obtain import competence. *FEBS Lett.* **261**:89–92.
145. Waagemann K, Soll J. (1991). Characterization of the protein import apparatus in isolated outer envelopes of chloroplasts. *Plant J.* **1**:149–158.
146. Waagemann K, Soll J. (1996). Phosphorylation of the transit sequence of chloroplast precursor proteins. *J. Biol. Chem.* **271**:6545–6554.
147. Wakasugi T, Tsudzuki J, Ito S, Nakashima K, Tsudzuki T, Sugiura M. (1994). Loss of all *ndh* genes as determined by sequencing the entire chloroplast genome of the black pine *Pinus thunbergii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:9794–9798.
148. Waller RF, Keeling PJ, Donald RG, Striepen B, Handman E, Lang–Unnasch N, Cowman AF, Besra GS, Roos DS, McFadden GI. (1998). Nuclear–encoded proteins target to the plastid in *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**:12352–12357.
149. Wastl J, Fraunholz M, Zauner S, Douglas S, Maier U–G. (1999). Ancient gene duplication and differential gene flow in plastid lineages: The GroEL/Cpn60 example. *J. Mol. Evol.* **48**:112–117.
150. Wastl J, Fraunholz M, Zauner S, Maier U–G. (1999). Lessons from nucleomorphs and chloroplasts. *Endocytosymbiosis*, akzeptiert.
151. Wastl J, Maier U–G. (2000). Transport of proteins into cryptomonads complex plastids. eingereicht bei *J. Biol. Chem.*

152. Wastl J, Sticht H, Maier U-G, Rösch P, Hoffmann S. (2000). Identification and characterization of a eukaryotically encoded rubredoxin in a cryptomonad alga. eingereicht bei *FEBS Lett.*
153. Wegener S, Schmitz U. (1993). The presequence of cytochrome *c1* from potato mitochondria is encoded on four exons. *Curr. Genet.* **24**:256–259.
154. Whatley JM, John P, Whatley FR. (1979). From extracellular to intracellular: the establishment of mitochondria and chloroplasts. *Proc. Roy. Soc. London B* **204**:165–187.
155. Whatley JM, Whatley FR (1981). Chloroplast evolution. *New Phytol.* **87**:233–247.
156. Wienk HL, Czisch M, de Kruijff B. (1999). The structural flexibility of the preferredoxin transit peptide. *FEBS Lett.* **453**:318–326.
157. Wilson RJ, Denny PW, Preiser PR, Rangachari K, Roberts K, Roy A, Whyte A, Strath M, Moore DJ, Moore PW, Williamson DH. (1996) Complete gene map of the plastid-like DNA of the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *J. Mol. Biol.* **261**:155–172.
158. Wischmann C, Schuster W. (1995). Transfer of *rps10* from the mitochondrion to the nucleus in *Arabidopsis thaliana*: evidence for RNA mediated transfer and exon-shuffling at the integration site. *FEBS Lett.* **374**:152–156.
159. Yasuhara H, Sonobe S, Shibaoka H. (1995). Effects of brefeldin A on the formation of the cell plate in tobacco BY-2 cells. *Eur. J. Cell. Biol.* **66**:274–281.

160. Yoon K-S, Hille R, Hemann C, Tabita FR. (1999). Rubredoxin from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* functions as an electron acceptor for pyruvate ferredoxin oxidoreductase. *J. Biol. Chem.* **274**:29772–29778.
161. Zauner S, Fraunholz M, Wastl J, Penny S, Beaton M, Cavalier-Smith T, Maier U-G, Douglas S. (2000). Chloroplast protein-encoding and centrosomal genes, a novel tRNA intron, and odd telomeres in an unusually compact eukaryotic genome – the cryptomonad nucleomorph. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:200–205.
162. Zhou YH, Ragan MA. (1994). Cloning and characterization of the nuclear gene encoding plastid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from the marine red alga *Gracilaria verrucosa*. *Curr. Genet.* **26**:79–86.

## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Uwe-G. Maier für die Überlassung des Themas, des Arbeitsplatzes und die Bereitstellung der finanziellen sowie sonstiger Mittel. Sowohl sein stetes Interesse am Fortgang der Arbeit als auch seine ständige Diskussionsbereitschaft haben diese Arbeit begleitet. An dieser Stelle sei Herrn Prof. Dr. Uwe-G. Maier auch dafür gedankt, dass er mir die Teilnahme an verschiedenen wissenschaftlichen Tagungen im In- und Ausland ermöglicht hat.

Herrn Prof. Dr. Klaus Lingelbach danke ich für die Diskussionen und Ratschläge zum Thema Proteinimport.

Für wertvolle Tipps bei molekularbiologischen Problemstellungen danke ich Frau Dr. Claudia Hofmann (Eppendorf-Netheler Hinz-GmbH), ebenso den ständigen Begleitern im Laboralltag Herrn Dr. Martin Fraunholz und Herrn Stefan Zauner für deren vielfältige Hilfe. Bei Frau Marianne Johannsen bedanke ich mich ausdrücklich für Ihre Unterstützung bei den elektronenmikroskopischen Arbeiten und Photoarbeiten.

Ferner gilt mein Dank:

Frau Dr. Silke Hoffmann (Universität Bayreuth) für die Kooperation bei der Aufreinigung rekombinanten Rubredoxins.

Frau Dr. Lucia Iuzzolino und Herrn Dr. Wolfgang Dörner (Universität Marburg) für die Bereitstellung gereinigter PS II-Komplexe und BBY-Partikel aus Spinat.

Herrn Dr. Johannes von Lintig (Universität Freiburg) für die Einführung in die Importstudien an Erbsenchloroplasten.

Herrn Dr. Evert Duin (MPI Marburg) für die Einführung in die EPR Messung.

Herrn Dr. Dietmar Linder (Universität Giessen) für die Durchführung der Proteinsequenzierung.

Herrn Dr. Stefan Baumeister, Frau Kerstin Paprotka und Herrn Lothar Kremp (AG Prof. Dr. K. Lingelbach; Universität Marburg) für die hervorragende Zusammenarbeit auf vielfältiger Ebene.

Für das Korrekturlesen der schriftlichen Arbeit bedanke ich mich bei Julia, Kerstin, Martin und Stefan.

Ich möchte allen Mitgliedern der AG Maier in Bayreuth und Marburg für die gute Zusammenarbeit danken, insbesondere Angelika Täuber, Christa Zimmermann, Julia Prechtel, Marianne Johannsen, Ruth Keifler, Veronika Bender, Prof. Dr. Erhard Mörschel und Dr. Klaus Wenderoth.

# Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**"Proteintranslokation in der komplexen Plastide von *Guillardia theta*:  
Import Kern- und Nucleomorph-kodierter Plastidenproteine und  
Identifizierung und Charakterisierung neuer plastidärer Funktionen"**

selbständig und 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.

Jürgen Wastl

Marburg, den 10. Januar, 2000

Aus der vorliegenden Arbeit sind folgende Publikation entstanden:

- Fraunholz MJ, Wastl J, Zauner S, Rensing SA, Scherzinger MM, Maier U–G. (1997). The evolution of cryptophytes. *Plant Syst. Evol.* (Suppl.) **11**:163–174.
- Wastl J, Fraunholz MJ, Zauner S, Douglas S, Maier U–G. (1999). Ancient gene duplication and differential gene flow in plastid lineages: The GroEL/Cpn60 example. *J. Mol. Evol.* **48**: 112–117.
- Wastl J, Fraunholz MJ, Zauner S, Maier U–G. (1999). Lessons from nucleomorphs and chloroplasts. *Endocytobiology VII, Proceedings*. Akzeptiert.
- Zauner S, Fraunholz M, Wastl J, Penny S, Beaton M, Cavalier–Smith T, Maier U–G, Douglas S. (2000). Chloroplast protein–encoding functions and centrosomal genes , a novel tRNA intron and odd telomeres, in an unusually compact eukaryotic genome – the cryptomonad nucleomorph. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**:200–205.

Zur Publikation eingereicht:

- Wastl J, Maier U–G. (1999). Transport of proteins into cryptomonads complex plastids. Eingereicht bei *J. Biol. Chem.*
- Wastl J, Sticht H, Maier U–G, Rösch P, Hoffmann S. (1999). Identification and characterization of a eukaryotically encoded rubredoxin in a cryptomonad alga. Eingereicht bei *FEBS Lett.*

Weitere Publikationen :

- Wenderoth K, Marquardt J, Fraunholz MJ, Van de Peer Y, Wastl J, Maier U–G. (1999). The taxonomic position of *Chlamydomyxa labyrinthuloides* ARCHER. *Europ. J. Phycol.* **34**:97–108.
- Schweimer K, Hoffmann S, Wastl J, Maier U–G, Rösch P, Sticht H. (1999): Sequence–specific <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C and <sup>15</sup>N resonance assignments of a zinc substituted eukaryotic rubredoxin from the cryptomonad alga *Guillardia theta*. Eingereicht bei *J. Biomol. NMR*