

**Untersuchungen zum Transport kernkodierter
Plastiden-Proteine in Kieselalgen**

I n a u g u r a l – D i s s e r t a t i o n

zur

Erlangung des Doktorgrades der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Markus Lang

aus Wuppertal

2000

1. Einleitung

1.1. Entwicklung und Charakterisierung der verschiedenen Algengruppen

Bis heute ist die Evolution der unterschiedlichen pflanzlichen Linien ein kontrovers diskutiertes Thema. Gerade bei den einzelligen Organismen werden Eigenschaften gefunden, die eine klassische Abgrenzung der „Pflanzen“ von z.B. den „Tieren“ verkomplizieren. Neben einer aktiven Beweglichkeit finden sich heterotrophe bzw. parasitäre Lebensweisen bei den pflanzlichen Zellen. Margulis und Schwartz (1989) fassen deswegen alle einzelligen Organismen in die Gruppe der Protoctisten. In der Regel wird jedoch zwischen Protozoa, Pilzen, Algen und Pflanzen unterschieden.

Das besondere Merkmal der Algen und der pflanzlichen Zellen ist der Besitz von Chloroplasten. Für die Entstehung der Plastiden wurde von Mereschkovsky (1905) und Schimper (1883) die Aufnahme eines prokaryotischen, photoautotrophen Vorläuferorganismus durch einen Ur-Eukaryoten vorgeschlagen. Entsprechend der von ihnen formulierten „Endosymbiontentheorie“ wurde im Laufe der Evolution dieser Fremdorganismus zu einem Zellorganell umgewandelt. Auch für weitere eukaryotische Zellbestandteile wird ein endosymbiontischer Ursprung diskutiert. Für die Bildung des Ur-Eukaryoten wird eine Fusion aus einem α -Proteobakterium (späteres Mitochondrium) und einem Archaeobakterium (Cytoplasma) postuliert (Müller und Martin 1999).

Nach phylogenetischen Untersuchungen wird der Ursprung der Plastiden mit einer einmaligen Aufnahme (Monophylie) eines cyanobakteriellen Vorläufers durch eine eukaryotische Wirtszelle diskutiert (Gray 1989, Martin et al. 1998). Die Möglichkeit einer mehrfachen, unabhängigen Aufnahme (Polyphylie) von verschiedenen Cyanobakterien-Linien ist jedoch nach Delwiche und Palmer (1997) nicht eindeutig ausgeschlossen. Im Verlauf der Entwicklung zu einem Endosymbionten wurden Gene aus dem Genom des cyanobakteriellen Vorläufers in den Kern des Wirtes integriert. Nach McFadden (1999) stellte dieser Gentransfer für die „Ur-Plastide“ einen evolutionären Vorteil dar, da das diploide Kerngenom einerseits eine erhöhte Mutationsrate und andererseits einen Schutz vor benachteiligenden Mutationen aufweist. Um die Plastidenfunktion aufrecht zu erhalten, entwickelten sich Mechanismen, die die Translationsprodukte wieder in den Chloroplasten zurücktransportieren.

Als Beleg für eine Plastidenevolution aus den Cyanobakterien wurde die Entdeckung der Glaucocystophyta gewertet. Glaucocystophyten besitzen wie Cyanobakterien Chlorophyll a und Phycobilisomen als akzessorische Pigmente sowie eine vergleichbare Thylakoidverteilung. Zudem wurde von Giddings et al. (1983) eine Peptidoglycan-Wand zwischen den beiden Hüllmembranen der Plastiden (Cyanellen) gefunden. Nach Stammbaum-Untersuchungen von 45 Plastiden-Proteinen durch Martin et al. (1998) zweigen die Glaucocystophyta sehr früh nach der primären Endocytobiose von den anderen Gruppen ab. Danach gliederte sich das Pflanzenreich vermutlich in zwei große Äste (Abb. 1-1) (Martin et al. 1998). Die Chlorophyll a,b-Linie führt über ursprüngliche grüne Algen wie *Mesostigma viride* zu den Chlorophyten und den Streptophyten (höheren Pflanzen, Charophyten) (Lemieux et al. 2000). Dagegen weisen die Rhodophyten (Rotalgen) in der Rotalgen-Linie dieselbe Pigmentausrüstung wie Glaucocystophyten auf. Die divergente Entwicklung der Rot- und Grünalgen ist auch im Vergleich der Plastidengenome und ihrer Genanordnung zu erkennen (Stoebe und Kowallik 1999; Reith und Munholland 1995). Glaucocystophyten, Rot- und Grünalgen besitzen jeweils zwei Plastidenhüllmembranen.

Das Vorhandensein von Chloroplasten mit drei oder vier Hüllmembranen wird derzeit mit sekundären Endocytobiosen erklärt. Hierbei wurde ein photoautotropher Eukaryot durch eine eukaryotische Wirtszelle aufgenommen und anschließend bis auf den Chloroplasten reduziert.

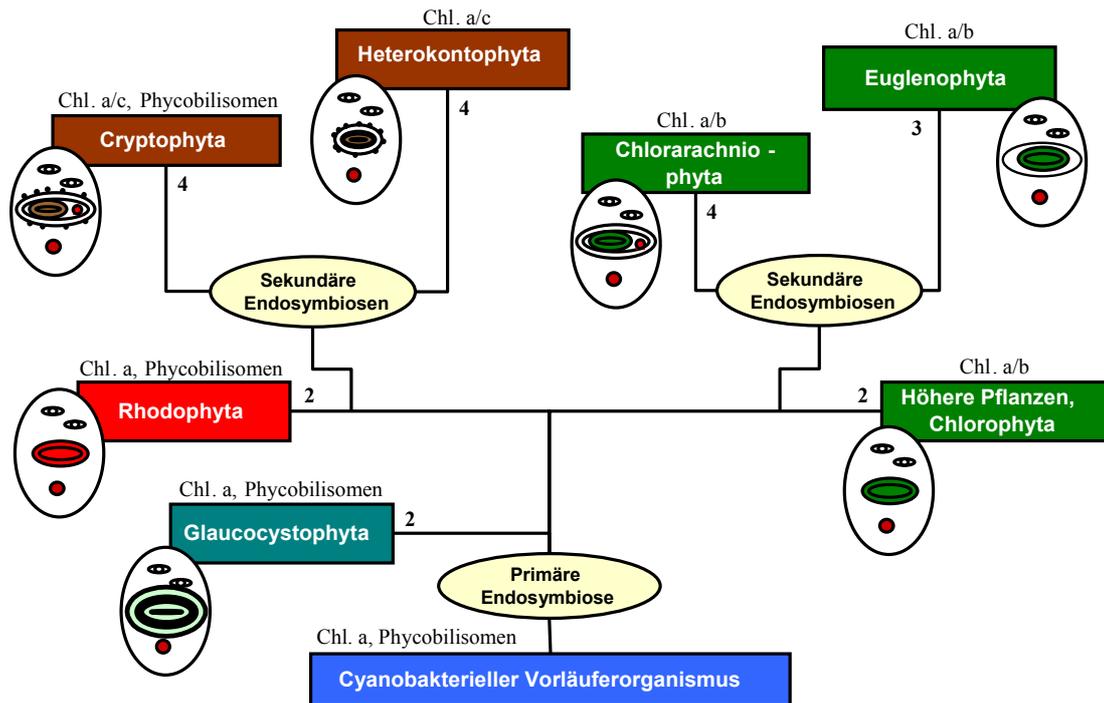


Abbildung 1 - 1 Schematische Darstellung der Entwicklungslinien von Algen und Pflanzen

Vereinfachter Stammbaum verschiedener Algenlinien mit zusätzlicher Angabe ihrer Pigmente und der Anzahl der Plastidenhüllmembranen nach Martin et al. (1998), Douglas (1998) und Delwiche und Palmer (1997). Dinoflagellaten (Chl. a, c, Peridinin) und die Apicomplexa sind aufgrund unklarer Daten zum Ursprung nicht aufgeführt. Die sekundären Endosymbiosen stellen unabhängige Ereignisse dar. Die Zahlenangaben geben die Anzahl der Hüllmembranen um die Plastide wieder. Zusätzlich sind entsprechende Zellen schematisch dargestellt. Mitochondrien sind als kleine weiße Ovale, Kerne und Nucleomorph sind als rote Kreise dargestellt. Plastiden sind farbige und im Fall der sekundären Endocytobiosen mit ihren zusätzlichen Membranen skizziert. Das mit Ribosomen besetzte CER der Crypto- und Heterokontophyten ist mit schwarzen Punkten an der äußeren Plastidenhüllmembran angedeutet.

Ausgehend von Rot- bzw. Grünalgen als Endosymbionten entstanden durch unabhängige Endocytobiosen verschiedene weitere Algengruppen.

Ein Beleg für die sekundären Endocytobiosen wurde in der Entdeckung eines Kernrudiments (Nucleomorph) in der Plastidenhülle des Endosymbionten bei Chlorarachniophyten und Cryptophyten gesehen (Douglas et al. 1991; Hibberd und Norris 1984). Der Chlorarachniophyten- und Cryptophyten-Nucleomorph besteht aus drei kleinen Chromosomen mit einer Gesamtgröße von ungefähr 380 kb bzw. 515 kb. Es konnten bisher ribosomale Gene, Chaperone (hsp70), Zellteilungsproteine (FtsZ) bzw. Gene für den Transkriptionsapparat (RNAhel, RNApol) im Kernrudiment identifiziert werden (Gilson und McFadden 1996; Fraunholz et al. 1998). Cryptophyten weisen wie die Rotalgen Chlorophyll a und Phycobilisomen auf, verwenden aber zusätzlich noch Chlorophyll c als akzessorisches Pigment. Die Plastiden der amöboiden Chlorarachniophyta sind dagegen vermutlich von Grünalgen abgeleitet (McFadden et al. 1994; Van de Peer et al. 1996).

Beide Algengruppen als auch die große Gruppe der Heterokontophyta besitzen vier Hüllmembranen um die Plastiden. Für die Heterokontophyta, zu denen auch die Kieselalgen (Diatomeen) gehören, konnte bisher kein Kernrudiment im periplastidären Raum nachgewiesen werden. 1962 wurde erstmals eine ER-artige Umhüllung um die komplexen Plastiden der Chrysophyceen (Heterokontophyta) und Cryptophyceen gezeigt, für den Bouck 1965 den Begriff „Chloroplasten-ER (CER)“ prägte (Gibbs 1962; Bouck 1965). In den folgenden Jahren wurde dieser

„ER-Sack“ auch in anderen Heterokontophyten gefunden (Berkaloff 1963; Descomps 1963). Die von Rotalgen abgeleiteten Heterokontophyten-Plastiden verwenden Chlorophyll a und c als Pigmente (Reith et al. 1995, Adachi et al. 2000).

Auch für die Euglenophyten und den meisten Dinoflagellaten wird derzeit eine Entstehung durch eine sekundäre Endocytobiose favorisiert (Cavalier-Smith 1999). Nach Martin et al. (1998) sind die Euglenophyten mit den Chlorophyten und den höheren Pflanzen verwandt. Als zweiter Wirt wurden von Simpson (1997) die nächsten „tierischen“ Verwandten, die Euglenozoa, vorgeschlagen. Im Gegensatz dazu könnte es sich nach Cavalier-Smith (1999) bei den Euglenozoa aber auch um reduzierte, phagotrophe Euglenophyten handeln. Die Plastiden der Euglenophyten besitzen drei Hüllmembranen.

Dinoflagellaten stellen im Vergleich zu den anderen Algenlinien eine sehr heterogene Gruppe dar. Die meisten Dinoflagellaten besitzen wie die Euglenophyten Plastiden mit drei Hüllmembranen, die möglicherweise abgeleitet von Chlorophyten sind (Delwiche und Palmer 1997). Es wurden aber auch Arten mit bis zu fünf Hüllmembranen gefunden, die auf die Aufnahme (tertiäre Endocytobiose) von Haptophyten und Cryptophyten zurückgeführt werden kann (Cavalier-Smith 1997). Neben photoautotrophen Arten sind auch Organismen mit phagotropher Lebensweise gefunden worden. Endosymbiontische Arten (z.B. *Symbiodinium*) sind ebenfalls beschrieben worden (van den Hoek et al. 1993).

Das Plastom der Dinoflagellaten scheint grundlegend von derzeit bekannten Plastidengenomen abzuweichen. Anstelle den in einem zirkulären pflanzlichen Plastom organisierten 100 – 200 Plastidengenomen wurden bisher bei *Heterocapsa triquera* nur neun Gene im Plastom gefunden. Diese liegen außerdem anscheinend jeder auf einem Gen-Zirkel („Ein-Gen-ein-Ring“-Hypothese) (Zhang et al. 1999). Phylogenetische Analysen der gefundenen Gene deuten eine nähere Verwandtschaft der Dinoflagellaten zu Rotalgen bzw. Chromophyten (Cryptophyten und Heterokontophyten) an.

Die Gruppe der Apicomplexa bildet ein Beispiel für eine problematische Einteilung zwischen Algen und Protisten. Obwohl die Angehörigen dieser Gruppe bisher zu den „tierischen“ Einzeller gezählt worden sind, weisen sie den Besitz eines Plastidenrudiment mit vier Hüllmembranen, den Apicoplasten, auf. Der Apicoplast ist vermutlich durch sekundäre Endocytobiose aus einer Grünalge entstanden (Köhler et al. 1997), obwohl phylogenetische Untersuchung der Acetyl-CoA-Carboxylase I eher eine Verwandtschaft zu Diatomeen andeuten (Zuther et al. 1999). Die Apicomplexa sind durch den Malaria- sowie den Toxoplasmose-Erreger, *Plasmodium* bzw. *Toxoplasma*, für die Medizin von Bedeutung. Untersuchungen von Zuther et al. (1999) zeigen die Hemmbarkeit von *Toxoplasma* mit Herbiziden.

1.2. Ausgewählte Proteintransportwege innerhalb pflanzlicher Zellen

1.2.1. Der sekretorische Proteintransportweg

Eine zentrale Rolle für den Proteintransport innerhalb von eukaryotischen Zellen spielt das endoplasmatische Reticulum (ER) und das Golgi-Netzwerk (Harter und Wieland 1996). Erste Hinweise für eine Synthese von Proteinen und einem gleichzeitigen, kotranslationalen Transport am rauhen endoplasmatischen Reticulum wurden schon in den 70er Jahren gefunden (Blobel und Sabatini 1971; Palade 1975). Proteine, die in das ER transloziert werden sollen, bilden bei ihrer Translation an freien Ribosomen eine N-terminale Bindedomäne, die Signalsequenz (Abb. 1-2).

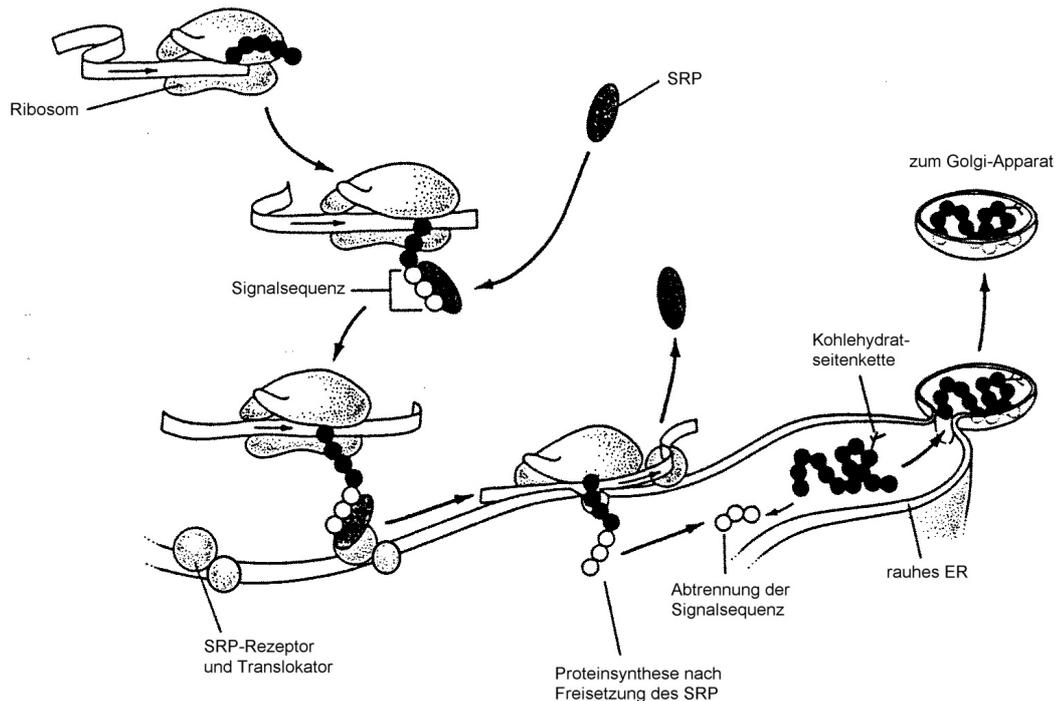


Abbildung 1 - 2 Kotranslationaler Transport an der ER-Membran

Darstellung der Proteinsynthese und Transport von sekretorischen Proteinen am ER. Nach Bindung der Signalsequenz durch das Signalerkennungspartikel (SRP) wird die Translation von ER-Proteinen erst nach Bindung des Ribosoms am rauhen Endoplasmatischen Reticulum und der Freisetzung des SRP ermöglicht. Während der Translation wird das Protein in das ER-Lumen transportiert, die Signalsequenz abgetrennt und bei Glykoproteinen mit Kohlenhydratketten (Glykosylierung) versehen. Anschließend werden sekretorische Proteine in Vesikel verpackt und zum Golgi-Apparat transportiert.

Diese Region wird von einem im Cytosol vorliegenden RNA-Proteinkomplex, dem Signalsequenz-Erkennungspartikel (SRP), erkannt. Die Anbindung des SRPs bewirkt eine Arretierung der weiteren Proteinsynthese am Ribosom. Das SRP besteht aus einem 7S-RNA-Grundgerüst und sechs verschiedenen Proteinen (Walter, Blobel 1982). Die Bindung der Signalsequenzen erfolgt durch die 54 kDa-Komponente (SRP54) des SRPs. Dieses besitzt eine methioninhaltige Bindedomäne mit einer Tendenz zur Ausbildung einer amphiphilen α -Helix, die sich auch in dem prokaryotischen Gegenstück Ffh aus *Thermophilus aquaticus* finden läßt (Bernstein et al. 1989; Keenan et al. 1998).

Die Signalsequenzen zeigen keine Konsensussequenz, jedoch eine vergleichbare Sekundärstruktur, Hydrophobizität und eine Aminosäurepräferenz zu bestimmten Positionen (von Heijne 1983; von Heijne 1984; von Heijne 1985).

Die weitere Synthese des Proteins wird erst durch eine GTP-abhängige Bindung des SRP-Ribosomen-Komplexes an einen SRP-Rezeptor an der ER-Membran und der Freisetzung des SRPs ermöglicht. Die Translokation des Protein erfolgt an einem bei Hefen und Säugern gut untersuchten Membranproteinkomplex (sec61, sec62 und sec63) (High und Stirling 1993). Die inaktive Pore mit einem Porendurchmesser von 9 – 15 Å wird von den BiP-Proteinen im ER-Lumen verschlossen. Während des Proteindurchtrittes kann sich die Pore auf bis zu 60 Å erweitern. An der Insertion von Proteinen in die ER-Membran ist zusätzlich das TRAM-Protein beteiligt (Wang und Dobberstein 1999). Zusätzlich zu dem kotranslationalen Import wurde ein posttranslatonaler Transport über den Translokationskomplex beschrieben (Deshaies et al. 1991; Rapoport et al. 1999).

Analog zu dem kotranslationalen Transport bei Eukaryoten findet sich ein kotranslatinaler Exportweg an der inneren Hüllmembran von prokaryotischen Organismen (Stroud und Walter 1999). Die Verwandtschaft des eukaryotischen und prokaryotischen Systems zeigt sich neben homologen Proteinen des Porenkomplexes (sec61 α und γ mit *E.coli* secY und E), des SRP-Komplexes bzw. seinem Rezeptor (*E.coli* Ffh, 4,5S-RNA, FtsY zu SRP54, SRP-RNA und SR α) auch in der funktionellen Analogie von eukaryotischen und *E.coli* Signalpeptidasen (Halpin et al. 1989; den Blaauwen et al. 1996; Valent et al. 1998).

Neben der Translokation von Proteinen hat das ER zusätzliche modifizierende Eigenschaften (Abb. 1-2). Die Signalsequenz wird durch eine membranständige Signalpeptidase entfernt. Außerdem kann das Protein an determinierenden Sequenzmotiven glykosyliert bzw. mit einem Lipidanker (GPI) versehen (Fiedler und Simons 1995; Wang et al. 1999).

Nach ihrem Eintritt in das ER werden die Proteine nach der „Bulk-Flow“-Hypothese durch einen vesikulären Transport in das cis-Golgi-Netzwerk transloziert (COPII-Mechanismus) (Kaiser und Ferro-Novick 1997; Barlowe 1998). Ob die in Vesikel zu verpackenden Proteine über eine Rezeptorbindung, über eine spezielle Pore oder beliebig sortiert werden, ist ungeklärt (Kirchhausen et al. 1997; Kuehn et al. 1997). Die meisten ER-residenten Proteine werden über ein C-terminales Signal (H/KDEL) bzw. bei Membranproteinen über ein Di-Lysin-Motiv in einem Gleichgewicht zwischen ER und cis-Golgi gehalten (Teasdale und Jackson 1996). Ihr Rücktransport vom Golgi-System wird durch den retrograden Transport (COPI-Weg) vermittelt (Cosson und Letourneur 1997). Dieser Weg ist auch an der Regelung der Lipidverteilung beteiligt (Nickel und Brügger 1999).

Eine zentrale Rolle bei der Verteilung von Proteinen innerhalb der Zelle kommt dem Golgi-System zu. Einerseits vermittelt es die Sekretion von Proteinen zu der Plasmalemma (Clathrin-Weg), andererseits ist es für die Sortierung zu den Lysosomen und Vakuolen zuständig (Füllekrug und Nillson 1998). So wie das ER eine Beteiligung an der Calcium-Regulation besitzt, weist das Golgi-System weitere Funktionen in der Zelle auf (Michalak et al. 1999; Dupree und Sherrier 1998). Bei Diatomeen ist es am Aufbau der Kieselsäureschale durch Bildung und Versorgung der Silicat-Lagerungsvesikel beteiligt (Kröger et al. 1996).

Grundlegend für die Abgrenzung der vesikulären Wege zueinander ist die spezifische Fusion von Vesikeln mit der Zielmembran. Zur Erklärung der Membran-/Organspezifität wurde von Rothman (1994) die SNARE-Hypothese entwickelt. Es wird vermutet, daß spezifische Rezeptoren auf den Vesikeln (v-SNAREs) und auf der Zielmembran (t-SNAREs) die Fusion von Membranen unterschiedlicher Herkunft ermöglichen (z.B. ER→Golgi), während t-SNAREs alleine die Verschmelzung identischer Membranen vermitteln (Golgi→Golgi) (Edwardson 1998).

Eine wichtige Rolle in der Regulation der SNAREs haben kleine cytoplasmatische GTPasen der RAS-Superfamilie, die RAB-Proteine (Martinez und Goud 1998). Weiterhin sind schon verschiedene Hüllproteine, die die Vesikel in ihrer Form halten, beschrieben worden (Faulstich et al. 1996; Cosson und Letourneur 1997; Kuehn und Schekman 1997). Die Clathrin-Hüllproteine, beteiligt am Vesikeltransport vom Golgi-Apparat zur Plasmalemma-Membran, zeigen in EM-Aufnahmen eine charakteristische tripode Struktur (Triskelion) (Smith et al. 1998). Bei der Regulation der Vesikelbildung wird eine zusätzliche Beteiligung von lipidmodifizierenden Proteinen und von Phosphatidylinositolen diskutiert (Roth und Sternweis 1997).

1.2.2. Proteintransport in die Plastiden von höheren Pflanzen

Der Transport von Proteinen in die Plastiden von höheren Pflanzen erfolgt ähnlich wie der Transport in die Mitochondrien durch eine posttranslationale Translokation der Polypeptide (Chua und Schmidt 1978). Die Proteine

werden an freien Ribosomen im Cytoplasma gebildet und anschließend im ungefalteten Zustand zum Organell transportiert. Entgegen den Mitochondrien konnte beim Import in die Plasiden bisher keine Mitwirkung von Transport-aktivierenden-Proteinen beschrieben werden (Voos et al. 1999).

Abhängig vom Plastiden-Protein kann nach dem Import in die Plastiden ein weiterer Transport z.B. in das thylakoidale System erfolgen (Robinson et al. 2000).

Die Translokation von Polypeptiden in den Chloroplasten erfolgt in den Hüllmembranen mittels zweier unabhängig agierender Proteinkomplexe, dem TOC- bzw. dem TIC-Komplex (*Translocon-at-the-outer/inner-envelope-membrane-of-chloroplasts*) (Scott und Theg 1996; Schnell et al. 1997) (Abb. 1-3). Beim Proteindurchtritt liegen die beiden Hüllmembranen dicht beieinander, weswegen zuerst von einem Transport an einer „Kontaktzone“ gesprochen wurde (Pain et al. 1988).

Bisher wurden verschiedene Komponenten der Translokatoren gefunden (Abb. 1-3) und in den Membranen lokalisiert (Morin und Soll 1997). Toc75 stellt eine spannungsabhängige Translokationspore (\varnothing 8 – 9 Å) der äußeren Hülle dar, wogegen Toc34 eine GTP-abhängige regulatorische Funktion besitzt (Schnell et al. 1994; Kessler et al. 1994; Hinnah et al. 1997). Der für die Präproteinbindung beschriebene Rezeptor Toc86 aus Erbsen stellt vermutlich nur ein Degradationsprodukt von Toc159 dar (Hirsch et al. 1994; Muckel und Soll 1996; Bölter et al. 1998). Eine weitere TOC-Komponente bildet ein 64 kDa-Protein (Sohr und Soll 2000). In der inneren Membran wurden bisher 4 Translokator-Proteine charakterisiert. Tic20 bildet die Pore und das periphere Tic22 stellt möglicherweise den Vermittler für die Präproteine vom TOC- zum TIC-Komplex dar (Kouranov et al. 1998). Die Funktion von Tic55 und Tic110 ist derzeit noch unbekannt (Caliebe et al. 1997).

Untersuchungen von Heins et al. (1998) legen die Vermutung nahe, daß einige der Komponenten der Translokatoren einen cyanobakteriellen Ursprung besitzen. Die in Abb. 1-3 rot dargestellten Proteine (Toc 34, Toc75, Tic22, Tic20, Tic55) zeigen Homologien zu offenen Leserastern im sequenzierten Genom der Blaualge *Synechocystis* 6803 (Kaneko et al. 1996; Reumann und Keegstra 1999). Die Funktion der cyanobakteriellen Analoge als auch der Ursprung der Proteine Toc159 und Tic110 ist derzeit unklar.

Kompetitionsversuche zeigen, daß wahrscheinlich alle innerplastidären Proteine über den TOC/TIC-Komplex in die Plastiden transportiert werden (Cline et al. 1993). Hierfür ist ein zusätzliches N-terminales Adressierungssignal, die Transitsequenz, am reifen Plastiden-Protein notwendig. Sie ist in ihrer Funktion unabhängig vom reifen Protein (van't Hof und de Kruijff 1995; Keegstra et al. 1995). Nach dem Import über die Hüllmembran wird das Transportsignal durch die stromale Transitpeptidase, eine Metallopeptidase, abgespaltet (van der Vere et al. 1995; Richter und Lamma 1999) (Abb. 1-3). Wie Mitochondrien-Transportsignale besitzen Transitsequenzen keine größeren Sequenzhomologien, jedoch einen hohen Grad hydroxylierter Aminosäuren sowie häufig das Schnittstellenmotiv I/V-X-A/C (Gavel und von Heijne 1990).

Anders als bei den Mitochondrien wird für den Import in die Plastide neben Energieäquivalenten kein elektrochemischer Gradient über die Membranen benötigt (Flügge und Hinz 1986; Pain und Blobel 1987; Neupert 1997). Zur Steigerung der Bindungsaffinität an den Rezeptor reichen geringe Mengen von ATP ($< 50 \mu\text{M}$) oder anderer Nukleotide aus (Olsen et al. 1989). ATP-Mengen zwischen 25 – 100 μM im Intermembranraum vermitteln nach Scott und Theg (1996) den Transport über den TOC-Komplex und ATP-Mengen über 250 μM den vollständigen Import in die Plastiden. Das interne ATP wird für die plastidären Chaperone benötigt (Ivey et al. 2000).

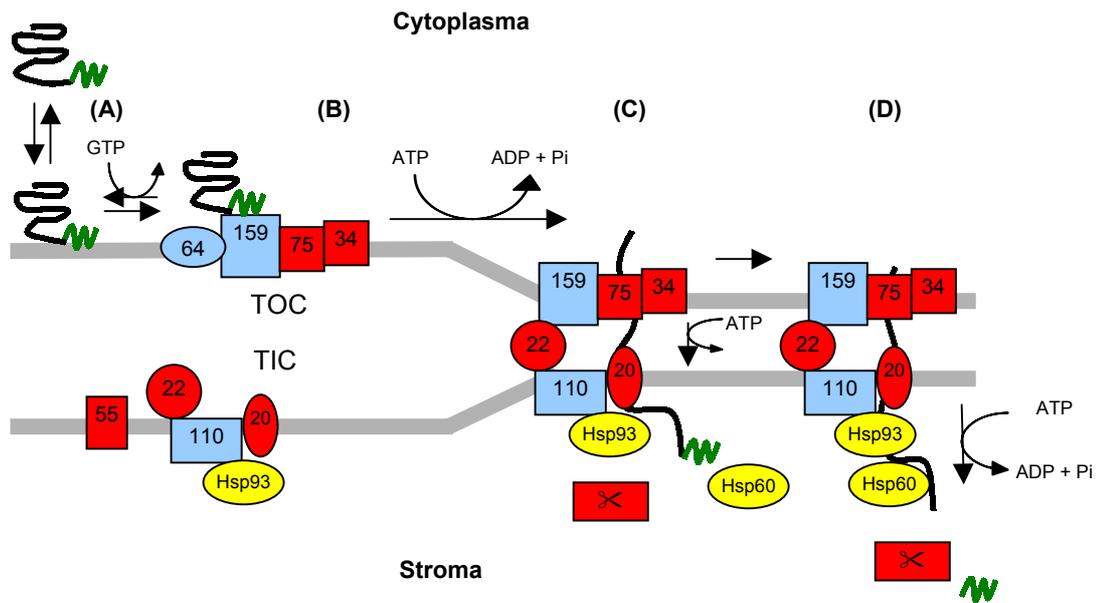


Abbildung 1 - 3 Proteintransport über die Plastidenhülle von höheren Pflanzen

Schematische Darstellung der Importvorgänge für kernkodierte Plastiden-Proteine in die Chloroplasten und Darstellung der Komponenten des TIC- oder TOC-Komplexes mit ihrem möglichen evolutionären Ursprung.

Nach der Assoziation des Präproteins an die Plastidenhülle durch die Transitsequenz (A) und anschließender Bindung an den TOC-Apparat (B) erfolgt ein Transport durch den TOC- und TIC-Komplex (C). Die Transitsequenz (grüne Linie) wird nach dem Import in das Stroma durch eine Transitpeptidase (✂) prozessiert und das Protein durch plastidäre Chaperone stabilisiert (D).

Blau und Rot markieren kernkodierte Translokator-Komponenten, wobei rote Proteine Verwandtschaft zu Proteinen aus *Synechocystis spec. SPP6803* zeigen. Gelb bezeichnet plastidär kodierte Proteine.

Grafik nach Keegstra und Froehlich (1999), Reumann und Keegstra (1999).

Ob diese als „Motor“ einen aktiven Transport der Proteine über die Membran ermöglichen („swing-cross-bridge“-Mechanismus) oder bei Brown'schen Molekularbewegungen („brownian ratchet“-Mechanismus) als Anker eine Rückbewegung verhindern, ist derzeit ungeklärt.

1.2.3. Proteintransport in die Plastiden von Algen

Im Gegensatz zu den höheren Pflanzen ist der Proteintransport in die Plastiden der verschiedenen Algenlinien bisher nur wenig untersucht worden. Neben einem Transport kernkodierter Plastiden-Proteine über zwei plastidäre Hüllmembranen (Rhodo- bzw. Chlorophyta) ist je nach Algengruppe ein Transport über drei (Dinoflagellaten, Euglenophyten) oder mehr Hüllmembranen (Heterokontophyta, Cryptophyta, Chlorarachniophyta) vorhanden.

Untersuchungen an kernkodierten Plastiden-Proteinen von Grün- und Rotalgen zeigen eine Transitsequenz mit vergleichbaren Eigenschaften zu höheren Pflanzen, die den Import in die Plastiden der höheren Pflanzen erlaubt (Yu et al. 1988; Apt et al. 1993).

Für die Glaucocystophyten, welche ebenfalls zwei Hüllmembranen besitzen, konnte Jakowitsch et al. (1996) ein Transport von Prä-Ferredoxin-NADP⁺-Oxidoreduktase aus *Cyanophora paradoxa* in Cyanellen und Erbsenplastiden belegen. Ein Hinweis auf einen Transportmechanismus innerhalb der Peptidoglycanwand (zwischen den beiden Hüllmembranen) konnte bisher nicht gezeigt werden.

Die zweigeteilten Transportsequenzen der Euglenophyten, die drei Hüllmembranen um die Plastiden besitzen, weichen von allen bekannten Formen durch ihre außergewöhnliche Länge mit über 100 Aminosäuren stark ab.

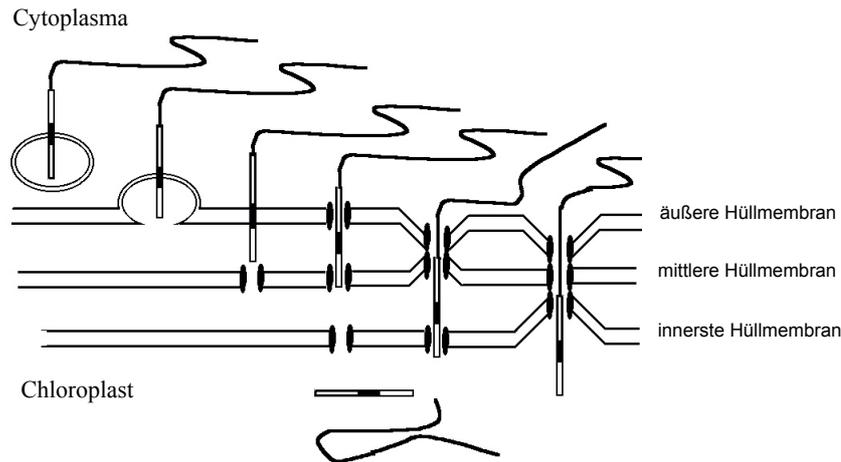


Abbildung 1 - 4 Transport von Plastiden-Proteinen über die plastidären Hüllmembranen der Euglenophyten

Integration von Plastiden-Proteinen von *Euglena* aus dem Transportvesikel in den Chloroplasten aus Sulli et al. (1999). Durch die Stop-Transfer-Domäne (schwarzer Block) in der Transitsequenz (weiß) verbleibt der größte Teil des Plastiden-Proteins außerhalb des vom Golgi-Apparat kommenden Vesikels. Nach Erkennung der restlichen Transitsequenz durch den TOC-Komplex wird das Protein über den TIC-Komplex in die Plastide transportiert.

Die erste Domäne der Euglenophyten-Transportsequenz wird durch die *E.coli*-Signalpeptidase korrekt prozessiert und führt zum kotranslationalen Import in das ER (Shashidhara et al. 1992; Schwartzbach et al. 1998). Innerhalb der langen zweiten Region, die teilweise Charakteristika der Transitsequenzen der höheren Pflanzen aufweist, befindet sich eine hydrophobe Stop-Transfer-Domäne, die zu einer ER-Membranverankerung führt (Sulli et al. 1999). Nach einem vesikulären Transport der Proteine zum Golgi-Apparat und nachfolgend zum Chloroplasten führt möglicherweise die Erkennung des N-terminalen Teiles der Transitdomäne an der mittleren Plastidenmembran zu einem Transport über die drei Hüllmembranen (Abb. 1-3) (Sulli et al. 1999). Offen bleibt in diesem Modell die Art und der Ursprung des Porenkomplexes innerhalb der äußeren Hüllmembran. Ferner legt die postulierte Translokation der Plastiden-Proteine über die drei Hüllmembranen einen aktiven Transport der Proteine („swing-cross-bridge“- Mechanismus) in die Plastide nahe.

Bei Euglenophyten wurden zudem Präproteine mit bis zu acht hintereinandergeschalteten plastidären Einzelproteinen entdeckt, die erst nach Eintritt in das Stroma voneinander getrennt werden (Chan et al. 1990). Thylakoidproteine wie OEE30 und cyt c_6 weisen im weiteren ein drittes Adressierungssignal auf (Vacula et al. 1999).

Obwohl die meisten Dinoflagellaten ebenfalls wie die Euglenophyten drei Hüllmembranen besitzen, sind die zweigeteilten Transportsequenzen deutlich kürzer und besitzen keine Ankersequenz. Dennoch wurde von Schwartzbach et al. (1998) ein Transport analog dem von Euglenophyten favorisiert. Anstelle der Verankerung in der Membran könnten die Plastiden-Proteine in die Vesikel verpackt werden.

Plastiden der Heterokontophyta und Cryptophyta mit ihren vier Hüllmembranen weisen eine mit Ribosomen besetzte äußere Plastidenhülle (CER) auf (Gibbs 1962). Das Heterokontophyta-CER scheint elektronenmikroskopischen Aufnahmen zufolge mit der Kernmembran (z.B. *Phaeodactylum tricorutum*, Diatomee) und/oder mit dem normalen ER vernetzt zu sein (z.B. *Vaucheria*, Xanthophyceae oder *Nitzschia palea*, Diatomee) (Borowitzka et al. 1977; Drum 1963; zum Überblick: Gibbs 1981).

1979 schlug Sarah Gibbs vor, daß das CER an der Synthese und damit am Transport von kernkodierten Plastiden-Proteinen beteiligt sein könnte. Dieses Postulat wurde erstmalig durch den Import von *in-vitro*-translatiertem Fucoxanthin-Chlorophyll-a,c-bindendem Protein (FCP) aus der Kieselalge *Phaeodactylum tricoratum* in ER-Vesikel von Bhaya und Grossman (1991) bestätigt.

Das Vorhandensein eines zweiten Adressierungssignales in der Transportsequenz von Diatomeen wurde von Panic und Strotmann (1993) vorgeschlagen.

1.2.4. Proteintransport in die Thylakoide von höheren Pflanzen

Plastiden-Proteine, die in das Thylakoidlumen transloziert werden, besitzen im Gegensatz zu den stromalen Proteinen eine zusätzliche Domäne am C-Terminus der Transitsequenz (Hageman et al. 1990; v. Heijne et al. 1989). Diese Domäne weist Ähnlichkeiten zu prokaryotischen Signalsequenzen (Exportsignal) auf. Die thylakoidale Transferdomäne kann durch die *E.coli*-Signalpeptidase (Halpin et al. 1989) prozessiert werden und ermöglicht die Sekretion aus *E.coli* (Meadows und Robinson 1991). Ebenso zeigt die cyanobakterielle Thylakoidpeptidase funktionelle Homologien zu der thylakoidalen Transitpeptidase, einer Serin-Lysin-Protease (Wallace et al. 1990; Chaal et al. 1998). Nach der Prozessierung sorgen Chaperone innerhalb des Thylakoidlumens für eine korrekte Faltung (Abb. 1-5) (Schlicher und Soll 1996).

Die vorgeschaltete Stroma-Transportdomäne von Thylakoidproteinen enthält keine spezifische Informationen für den Import in das Thylakoidlumen und ist austauschbar (Cohen et al. 1995; Smeekens et al. 1986; Ko und Cashmore 1989).

Kompetitionsstudien von Cline et al. (1993) zeigten, daß der Transport von lumenalen Proteinen in die Thylakoide über zwei getrennte Transportsysteme erfolgt. Bei dem sec-abhängigen Transport von Plastocyanin und OEE33 sind im Stroma neben ATP, Chaperonen auch das secA und somit das prokaryotische Sekretionssystem beteiligt (Bauerle und Keegstra 1991; Hulford et al. 1994; Robinson et al. 1994). Weitere Komponenten des Sec-Systems sind unter anderem bei der Rotalge *Cyanidium* und bei Chromophyten wie *Odontella* gefunden worden (zum Überblick: Vogel et al. 1996). SecY aus Glaucocystophyten (*Cyanophora paradoxa*) kann funktionell das E.coli-Analog ersetzen (Flachmann et al. 1993). Schuenemann et al. zeigten 1999 den direkten funktionellen Beleg für die Beteiligung von secY/E an der Translokation von OEE33.

Erst seit kurzem sind Komponenten des Δ pH-Proteintransportweges wie die beiden Mais-Proteine Hcf106 und tha4 bekannt, welche den bakteriellen TAT-Proteinen aus *E.coli* ähneln (Walker et al. 1999; Sargent et al. 1998). Proteine wie das OEE23 und OEE17, die den Sec-unabhängigen Transportweg verwenden, benötigen als Triebkraft nur einen Δ pH über die Thylakoidmembran (Cline et al. 1992; Robinson et al. 1994). Transportsequenzen des bakteriellen Sec-unabhängigen Weges werden durch den plastidären Δ pH-Mechanismus erkannt (Wexler et al. 1998; Stephans 1998). Wie auch für bakterielle Sec- und ER-Proteine beschrieben erfolgt der Import der Thylakoidproteine über die Ausbildung eines Loops (Kuhn et al. 1994; Mothes et al. 1994; Fincher et al. 1998).

Thylakoidale Membranproteine besitzen in der Regel ebenso wie lumenale Thylakoidproteine eine zweigeteilte N-terminale Sequenz (Cohen et al. 1995). Die einzigen Ausnahmen stellen bisher das Rieske-Protein und das Chlorophyll-a,b-bindende Protein (LHC) dar, welche interne Adressierungssignale besitzen (Cline 1988; Lamppa 1988; Madueno et al. 1992; Madueno et al. 1994).

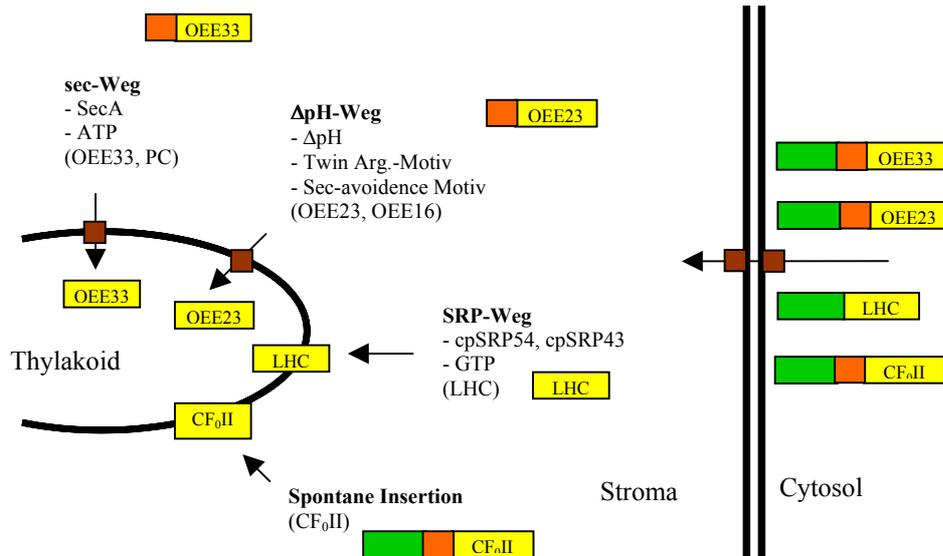


Abbildung 1 - 5 Thylakoidimportwege bei höheren Pflanzen

Schematische Darstellung der Transportwege und bekannten Bedingungen in den Chloroplasten und Thylakoid von thylakoidalen Proteinen. Beispielproteine sind in Klammern aufgeführt. Gelb unterlegt ist das reife Protein dargestellt, grün die Transitsequenz und orange die Thylakoid-Transportdomäne.

Proteine wie die CF₀-Untereinheit II, PSII-W bzw. PSII-X weisen im Gegensatz zu den anderen Thylakoidproteinen keine Abhängigkeit von ATP, ΔpH sowie stromalen Faktoren auf, sondern integrieren direkt (Kim et al. 1996; Robinson et al. 1998). Wenngleich auch CF₀II spontan integriert, ermöglicht die Präsenz den Transport über den Sec-Weg (Michl et al. 1999).

LHC-Proteine stellen das bisher einzige Substrat für den SRP-Weg dar. Obwohl erstmals eine Beteiligung von Chaperonen gezeigt wurde, benötigt der Transport stromale Faktoren, die Ähnlichkeiten zu Komponenten des kotranslationalen Transportes aufweisen (Yalovsky et al. 1992; Yuan et al. 1993; Li et al. 1995). LHC-Proteine können in E.coli exprimiert und auch in Abwesenheit von Chlorophyllen in die Bakterienmembran integriert werden (Kohorn et al. 1991). Erste Experimente zeigten eine ATP-Abhängigkeit und eine Steigerung mit einem transthylakoidalen ΔpH (Cline et al. 1992). Heute gilt jedoch eine GTP-Abhängigkeit als gesichert (Tu et al. 1999). Nach dem Import in die Stromalamellen akkumulieren die LHCs im Granabereich und bilden trimere Strukturen aus (Yalovsky et al. 1992; Hobe et al. 1994).

1.3. Die Kieselalgen

Die Untersuchungsobjekte *Odontella sinensis*, *Coscinodiscus granii* und *Phaeodactylum tricornutum* gehören in der Abteilung Heterokontophyta zu der Klasse der Bacillariophyceae (= Diatomeen, Kieselalgen) (v.d. Hoek et al. 1993).

Die Diatomeen zeichnen sich als einzellige oder koloniebildende Algen durch den Besitz einer zweiteiligen Kieselschale (Frustulum) aus Silikat, Polysacchariden und Proteinen aus (Kroth und Strotmann 1999). Die zum Aufbau der Kieselschalen notwendige Kondensation der Kieselsäure beginnt in sogenannten „Silicon-deposition-vesicels“ (SDV) unter sauren Bedingungen (Vrieling und Gieskes 1999). Über die Proteinmatrix der Schalen ist derzeit noch wenig bekannt.

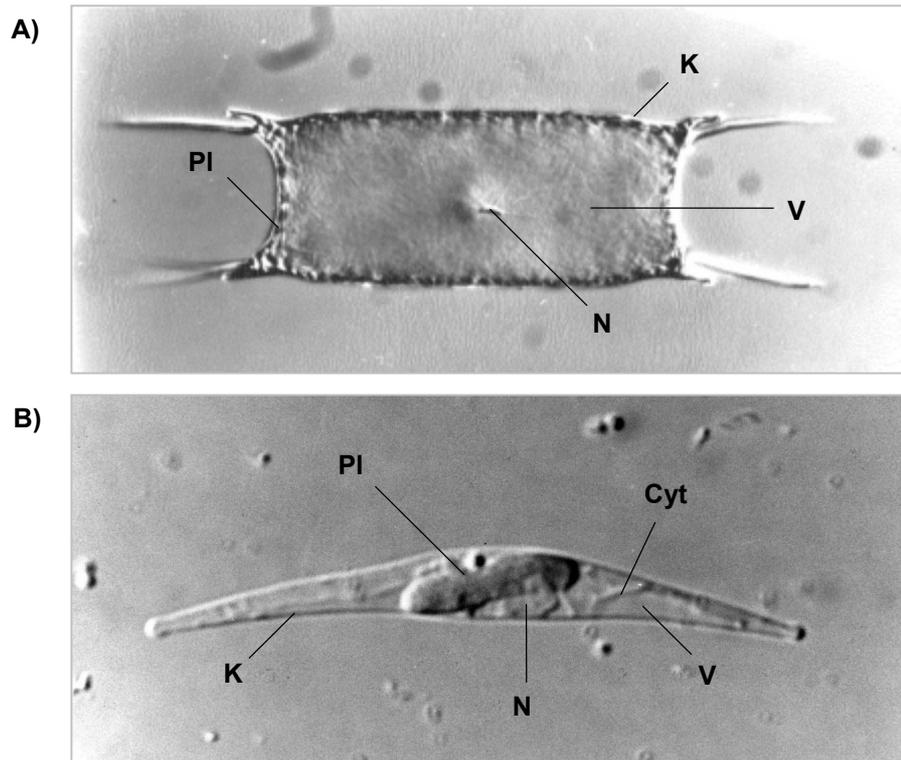


Abbildung 1 - 6 Aufnahmen einer einzelnen Zelle *Odontella sinensis* und *Phaeodactylum tricornerum*

Lichtmikroskopische Aufnahme von der pennaten Kieselalge *Odontella sinensis* (A) und der centralen Diatomee *Phaeodactylum tricornerum* (B). Je nach Aufnahme sind der Nukleus (N), die Plastiden (PI), die Vakuole (V), die Kieselschalen (K) sowie Cytoplasmastränge (Cyt) sichtbar. *Phaeodactylum* besitzt in der Regel nur einen Chloroplasten, wohingegen die Kieselalge *Odontella* im Cytoplasmasaum eine große Anzahl an Plastiden aufweisen kann. *Phaeodactylum* ist zwischen 10 - 20 µm lang, *Odontella* um die 200-400 µm.

Das Protein HEP200 aus *Cylindrotheca* bildet möglicherweise das Proteingrundgerüst, wogegen polykationische Proteine (Silaffine) an der Silikat-Präzipitation beteiligt sind (Kröger et al. 1997; Kroger et al. 1999). HEP200 als auch die ebenfalls in Kieselschalen gefundenen Frustuline werden über den sekretorischen Weg transportiert (Kröger et al. 1996).

Bei der vegetativen Zellteilung der Diatomeen wird immer die kleinere Schale, die „Hypotheka“, neugebildet. Die daraus folgende stetige Verkleinerung der Tochterzellen wird erst durch Einsetzen eines geschlechtlichen Vermehrungszyklus unterbrochen. Aufgrund der Art der Schalensymmetrie werden zwei Ordnungen, die Pennales (bilateralsymmetrisch) und die Centrales (radiärsymmetrisch), unterschieden. *Odontella* und *Coscinodiscus* gehören zur ersteren, *Phaeodactylum* zur letzteren Gruppe.

Die Chloroplasten der Diatomeen besitzen insgesamt vier Hüllmembranen, wobei die beiden äußersten Membran als Chloroplasten-ER bezeichnet werden (v.d. Hoek et al 1993). Dicht an der inneren Hüllmembran liegt eine Dreier-Stapelung von Thylakoiden, die Gürtellamelle. Die Diatomeen-Plastiden besitzen Chlorophyll a und c als akzessorische Pigmente sowie zum Schutz vor starkem Licht das braune Carotinoid Fucoxanthin. Neben dem Fucoxanthin besitzen die Kieselalgen auch noch β -Carotin, Neofucoxanthin, Diatoxanthin und Diadinoxanthin (v.d. Hoek et al. 1993). Als Speicherstoff bilden Diatomeen β -1,3-Glucane (Chrysolaminarin), welche sie in besonderen Vakuolen außerhalb der Plastiden speichern (Crawford 1973). Der Ort der Chrysolaminarin-Bildung innerhalb der

Zelle ist derzeit noch offen. Die Befähigung der Plastiden zum Export von Triosephosphaten und der Aufbau der Speichervakuolen deuten auf eine Synthese im ER hin (Wittpoth 1996; Wittpoth et al. 1998).

Ökologisch bedeutsam sind die Kieselalgen durch ihre große Verbreitung in den Weltmeeren. Sie sind zum größten Teil an der Silicatbildung in den Meeren und durch ihren großen Anteil an der CO₂-Fixierung ein wichtiger Faktor in der Speicherung von CO₂ für das Klima (Smetacek 1999). Diatomeen sind auch in sehr Silizium-armen Gewässern befähigt, Kieselsäure zu konzentrieren. Die Sedimentation von abgestorbenen Diatomeen führte in der Erdgeschichte (Tertiär) zur Ausbildung von Kieselerde, welches eine weite Verbreitung als Scheuermittel, Adsorber und sogar als natürliches Insektizid besitzt (Gunther et al. 1995; Korunic 1998). Große Teile der von Diatomeen fixierten Kieselsäure wird aber durch Bakterien wieder rückgeführt (Bidle und Azam 1999).

1.4. Zielsetzung

Der Proteintransport in die Plastiden von Diatomeen ist im Hinblick auf die Evolution der sekundären Endocytobiosen von besonderem Interesse. Diatomeen besitzen im Gegensatz zu Plastiden von höheren Pflanzen Chloroplasten mit insgesamt vier Hüllmembranen. Daraus ergibt sich die Fragestellung, welche Unterschiede zu dem bekannten Proteintransport der höheren Pflanzen für kernkodierte Plastiden-Proteine der Kieselalgen vorhanden sind und in wieweit vorhandene Transportsysteme für diese neuen Bedingungen adaptiert wurden.

Ziel der Arbeit ist die Beschreibung des Plastidenimports durch die funktionelle Charakterisierung der Transportsequenzen der kernkodierten plastidären Proteine in *in-vitro*- und *in-vivo*-Experimenten. Durch Modifikationen der Transportsequenzen sollen für den Import relevante Sequenzbereiche beschrieben werden. Experimente mit heterologen Transportsequenzen sollen zudem eine Aussage über vergleichbare Transportsysteme bei den unterschiedlichen Algen- und Pflanzenlinien ermöglichen.

Parallel zu der Beschreibung des Proteintransportes in die Plastiden soll der weitergehende Transport von Thylakoidproteinen innerhalb der Diatomeen-Plastiden betrachtet werden.

Auf Grundlage der erhaltenen Ergebnisse soll ein Erklärungsmodell für den Transport in und innerhalb der komplexen Plastiden am Beispiel der Kieselalgen aufgestellt werden.

2. Material und Methoden

2.1. Allgemeines

2.1.1. Chemikalien

Verwendete Chemikalien hatten, wenn nicht anders angegeben, die Qualitätsstufe „per Analysis“. Materialien wurden von den Firmen Fluka, Merck, Sigma, Roth, Roche (Boehringer-Mannheim), Promega, MBI Fermentas, New England Biolabs und Stratagene verwendet.

³²P-ATP, ³⁵S-L-Methionin und Amplify stammen von der Firma Amersham. Die Autoradiographie wurde mit Filmen von Kodak X-Omat bzw. mit Fuji XR-100 detektiert.

2.1.2. Gene und Vektoren

Vektoren stammten von der Fa. Promega (sp72 und sp73) und der Fa. Stratagene (pBluescript SK bzw. KS).

Nachfolgende Genkonstrukte wurden freundlicherweise zur Verfügung gestellt:

patpC (<i>Odontella sinensis</i>)	Dr. Kroth, HHU-Düsseldorf (D)
patpC (<i>Phaeodactylum tricornutum</i>)	Dr. Apt, Martek Corp. Maryland (USA)
patpC (<i>Spinacia oleracea</i>)	Prof. Herrmann, LMU-München (D)
pFCP (<i>Odontella sinensis</i>)	Dr. Kroth, HHU-Düsseldorf (D)
pFCP (<i>Phaeodactylum tricornutum</i>)	Dr. Apt, Martek Coop. Maryland (USA)
pPRK (<i>Odontella sinensis</i>)	Dipl. Biol. Weyrauch, HHU-Düsseldorf (D)
pOEE23 (<i>Triticum spec.</i>)	Prof. Robinson, Warwick University (GB)
pLHC (<i>Pisum sativum</i>)	Prof. Cline, Florida University (USA)
pPC (<i>Spinacia oleracea</i>)	Prof. Herrmann, LMU-München (D)
pPCP (<i>Symbiodinium spec.</i>)	Prof. Miller, James Cook University of North Queensland (AU)
PTV-Transformationsvektor	Dr. Apt, Martek Coop. Maryland (USA)
pSSUnitEGFP-pet28 (<i>Euglena gracilis</i>)	Prof. Schwartzbach, Lincoln University Nebraska (USA)
pLHCa1 (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	Dr. Grimm, IPK Gatersleben (D)

2.1.3. Kultivierung des biologischen Materials

2.1.3.1. *Escherichia coli*

Zur Klonierung wurden die *Escherichia coli*-Sicherheitsstamm XL1-blue und DH5 α verwendet. Kulturen des Bakteriums wurden bei 37°C in der Regel über Nacht geschüttelt (180-220 rpm). Als Kulturmedium wurde LB (NaCl 5 g/l, Hefeextrakt 10 g/l, Bacto-Trypton 10 g/l, pH 7) oder 2YT (5 g/l NaCl, 10 g/l Hefeextrakt, 16 g/l Bacto-Trypton, pH 7) mit und ohne Ampicillin 50 – 100 μ g/ml verwendet. Flüssige Stammkulturen enthielten mind. 15 % Glycerin im Kulturmedium.

Kulturplatten enthielten zusätzlich noch 1,5 % Agar-Agar und bei Bedarf Ampicillin 50 – 100 μ g/ml, X-Gal 60 μ g/ml und IPTG 60 μ g/ml.

2.1.3.2. *Odontella sinensis*, *Coscinodiscus granii* und *Phaeodactylum tricornutum*

Algenkulturen von *Odontella sinensis* und *Coscinodiscus granii* wurden im Tag/Nachtrhythmus von 14h/10h bei 16°C mit 6-8 $\mu\text{mol Photonen/m}^2 \times \text{sec}$ (Lichtfarbe 21) als Luft-begaste semi-kontinuierliche Batch-Kultur gehalten. Das Kulturmedium war ein artifizielles Seewasser (Tropic-Marine, pH 7 – 7,3) supplementiert mit 0,03 mM Na_2HPO_4 und 0,5 mM NaNO_3 . Nach Fremdkeimreduzierung über Nacht (>8 h mit 100°C) wurde sterile Kieselsäure (0,03 ‰) und 10 μl Vitamine /l Seewasser (Vit B₁₂ 160 $\mu\text{g/l}$, Biotin 80 $\mu\text{g/l}$, Thiamin/Cl 2 mg/l) zugegeben.

Phaeodactylum tricornutum wurde im Dauerlicht bei 20 bzw. 25°C und 50 $\mu\text{mol Photonen/m}^2 \times \text{sec}$ in F2-Medium als Schüttel- bzw. Luft-begaste semi-kontinuierliche Kultur gehalten. Ein Liter F₂-Medium beinhaltete 50 bzw. 100% autoklaviertes artifizielles Seewasser, pH 7 sowie zusammengefaßt und über eine 0,22 μm -Filter sterilfiltriert 0,5 ml F2-Vitamine, 1 ml 2 M Tris pH 8, 1 ml NaNO_3 -Lsg. (75g/l), 1 ml NaH_2PO_4 -Lsg. (5g/l) und 1 ml F2-Metalls. Nachträglich wurden 250 μl $\text{Na}_2\text{SiO}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$ -Lsg (30 g/l) sterilfiltriert und zugesetzt. Kulturplatten enthielten zusätzlich noch 1,2 % Agar-Agar und bei Bedarf Kanamycin 37,5 $\mu\text{g/ml}$ und Zeocin 75 $\mu\text{g/ml}$.

F2-Vitamine: 100 μl Vitamin B₁₂, 1 ml Biotin, 20 mg ThiaminHCl, ad. 100 ml Aqua bidest. steril

F2-Metalls : je 100 μl ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,98g/100 ml; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2,2g/100 ml; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,98g/100 ml; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 1,8g/100 ml; $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,63g/100 ml; alle steril) mit 0,436 g Na_2EDTA und 0,315g $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ auf 100 ml (Aqua bidest. steril) aufgefüllt

2.2. Klonierung von DNA

2.2.1. Endonucleolytische Restriktion, Klenow-fill-in, Phosphorylierung, alkalische Dephosphorylierung und Ligation

Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen erfolgte unter den durch den Hersteller angegeben Bedingungen. Die eingesetzte Enzymmenge richtete sich nach den Angaben zur Aktivität der Enzyme. Es wurde eine Enzymeinheit (IU) für den Dau von 1 μg DNA in einer Stunde und der mitgelieferte bzw. analoge Puffer anderer Hersteller verwendet.

Klenow-fill-in erfolgte wie vom Hersteller des Klenow-Enzyms gefordert. Zusätzlich wurden alle Nukleotide beigefügt (25 μM). Zur Herstellung radioaktiv markierter Sonden für die Koloniehybridisierungen wurde ³²P-ATP verwendet.

Dephosphorylierung von Fragmentenden erfolgten mit der alkalischen Phosphatase von Roche (Boehringer Mannheim) entsprechend den Angaben für 30 min. 37°C. Gestoppt wurde die Reaktion mit 10 mM EDTA und anschließender Hitzedeaktivierung bei 65°C 15 min. bzw. mit Aufreinigung der Probe durch Phenol:Chloroform-Extraktion.

Zur Phosphorylierung von DNA-Enden (z.B. Primer) wurde die T4-Polynukleotidkinase (Fa. Roche) mit ATP für 30 min. 37°C entsprechend den Herstellerangaben verwendet.

Ligationen erfolgten im 10 μl -Reaktionsansatz mit 1 : 1 bzw. 1 : 3 Verhältnis von Vektor zu Insert. Es wurden T₄-DNA Ligase von Roche oder Promega nach Herstellerangaben verwendet. Der Reaktionsansatz wurde bei Raumtemperatur für 1 bis 16 Std., im allgemeinen über Nacht bei 4°C (blunt end) oder 16°C (sticky end) inkubiert. Für blunt-end-Ligationen wurde die 10fache Menge Enzym verwendet.

2.2.2. Transformation von *E.coli*

2.2.2.1. Herstellung transformationskompetenter Zellen

Zur Herstellung gefrierkompetenter Zellen nach der Rubidiumchlorid - Methode (Hanahan 1983) wurde eine 30 ml *E.coli*-Kultur bis zu einer optischen Dichte von 0,3 OD (Wellenlänge 550 nm) wachsen gelassen. Die Kultur wurde 10 bis 15 min. auf Eis gekühlt und anschließend bei 2000 bis 3000 g (5000 rpm, Rotor JA-20, Beckmann) für 12 bis 15 min. bei 4°C zentrifugiert. Alle verwendeten Materialien wurden vorher autoklaviert bzw. sterilfiltriert (0,22 µm-Filter). Die pelletierten Zellen wurden in 1/3 Volumen kalter Lösung I (100 mM RbCl, 50 mM MnCl₂, 30 mM KOAc, 10 mM CaCl₂, 15 % Glycerin, mit Essigsäure auf pH 5,8) vorsichtig resuspendiert, 15 min. auf Eis inkubiert und nochmals durch eine Zentrifugation mit den obigen Bedingungen pelletiert. Die Zellen wurden dann in 1/12,5 Vol. Lösung II (10 mM MOPS, 10 mM RbCl, 75 mM CaCl₂, 15 % Glycerin mit NaOH auf pH 6,8) sanft resuspendiert (starkes Schütteln verringert die Ausbeute). Nach einer Inkubation von 15 min. wurde die Kulturlösung in Aliquots zu 200 µl aufgeteilt und in flüssigen Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der Zellen erfolgt bei -70 °C.

Die Herstellung elektrotransformationskompetenter Zellen erfolgte nach den Angaben der Firma BioRad für die Transformation mit dem *E.coli*-Pulser.

2.2.2.2. Transformation

Zur Transformation von Plasmid-DNA mittels gefrierkompetenter Zellen wurde ein Aliquot (200 µl) auf Eis aufgetaut und mit 1 bis 2 µl entsalzenerm Ligationsansatz (nach zweimaliger DNA-Fällung mittels Ethanol) für 30 min. gemeinsam inkubiert. Die Aufnahmekompetenz der Zellen wurde durch einen Temperaturwechsel für 2 min. bei 42 °C und 1 min. auf Eis beendet. Anschließend wurde 1 ml Bakterienkulturmedium zugesetzt und die Zellen für 1 Std. bei 37 °C zur Antibiotikaresistenzbildung geschüttelt.

Transformation mit dem *E.coli*-Pulser (Fa. Biorad) erfolgte wie vom Gerätehersteller beschrieben mit 2,5 kV-Puls. Es wurde 1 µl über EtOH-Fällung (Kap. 2.2.3.1.) gut entsalzener Ligationsansatz verwendet. Resuspendierung und Inkubation der Zellen erfolgte mit vorgewärmten LB-Medium für 30 min..

Die Gewinnung einzelner Klone nach der Transformation erfolgte durch eine Ausplattierung auf 2YT bzw. LB-Agarplatten (Ampicillin-haltig). Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Die Ausbeute nach Elektrotransformation war um mind. Faktor 10 höher.

2.2.3. DNA-Aufreinigung

2.2.3.1. Plasmid-DNA-Isolation

Die Plasmid-DNA-Präparation aus *E.coli* erfolgte mit der "alkalischen Lyse" nach Birnboim und Doly (1979). Aus einer 1,5 l ü.N.-Kultur wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation bei 12.000 rpm für 30 sec. abpelletiert und mit 100 µl eiskalter Lösung I (50 mM Glucose, 10 mM EDTA, 25 mM Tris/HCl pH 8) resuspendiert. Nach der Zugabe von 150 µl Lösung II (0,2 M NaOH, 1 % SDS) mit Raumtemperatur wurde der Ansatz mehrmals Kopf-über-Kopf geschwenkt. Die alkalische Lyse der Bakterien wurde durch Zugabe von 150 µl Lösung III (3M Kaliumacetat, 5 M Essigsäure, sterilfiltriert) gestoppt, der Ansatz vorsichtig geschwenkt und für 5 min. auf Eis inkubiert. Zur Abtrennung der Zellreste und Proteine wurde die Mini-Präparation für 10 min. bei 15.000 rpm bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand mit der darin gelösten DNA wurde zur Verdauung der RNA mit RNase A (20 µg/ml Endkonzentration) für 30 min. bei Raumtemperatur versetzt.

Zur Abtrennung noch verbliebener Proteine und im besonderen zur Entfernung der RNAsen wurde der Überstand mit einem identischen Volumen Phenol:Chloroform(1:1)-Lösung versetzt, gemischt und für 5 min. bei 15.000 rpm zentrifugiert. Die obige wäßrige Phase wurde abgenommen und zweimal zur Phenolentfernung mit einem gleichen Volumenanteil Chloroform versetzt, zentrifugiert und wiedergewonnen. Anschließend wurde die DNA mit 0,7 Volumenanteilen Isopropanol 100% gefällt und durch Zentrifugation abgetrennt (30 min., 4°C 15.000 rpm). Auf eine Zugabe von Fällungssalzen wurde im allgemeinen verzichtet (1/10 VE Natriumacetat 3 M pH 4,8). Die DNA wurde anschließend mit Ethanol 70 % (-20°C) entsalzen, zentrifugiert (15.000 rpm, 4°C, 30 min.) und dann nach vorsichtiger Abnahme des Alkohols in der Speed-Vac (Savant-Speed Vac SC 100) für 1 bis 2 min getrocknet. Die DNA wurde dann in 10 bis 20 µl sterilem TE (1 mM EDTA, 10 mM Tris/HCl pH 8) bzw. Aqua bidest. resuspendiert.

Zur Gewinnung hochreiner Plasmid-DNA wurde ein DNA-Isolationskit der Fa. Qiagen, das Qiagen-Plasmid-Preparation-Mini-Kit bzw. Quick-Spin-Kit, verwendet. Die Isolation erfolgte nach Angaben des Herstellers.

2.2.3.2. Untersuchung von DNA in Agarosegelen

Zur Konzentrationsabschätzung von isolierter DNA oder zur Kontrolle der endonukleolytischen Verdauung wurde die DNA in einem horizontalen Agarosegel gelektrophoretisch aufgetrennt. Die Konzentration des Agarosegels richtete sich nach der Größe der DNA-Fragmente. Standardmäßig wurde eine 1%iges (w/v) Agarosegel (0,5 µg/ml Ethidiumbromid, 1xTAE) mit 40 mA und 60 V als Bedingung genutzt. Als Elektrophorese-Puffer wurde eine 1xTAE-Lösung (10 x TAE-Elektrophoresepuffer : 400 mM Tris, 10 mM EDTA, 1 M Natriumacetat, mit Essigsäure auf pH 8,4) verwendet. Alle Proben wurden mit 5xProbenpuffer (5xTAE, 50 % (v/v) Glycerin, 0,25 % (w/v) Bromphenolblau) vor der Elektrophorese versetzt. Die Detektion der Banden im Gel erfolgte mit einem Transilluminator (Bachhofer) bei 366 nm und wurde auf Polaroid Typ 667 fotografisch festgehalten.

2.2.3.3. Elution von DNA aus Agarosegelen

Die Reinigung und Elution von PCR- und Restriktionsprodukten erfolgte aus Agarosegelen mit dem Qiagen-Extraktion-Kit. Der Typ des Agarosegels und die genaue Durchführung richtete sich nach den Fragmenten und den Herstellerangaben.

2.2.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

2.2.4.1. Standard- und Mutagenese-PCR

Polymerase-Kettenreaktionen wurden nach Angaben der Hersteller im Gene Cyclyer, der Fa. Biorad durchgeführt. Es wurden die Polymerase von *Thermophilus aquaticus* (Taq) von der Fa. Promega, Fa. Eppendorf und Fa. Qiagen und die mit höherer Genauigkeit arbeitende Pfu-Polymerase der Fa. Stratagene verwendet. Als Template wurde Plasmid-DNA, isolierte genomische DNA oder frisch lysierte Zellen verwendet. Primer wurden in der Konzentration von 0,4 µM eingesetzt (siehe Kap. 2.2.4.4.).

Durch Verwendung von Restriktionsschnittstellen die zwischen den Kodon-Triplets schneiden und durch entsprechende Primerauswahl wurde eine Klonierung direkt im Leseraster der Aminosäurekomposition möglich (Pierce 1997).

Mutagenesen von einzelnen Nukleotiden wurden durch Einfügen einer Fehlpaarung in einen der Primer durchgeführt. Die anschließende Klonierung wurde durch interne oder neu erzeugte Schnittstellen ermöglicht. Die Position der Fehlpaarungen lagen im 5'-Bereich (Barik 1997).

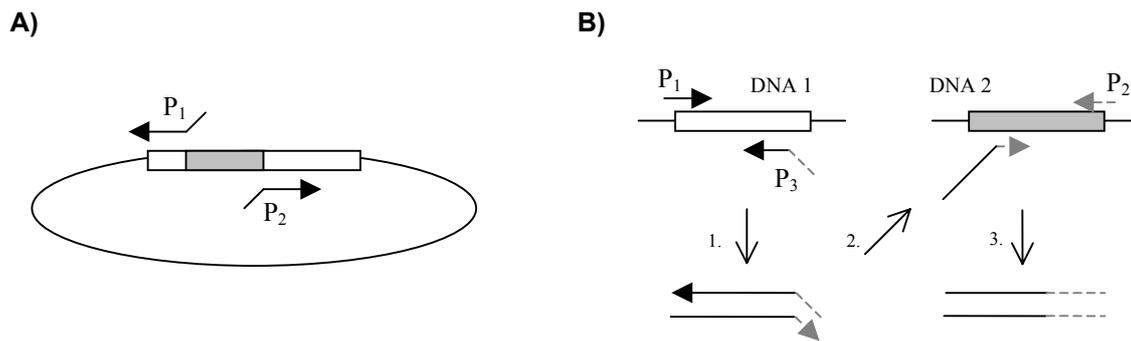


Abbildung 2 - 1 Schematische Darstellung verschiedener PCR-Verfahren

Skizzierung einer Kreis-PCR (A) und einer Fusions-PCR (B). Primer sind in 5'-3'-Orientierung als schwarze und graue blockartige Pfeile und zusätzlich mit einem P_x gekennzeichnet. Die Abwinkelung im Primer stellen nicht-bindende 5'-Regionen dar. Die Kästen stellen das Gen im Vektor dar.

Die PCR-Bedingungen richteten sich nach der verwendeten Polymerase, dem Template und den Primern. Es wurden in der Regel zwischen 29 und 31 Zyklen bestehend je Zyklus aus Denaturierung des Templates, Annealing der Primer und Elongation der Fragmente erlaubt. Als Denaturierungsbedingung wurde im ersten Zyklus zuerst 3 min. 93 °C, dann im weiteren 93°C 1 min. gewählt. Die Bedingungen für das Primer-Template-Annealing wurden experimentell durch Kontrolle der Fehlbindung und der Ausbeute bestimmt. In der Regel wurde die Anbindung zwischen 53 – 57 °C für 0,5 – 1,5 min. ermöglicht. Die Elongationszeit wurde auf die Länge des gesuchten Fragmentes mit 0,5 kb Überhang eingestellt (zwischen 0,5 – 5 min.). Die Temperatur richtete sich nach den Herstellerangaben für die Polymerase (68 – 72 °C). Im letzten Zyklus wurde die Elongation auf 10 min eingestellt.

2.2.4.2. Kreis-PCR

Die Kreis-PCR („Full-Circle“-PCR) erlaubt die Einführung von Restriktionschnittstellen oder die Deletion von Genbestandteilen bei gleichzeitiger Synthese des gesamten Vektors während der PCR-Reaktion (Abb. 2-1A). Die hierzu verwendeten Primern wiesen von dem zu deletierenden Genstück (im Bild grau) weg und besaßen am 5'-Ende Restriktionschnittstellen für einen nachfolgenden Ringschluß des Plasmids. Die PCR-Reaktion wurde mit dem Long-Expand-Kit (Taq/Pwo-Polymerase) von Roche durchgeführt. Die Elongationszeit (1 kb/min) wurde entsprechend dem Template gewählt.

2.2.4.3. Fusions-PCR und Megaprimer-PCR

Die Fusions-PCR (One-tube-fusion-PCR) und Megaprimer-PCR wurden an Protokolle von Barik (1997) und Pont-Kingdon (1997) angelehnt (Abb. 2-1B). Für die PCR wurde nur die Polymerase Pfu (Stratagene) verwendet .

Die Fusions-PCR beruht auf der Bildung von Megaprimern an verschiedenen Templates unter Verwendung von nur drei Primern. Zwei Primer bilden getrennt voneinander ein Endprimer auf den Templates. Der Fusionsprimer (ca. 36 NT) besteht dagegen zur einen Hälfte aus einem Primer für die erste DNA-Vorlage, während die anderen Hälfte aus dem komplementären Strang der Bindestelle am anderen Template gebildet wird. Dies erlaubt im Verlauf der Reaktionen die Bindung an beiden DNA-Vorlagen. Bei der PCR-Reaktion bildet sich zuerst an einer DNA-Vorlage ein Megaprimer (1.), dessen komplementärer Strang dann als Primer am zweiten Template fungieren kann (2.). Bei geeigneter Wahl der Primerbindestellen entsteht innerhalb einer Reaktion ein chimäres Fusionsgen (3.).

Primername	Primersequenz	Schnittstellen
Arf1-P1	5' <u>GGTCTAGAGAC</u> (T/C)GT(T/C/G)GAGTACAAGAA 3'	XbaI
atpC2GFP	5' TCGCCCTTGCTCACCATCTGTGTGGTGAAGGCAGA 3'	-
atpC3GFP	5' CTCGCCCTTGCTCACCATGA AAACCCACTCGCCC 3'	-
atpC4GFP	5' CTCGCCCTTGCTCACCATATG AGCAGAGCTCTGCTC 3'	-
atpC5GFP	5' CTCTCGCCCTTGCTC ACATCCATGACAATCGTTGC 3'	-
atpC-Nter	5' CTAGAATTCAAGATGAGATCCTTTTGCATC 3'	EcoRI
Bip-Nter	5' CTAGAATTCAAGATGATGTTTCATGAGAATTGC 3'	EcoRI
d80-89P1	5' <u>GTCCCCATGGCTCAGGACGCTGTC</u> 3'	NcoI
d80-89P2	5' GGCAGCGACAAGCTTCATGGC 3'	-
eGFP-Cter-H3	5' CACACT <u>AAGCTT</u> ACTTGTACAGCTCGTC 3'	HindIII
Fcp2GFP	5' CCATTTCTGTTCTCGAAAGCCGACTGCTGAGCCGG 3'	-
Fcp3GFP	5' GGCTACCGAAGTACGGGCGGGCAGAGAGGCGAG 3'	-
fcp-Nter	5' CTAGAATTCAAGATGAAATTTGCCG 3'	EcoRI
GFP-DDEL	5' <u>ACTAAGCTTACAACATCGTCCTTGTACAGCTCGTCCAT</u> 3'	HindIII
iatpC-Phaeo	5' GCAGAATTCAAGATGACCACACAGCCAACCTCC 3'	EcoRI
iFCP1	5' <u>GCATCGATCATGGCCCCGGCTCAGTCC</u> 3'	ClaI
iFCP2	5' <u>CATGATCGATGCAGAGCCGGCGAGGAG</u> 3'	ClaI
iPRK3	5' <u>GCCTCTAGAATGGCCCCACGGCCTTC</u> 3'	XbaI
iPRK4	5' <u>CATTCTAGAGGCCGAGGCGGCCAT</u> GAG 3'	XbaI
ppL-EcoRI	5' GAGAATTCAGCATGGACAGCAAAGGTT 3'	EcoRI
ppL-HindIII	5' GCGCA <u>AAGCTT</u> GAACCATCTCAGAAATGG 3'	HindIII
Prk1GFP	5' CTCGCCCTTGCTCACCATCTCTCCCTTCAGGGC 3'	-
Prk2GFP	5' GCGGGGGCGGCGGCGGGCGGAGGCCGAGGCGG 3'	-
Prk-Nter	5' CCAGAATTCACCATGAAGCTGTCCCTTGG 3'	EcoRI
QAD2829	5' ATGA <u>AGCTT</u> GTTCGATGACGCCAAGGTC 3'	HindIII
QAM29	5' ATGA <u>AGCTT</u> GTTCGCTATGGCCAAGGTC 3'	HindIII
Rab5-P5	5' CGGAATTCGC(A/G/T)CCACGGTAGTA 3'	EcoRI
Sar1p-P3	5' <u>GCTCTAGA</u> (T/C)AA(T/C)GC(T/C)GG(T/C/A)AAGAC(T/C)AC 3'	XbaI
SppL-HindIII-2	5' CACATTCATCCTATCCATTTCTGAGATG 3'	-
SppL-NcoI-2	5' <u>GCTCACCATGGAGACCACACCCTGGCACAAGAG</u> 3'	NcoI
SppLTspi-NcoI	5' CCCACCATGGCATGTTCTC TCTCC 3'	NcoI
ST1/2ssuGFP	5' CTCGCCCTTGCTCACCATGAGAGGAACTGCCTG 3'	-
STpcp-EcoRI	5' GAGAATTCAGCATGGTGGTGGAGCAAGG 3'	EcoRI
STpcp-NcoI	5' <u>GCTCACCATGGATGGCCGATCCTCATCAG</u> 3'	NcoI
STssu/Tssu-NcoI	5' TTGTCATGGGGTTCCACACCTTCATATC 3'	NcoI
STssu-Nter	5' CCAGAATTCAAGATGACATTGAC CGTCAA 3'	EcoRI
Tomo1	5' <u>GCACACAATGGTGGCGGGTTGCG</u> 3'	MstI
Tomo2	5' GCAGGAAAGGCCAATGCCATCCGT 3'	MstI
Tpc-NcoI-1	5' GCATTACCATGGCCACCCTCGCTTCTCC 3'	NcoI
Tpc-NcoI-2	5' <u>GCTCACCATGGCCACCTCAACGGCCATCGGTTTCC</u> 3'	NcoI
Tpt-P2	5' <u>CGGAATTCAT</u> (A/G)TC(A/G)GTCAT(A/G/C)GCCTTCTT 3'	EcoRI
TsMs1	5' TGCCATCACAATGGGGTTGTTGGGGAGGGTGG 3'	BstXI
TsMs2	5' AACCCCATTTGTATGGCAA CCTCCGTGAGCTACGA 3'	BstXI
Tspi-EcoRI	5' GAGAATTCACATGGCATGTTCTCTCTCC 3'	EcoRI
Tspi-NcoI	5' CCGTCCATGGCCTCACGGAGGTTTGC GC 3'	NcoI
Ypt1-P2	5' <u>GGTCTAGACA</u> (A/G)AT(T/C)TGGGA(T/C) AC(T/C)GC(T/C)GG(T/C/A)CAGGA 3'	XbaI

Abbildung 2 - 2 Verwendete Primer zur Konstrukterstellung

Tabellarische Darstellung der für die verschiedenen Konstrukte verwendeten PCR-Primer. Unterstrichene Sequenzbereiche markieren, die in der Tabelle aufgelisteten, Restriktionsschnittstellen. Fett geschriebene Buchstaben bezeichnen mit dem Primer eingeführte neue Startkodons für die Translation der Konstrukte. Nukleotide in Klammern bezeichnen Variationen der Nukleotidsequenz an der entsprechenden Position. Diese „Primer“ stellen somit Mischungen verschiedener Primern dar.

Beide Reaktionsstufen (Abb. 2-1B 1., 3.) lassen sich auch als Megaprimer-PCR-Verfahren getrennt durchführen, da dadurch die Effizienz der einzelnen Stufen erhöht werden konnte. Der Fusionsprimer bestand dann aus entfernten Bereichen des selben Genes.

2.2.4.4. Verwendete Primer

Die Primer besaßen eine Mindestlänge von 15 NT und einen GC-Gehalt von um 50 % auf (Abb. 2-2). Auf Purine direkt am 3'-Ende wurde verzichtet. Innerhalb der letzten Nukleotiden am 3'-Ende wurde auf verstärkt höheren GC-Gehalt und auf die Vermeidung von Fehlpaarungen geachtet.

Degenerierte Primer wurden als Mischungen bestellt und besaßen an den variablen Positionen verschiedene, vorher bestimmte Nukleotide. Es wurde auf weniger als 256 Möglichkeiten innerhalb der Primermischung geachtet. Die variablen Nukleotide an den kritischen Positionen wurden mittels der Codon-Usage-Tabelle von *Odontella sinensis* bestimmt. Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech bezogen. Primer über 33 NT wurden in der Regel in höchster Aufreinigungsqualität bestellt.

2.2.5. Koloniehybridisierung

Zur Durchsicht vieler Transformanden auf Integration der gewünschten Fragmente wurde neben PCR-Sichtungen *In-situ*-Koloniehybridisierungen durchgeführt. Die Koloniehybridisierung beruht auf dem Verfahren der Southernhybridisierung mit gekoppelter Gewinnung genomischer DNA aus an Nitrocellulose fixierten Bakterienzellen.

Zur Koloniehybridisierung wurde zuerst eine gerastete Bakterienkulturplatte mit Transformanden bestrichen, so daß nach 3 – 5 Std., 37°C, Inkubation eine eindeutige Zuordnung der Rasterung zu den Transformanden möglich war. Anschließend wurde ein passend zugeschnittene Nitrocellulose (Fa. Schleicher & Schuell, Typ Protan 0,1 µm) auf die Kulturplatte für 30 – 60 sec. gelegt (Blotten der Zellen auf die Zellulose), die Zellen in Denaturierungslösung I (10 % SDS) für 3 min. lysiert und die genomische Bakterien-DNA für 5 min. in Lösung II (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) denaturiert. Neutralisiert wurde die Zellulose für 5 min. in Neutralisierungslösung (0,5 M Tris/Cl pH 8, 1,5 M NaCl) und für 5 min. in 2xSSC (3 M NaCl, 0,3 M Natriumcitrat) gewaschen. Nachfolgend wurde die genomische DNA an die Nitro-Gruppen der getrockneten Nitrozellulose-Filter für 3 min. unter UV-Licht (254 nm bzw. 366 nm) photochemisch, kovalent verknüpft.

Vor der eigentlichen Hybridisierung wurde die mit DNA verknüpften Nitrocellulose für eine Stunde mit Hybridisierungsmedium (250 mM Na₂HPO₄, 1 mM EDTA, 7 % SDS) bei 57- 62°C im Hybridisierungssofen (Fa. Appligene) unter Rotation inkubiert. Währenddessen wurde mit dem Random-Priming-Kit der Fa. Roche eine mit ³²P-ATP radioaktiv-markierten Hybridisierungssonde vom gewünschten Genbereich gebildet. Hierzu wurden 25 ng für 10 min., 95°C, denaturierte DNA in einem 20 µl-Ansatz mit 3 µl 0,5 mM Nukleotidmischung (dTTP, dCTP, dGTP), 2 µl Hexanukleotide, 5 µl radioaktives ATP (1000 µCi/ml) und 1 µl Klenow-Enzym zur Sondenherstellung verwendet. Nach 30 min., 37°C, Inkubation wurden der Sondenansatz kurz vor der Verwendung für 10 min. bei 100°C denaturiert, in 20 ml temperierten Hybridisierungsmedium aufgenommen und die Hybridisierung über Nacht unter Rotation mit der radioaktiven Hybridisierungslösung ermöglicht. Nachfolgend wurden die Filter zuerst in temperiertem Waschmedium I (2xSSC, 0,1 % SDS) und dann in Waschpuffer II (0,2xSSC, 0,1 % SDS) für mindestens 15 min. zur Entfernung unspezifischer Bindungen gewaschen. Die Autoradiographie der Filter wurde nach Trocknung über Nacht mit Röntgenfilm ermöglicht. Die Zuordnung der Transformanden erfolgte über den Vergleich der Bandenform in der Autoradiographie mit der Art der Rasterung auf der Bakterienkulturplatte.

2.2.6. Gensequenzierung

Zur Kontrolle von DNA-Fragmente wurden die Konstrukte mit dem Pharmacia "T7-sequencing-kit" unter Verwendung von radioaktivem ³²P-ATP nach dem Kettenabbruchverfahren von Sanger sequenziert.

Die Auftrennung der Ansätze erfolgte mit einem 4 %igen Harnstoff (8,3 M)/Polyacrylamidgel mit dem Rotiphorese DNA-Sequenziersystem der Firma Roth. Zur Stabilisierung wurde das Gel mit Hilfe von Bind-Silan (0,3 % γ - (Methacryloxypropyl)-trimethoxysilan, 0,3 % Essigsäure in Ethanol) auf einer Glasplatte (Gelträger) bei der Polymerisierung mit entgaster Polyacrylamid-Lösung fixiert. Die Gegenplatte wurde entsprechend der Trägerplatte mit Repel-Silan (3 % Dimethyldichlorsilan in Chloroform) behandelt. Die Platten wurden 2 mal gleichmäßig mit 10 minütiger Pause behandelt.

Vor dem eigentlichen Gellauf wurden 3 μ l Vorlaufpuffer (40 % Formamid, 10 mM NaOH, 1 mM EDTA, 1 Spatelspitze Bromphenolblau) aufgetragen und für ca. 60 min laufen gelassen. Der Probenlauf mit 2 - 3 μ l Reaktionsansatz erfolgt bei 60 Watt für 90 min mit 1xTBE (10xTBE: 890 mM Tris, 890 mM Borsäure, 20 mM EDTA, pH 8) als Laufpuffer. Die Proben wurden vorher für 1 min bei 85 °C denaturiert.

Nach dem Gellauf wurde das Gel samt Trägerplatte in 10 % Essigsäure fixiert, kurz in Wasser geschwenkt und bei 80 °C im Trockenschrank getrocknet. Die Bandendetektion erfolgte über Autoradiographie über Nacht.

2.3. Fraktionierung von pflanzlichen Zellen

2.3.1. Isolation von Chloroplasten

2.3.1.1. Plastidenisolation aus *Odontella sinensis* und *Coscinodiscus granii*

Die Isolation der Plastiden aus den Kieselalgen *Odontella sinensis* und *Coscinodiscus granii* basiert auf den Arbeiten von Claus Wittpoth (Wittpoth et al. 1998) und ist geeignet für größere einzellige Kieselalgen. Die Schnell-Präparation führt über eine 40 %-Percollstufe zu einer Intaktheitsrate von 70 bis 90 %. Eine höhere Güte ließ sich mit einem linearen Gradient (20 - 80 %) gewinnen.

Zur Isolation wurden die Kieselalgenkulturen (i.d.R. 10 L) mit einer 50 μ m - Nylongaze abfiltriert und sofort in 15 ml Isolationsmedium I (623 mM Sorbit, 6 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 10 mM KCl, 50 mM HEPES, 1 % BSA, pH 7,6 (~0,7 Osmol/kg)) resuspendiert. Der Aufbruch der Kieselschalen erfolgte bei 1,5 bar (*Coscinodiscus granii*) bzw. 2 bar (*Odontella sinensis*) in einer vorgekühlte Yeda-Press. Dieser Schritt ist für die ganze Ausbeute an intakten Plastiden kritisch und die Tropfgeschwindigkeit wurde, um die Scherung gering zu halten, niedrig eingestellt. Die aufgebrochenen Zelle wurden zweimal vorsichtig mit einer Glaspipette zum Ausspülen der Plastiden aus den Schalenresten durchmischt und dann unter einem Lichtmikroskop auf die Güte des Aufbruchs (~80%) getestet. Zur Entfernung der Kieselschalen bzw. ganzen Zellen wurde die Zellsuspension noch einmal über die Nylongaze filtriert und das Filtrat anschließend mit 15 ml 40 %iger Percoll-IsoII-Lösung (Isolationsmedium II mit 40 % Percoll) mit Hilfe einer Spritze unterschichtet. Die intakten Plastiden wurden durch eine Zentrifugation des Stufengradienten bei 4000 - 5000 rpm für ungefähr 2 min. in einer Heraeus Christ Minifuge 2 Typ 4123 (Rotor Typ 1664) ohne Abbremsen von den Thylakoiden (Überstand) abgetrennt, anschließend mit mindestens 20 ml Isolationsmedium II (663 mM Sorbit, 6 mM EDTA, 5 mM MgCl₂, 1 mM MnCl₂, 10 mM KCl, 50 mM HEPES, pH 7,6 (~ 0,75 Osmol/kg)) gewaschen und mit 3500 rpm für 2 min. pelletiert. Die intakten Plastiden wurden abschließend in der gewünschten Konzentration (> 2mg Chl./ml) mit Isolationsmedium II resuspendiert.

2.3.1.2. Chloroplasten aus höheren Pflanzen

Die Isolation von intakten Plastiden aus Spinat beruht auf der Methode von Heldt und Sauer (1971) und auf der Methode von Bartlett et al. (1982). Für die Plastidenisolation aus Erbse wurde das Laborprotokoll von P. Hynds (University of Warwick, Großbritannien) basierend auf der Methode von Hulford et al. (1994) verwendet.

- Zur Isolation der Plastiden wurden die Spinatblätter frisch geerntet, bei Bedarf von ihrer Mittelrippe befreit und gewaschen. 20 - 40 g der Blätter wurden mit 200 bis 300 ml kaltem Isolationsmedium A (330 mM Sorbit, 10 mM Natriumpyrophosphat, 4 mM Ascorbat (frisch), pH 6,5 mit HCl (~0,35 Osmol/kg)) in einem vorgekühltem Mixer in kurzen Stößen homogenisiert. Das Homogenisat wurde anschließend schnell zur Abtrennung der Zelltrümmer über einer Lage Nylongaze (50 µm) abfiltriert und die Plastidensuspension kurz zentrifugiert (2500 g, 1 min, 4°C). Nach Resuspendierung des Plastidenpellets in 10 ml kaltem Medium B (330 mM Sorbit, 50 mM HEPES/KOH pH 7,8 (~0,37 Osmol/kg)) wurden zwei vorbereitete, lineare Gradienten, 10 bis 80 % Percoll (10 bzw. 80 % PBF-Percoll, 0,131 ml EDTA 0,2 M, 13,1 µl MgCl₂ 1 M, 13,1 µl MnCl₂ 1 M, 0,66 ml HEPES 1 M pH 7,5, 0,79 g Sorbit, 12,87 mg Ascorbat, 2,25 mg Gluthation, ad. 13,13 ml Aqua dest.), überschichtet. Die intakten und die lysierten Plastiden wurden durch eine Zentrifugation in einer Beckmann Ultrazentrifuge in einem SW28 Schwingrotor bei 6000 rpm bei 4 °C für 30 min getrennt. Die intakten Plastiden bilden im Gradient eine Bande bei 70 bis 80 %. Anstelle des linearen Gradienten wurde auch eine 40 % Percoll-Stufe (Gradientmedium mit 40 % Percoll) verwendet.

Nach der vorsichtigen Abnahme der Plastidenbande aus dem Gradienten wurde die Suspension zur Entfernung des Percolls einmal mit Medium B gewaschen. Die Plastiden abzentrifugiert (2500g, 2 min, 4°C) und abschließend im gewünschten Volumen Medium B resuspendiert.

- Die Isolation von Chloroplasten aus Erbsen erfolgte analog zu der Isolation von Spinat-Plastiden. Als Isolationsmedium A bzw. B wurde eiskaltes 1xSRM-Medium (5xSRM : 1,65 M Sorbit, 25 mM MgCl₂, 250 mM HEPES pH 8) verwendet. Die Trennung von aufgebrochenen und intakten Plastiden erfolgte über eine 40 % Percoll-Stufe (1xSRM-Medium, 40 % Percoll).

2.3.1.3. Chlorophyllbestimmung

Die Chlorophyllbestimmung erfolgte im Spektralphotometer LKB-Ultrospec Plus der Fa. Pharmacia. Zur Bestimmung der Chlorophyllmenge von Kieselalgen-Plastiden wurden 5 µl Plastidenisolat in 995 µl 90 %iges Aceton gelöst, für 2 min inkubiert und dann zur Abtrennung unlöslicher Bestandteile 2 min bei 15000 rpm in einer Sigma-Tischzentrifuge zentrifugiert.

Die Messung erfolgte bei 664 nm und 630 nm gegen eine Referenz mit 90 % Aceton.

Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel (Jeffrey und Humphrey 1975):

$$x \text{ µg } \textit{Odontella}\text{-Chl.}/10 \text{ µl Isolat} = (11,47 E_{664} - 0,4 E_{630}) + (24,36 E_{630} - 3,73 E_{664})$$

Die Bestimmung der Spinat-Chlorophyllmenge erfolgte nach Arnon (1949). Hierzu wurden entsprechend zur Chlorophyllbestimmung 10 µl Plastidenisolat in 990 µl 80 %igem Aceton gelöst und dann bei 645 nm und 663 nm gemessen. Die Menge wurde wie folgt berechnet (E_x = Extinktion bei Wellenlänge x (nm) in OD):

$$x \text{ µg Spinat-Chl.}/10 \text{ µl Isolat} = 20,2 E_{645} + 8,02 E_{630}$$

2.3.1.4. Sauerstoffbestimmung mittels Clark-Elektrode

Die Intaktheitsbestimmung von Plastiden bzw. die Messung der CO₂-Fixierung von Plastiden erfolgte über die Clark-Sauerstoffelektrode (Fa. Hansatech).

Die Intaktheitsbestimmung wurde durch den Vergleich der Sauerstoffbildung in einer Probe mit belichteten osmotisch geschockten Plastiden und einer Probe mit z.B. unbehandelten Plastiden bestimmt. Die Sauerstoffmessung beruht auf einer Hill-Reaktion mit Ferricyanid (K₄[FeIII(CN)₆]). Dieses ersetzt das beim Aufbruch der Plastiden frei werdende Ferridoxin als Elektronenakzeptor. Da Ferricyanid nicht die Plastidenmembran durchdringen kann, korrelieren die gemessenen Sauerstoff-Entwicklungsraten mit dem Anteil an Thylakoiden in der Meßküvette. Zur Messung wurden Ferricyanid (1,5 mM), Ammoniumchlorid (1,5 mM), 1000 U Katalase, 1 U Superoxid-dismutase (SOD) sowie Plastidensuspension (10 bis 20 µg Chl.) zusammenpipettiert und auf 1 ml mit z.B. Isolationsmedium aufgefüllt. Für die Bestimmung der osmotischen Stabilität der Plastiden wurden die Plastiden nach 1 1/2 minütiger Inkubation in Mischungen zwischen Isolationsmedium und einem HEPES/MgCl₂-Puffer (50 mM Hepes, 5 mM MgCl₂) gemessen. Um einen maximalen Aufbruch zu erhalten, wurden die Plastiden zuerst in Wasser 1 min. inkubiert und anschließend auf 50%iges Isolationsmedium eingestellt. Die Katalase- und SOD-Zugabe dient zur Beseitigung des Mehler-effektes von intakten Plastiden, die durch H₂O₂-Bildung Sauerstoff verbrauchen. Nach Bestimmung des Sauerstoffgrundwertes wurde mit Belichtung (Rotlicht, 500 µmol Quanten/m² sec) die Proben gemessen. Zur Eichung der Elektrodenqualität wurde vor Beginn der Experimente der Ausschlag und der Verlauf des Sauerstoffverbrauchs durch Zugabe von einer Spatelspitze Dithiothreitol bestimmt. Die absoluten Sauerstoffwerte für die Meßtemperatur konnten durch Vergleich mit tabellarischen Literaturwerten erhalten werden. Die Intaktheitsrate in Prozent wurde wie folgt bestimmt : Intaktheit (%) = [1 - (O₂-Rate intakte Plastiden / O₂-Rate lysierte Plastiden)] * 100.

Die Messung der CO₂-Fixierung erfolgte mit isolierten Plastiden (ca. 25 –50 µg Chl.) unter Zugabe von Katalase (1000 U) und SOD (1 U) in entgastem Medium bei Belichtung. Nach Messung der Grundrate wurde die Reaktion durch Zugabe von Na₂CO₃-Lösung (5 mM) gestartet. Da die CO₂-Fixierung von verschiedenen biochemischen Prozessen in der Plastide abhängt, stellt sie ein sicheres Maß für die Intaktheit von Chloroplasten dar.

2.3.1.5. Bestimmung der Osmolalität einer Lösung

Die Bestimmung der Osmolalität (Osmol/kg) erfolgte mit dem Osmomat 030, Cryoscopic Osmometer der Firma Gonotec. Die Eichung des Gerätes erfolgt über eine 1 M Sorbit-Lösung (1 Osmolal, genähert 1 Osmolar) und Aqua bidest. (0 Osmolal) entsprechend den Angaben des Herstellers. Zur Messung wurden in mitgelieferten Meßgefäßen 50 µl Probe eingefüllt und der Gefrierpunkt und damit die Osmolalität bestimmt.

2.3.2. Isolation von Thylakoiden

2.3.2.1. Thylakoidisolation aus Plastiden von Kieselalgen

Thylakoide von der Kieselalge *Odontella sinensis* und *Coscinodiscus granii* wurden ausgehend von intakten Plastiden durch osmotische Zerstörung der Chloroplastenmembranen erhalten. Zuerst wurden die Plastiden auf eine Konzentration von 1 mg Chl./ml mit Isolationsmedium verdünnt, das Gesamtvolumen bestimmt und die Plastiden mit 3000g, 1 min, Eppendorf-Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt, die Plastiden auf das Gesamtvolumen mit Schockmedium HM (50 mM HEPES pH 8, 5 mM MgCl₂) aufgefüllt, mit einer Eppendorf-Pipette resuspendiert (zusätzliche Scherung) und für 2 min. inkubiert. Durch Zugabe von 1 VE H2SM (50 mM

HEPES pH 8, 680 mM Sorbit, 5 mM MgCl₂) wurde die Osmolalität auf die Hälfte des natürlichen Wertes eingestellt (~350 mOsmolal). Thylakoide und Stroma (1:1 verd.) wurden durch eine Zentrifugation mit 15.000g, 1 min, Eppendorf-Tischzentrifuge getrennt. Anschließend wurden die Thylakoide dreimal mit HSM (50 mM HEPES pH 8, 340 mM Sorbit, 5 mM MgCl₂) zur Entfernung restlicher stromalen Bestandteile gewaschen und dann in dem gewünschten Medium, Stroma oder HSM, mit der Konzentration 1 mg Chl./ml aufgenommen.

Zur Gewinnung EDTA-gewaschener Thylakoide wurden die Plastiden direkt in HME (50 mM HEPES pH 8, 5 mM MgCl₂, EDTA 10 mM) geschockt, einmal in HSME (HSM mit 10 mM EDTA) und anschließend zur Resuspendierung der verklumpten Thylakoide und zur Entfernung restlichen EDTAs zweimal im HSM gewaschen.

Gedaute Thylakoide wurden durch Inkubation von Thylakoiden mit der Protease Thermolysin (0,2 mg/ml) oder Trypsin (0,1 mg/ml) erhalten. Hierzu wurden frisch gewonnene Thylakoide, noch vor der dreimaligen Waschung, in HSMC (50 mM HEPES pH 8, 340 mM Sorbit, 5 mM MgCl₂, 2 mM CaCl₂) aufgenommen, mit der Protease für 15 bzw. 30 min. auf Eis inkubiert und der proteolytische Verdau mit 2,5 mM EGTA bzw. 0,1 mM Trypsininhibitor gestoppt. Die Protease wurde durch einmaliges Waschen mit HSME₂ (HSME und zusätzlich 2,5 mM EGTA, 0,1 mM Trypsininhibitor) und zweimaliges Waschen in HSM entfernt.

2.3.2.2. Thylakoidisolation aus Erbsenplastiden

Die Thylakoidisolation aus Erbsen beruht auf der Labormethode von P. Hynds (Labor C. Robinson, University of Warwick, Großbritannien) und stellte die Basis der Methodik für Kieselalgen dar.

Die Thylakoide aus höheren Pflanzen wurden aus isolierten Erbsen-Plastiden gewonnen. Der osmotische Schock der Plastiden erfolgt wie auch bei den Algen in HM-Medium (50 mM HEPES pH 8, 5 mM MgCl₂). Ein Anpassen der Osmolalität nach dem Schock erfolgt jedoch nicht; die Waschungen erfolgten mit HM-Puffer. Die weiteren Medien HME, HMC und HME₂ entsprechen den Kieselalgenmedien HSME, HSMC und HSME₂ nur ohne Sorbit-Zusatz.

2.3.2.3. Fluoreszenzmessung mit 9-Aminoacridin (9AA)

Die quantitative Bestimmung des Protonengradienten erfolgte in einer selbstgebauten Meßapparatur (Inst. für Biochemie der Pflanzen). Die Apparatur bestand aus einer temperierbaren, abgedunkelter Clark-Elektrode (Fa. Hansatech), einer Kaltlichtlampe (Schott KL 1500) mit gekoppelten Rotfiltern ($\lambda > 630$), einer selbstkonstruierten Lampe zur Anregung des 9-Aminoacridins ($\lambda = 400$) mit einem Interferenzfilter (10 nm Bandbreite, Fa. Schott) und einer Photodioden/Verstärker-Kombination, die über vorgeschaltete Filter ($\lambda = 490$) nur die Fluoreszenz des 9AA detektieren konnte. Die selbstgebaute Fluoreszenzanregungslampe wurde mit einem Spannunggerät der Fa. Oltronix betrieben.

Für die Messung erfolgte bei 20°C mit Thylakoide entsprechend 62,5 µg Chl. in 2,5 ml Medium. Das Medium enthielt 25 mM Tricin pH 8, 50 mM KCl, 5 mM MgCl₂, 50 nM Valinomycin, 50 µM PMS und 5 µM 9-Aminoacridin und entsprechend des Versuches eine variable Menge an Sorbit.

Nachdem die Grundfluoreszenz der Probe ausgelöst durch das Meßlicht aufgenommen wurde (0%), wurde die Maximalfluoreszenz des Ansatzes durch die Zugabe von 9AA bestimmt (100%). Über Belichtung der Probe mit der Rotlichtlampe wurde die Bildung eines Protonengradienten über die Thylakoidmembran ermöglicht. Die Messung wurde über einen Mehrkanalschreiber aufgenommen, der Lampenspannung und Fluoreszenz registrierte.

2.3.3. Fraktionierung von *Phaeodactylum tricornutum*

Zur Fraktionierung von Zellen der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* wurden 1 Liter Kultur bei 3000 g, 4°C, für 10 min. abzentrifugiert und in 20 ml Isolationsmedium I (siehe Chloroplastenisolation) resuspendiert. Zum Aufbruch der Zellen wurde eine French-Press (Fa. SLM Instruments Inc., Aminco), eine vorgekühlte 20K-Zelle (1“ Piston) und ein Druck von ungefähr 2000 - 3000 PSI (Geräteeinstellung Med, 700 - 1100 PSI-gauge) ausgewählt. Der Fluß aus der Zelle wurde unter Vermeidung von Druckschwankungen auf ungefähr 1 - 2 Tropfen pro Sekunde eingestellt. Im weiteren wurde auf Eis bzw. 4°C gearbeitet. Das Zelllysat wurde zuerst für 10 min. zur Abtrennung ganzer Zellen bei 200 g zentrifugiert; Zellwände und Thylakoide wurden dann mittels einer 20.000 g Zentrifugation (4°C), 30 min. von den cytosolischen Komponenten getrennt. Das in der Membranfraktion enthaltene Endoplasmatisches Reticulum konnte durch eine abschließende Zentrifugation mit 100.000 g, 3 Std. gewonnen werden. Resuspendiert wurde das Membranpellet in wenig 10 mM Tricin pH 8. Eine weitere Aufreinigung der Membranfraktion erfolgte bei Bedarf über einen linearen Zuckergradient (20 – 50 % Saccharose, 10 mM Tris pH 8) von dem ein 60 %-Kissen vorgelegt und der mit einem 10 %-Kissen überschichtet worden ist.

Der Aufbruch von *Phaeodactylum tricornutum* erlaubte keine Isolation von intakten Plastiden, da die Zellen, die in der Regel ein bis zwei Plastiden besitzen, welche einen großen Teil des Zellinnenvolumens ausmachten, ausgesprochen klein waren. Ein Aufbruch der dünnen Kieselschale führte zu einem direkten Scheren der Plastiden.

2.4. Proteintransport

2.4.1. In-vitro-Proteinsynthese

2.4.1.1. In-vitro-Transkription

Zur Run-off *in vitro*-Transkription von RNA wurde das Roche Sp6/T7 Transkriptionskit bezogen. Zusätzlich wurde statt der Sp6-RNA-Polymerase die T3-Polymerase verwendet. Die Durchführung richtete sich nach den Angaben des Herstellers. Zur RNA-Synthese wurden je 20 µl-Ansatz 2 µg linearisierte Plasmid-DNA verwendet. Zum Schutz vor RNAsen wurde jedem Ansatz 1 µl RNasin (Roche) oder RNAGuard (Pharmacia) als RNase-Inhibitor zugesetzt.

Die Transkription erfolgte ohne den Zusatz von 7-methyl-Guanosin zum "Cappen" eukaryotischer mRNA. Nach der Transkription für eine Stunde bei 37 °C, wurden 2 µl DNase I (RNase-Aktivität frei) zugegeben, um für 15 min bei 37 °C die Plasmid-DNA zu verdauen.

Alle Materialien bis auf die Chemikalien wurden mit DEPC = Diethylpyrocarbonat behandelt, welches RNAsen inhibiert. Die Behandlung erfolgte durch Zugabe von 0,1 % (v/v) DEPC für mindestens 1 Stunde und anschließender thermischer Zerstörung durch Autoklavierung.

2.4.1.2. Untersuchung von RNA in Formaldehyd-Agarosegelen

Synthetisierte RNA wurde zur Kontrolle in einem horizontalen Formaldehyd-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und die Konzentration abgeschätzt. Als Agarosekonzentration wurde 1 % gewählt. Die Agarose wurde für eine Stunde zusammen mit 0,1 % (v/v) DEP inkubiert. Anschließend wurde die Lösung zur Resuspendierung der Agarose gekocht und nach einer Abkühlung auf 50 °C mit Formaldehyd (Endkonz. 6%) und MOPS 1x (5xMOPS : 0,1 MOPS, 40 mM NaCl, 5 mM EDTA in Aqua bidest. DEPC-behandelt, auf pH 7) versetzt.

Zum Schutz vor RNAsen in der Gelkammer und am Probenkamm wurden alle Teile mehrmals mit 3 % H₂O₂-Lsg. und Methanol gewaschen.

Die RNA-Proben wurden vor dem Lauf in 1xProbenpuffer (5xProbenpuffer : 720 µl Formamid, 260 µl Formaldehyd, 320 µl 5xMOPS, 80 µl Glycerin, 80 µl Bromphenolblau gesättigt, 40 µl Aqua bidest DEPC-behandelt) aufgenommen, bei 65 °C für 3 min denaturiert und direkt schockgekühlt. Als Laufpuffer wurde 1xTAE, versetzt mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid, verwendet und das Gel bei 30 bis 40 mA laufen gelassen.

2.4.1.3. *In-vitro*-Translation

In-vitro-Proteinsynthesen wurden mit Retikulozytenlysat der Firma Roche (Typ I) oder im Weizenkeim- oder Retikulozytenlysat-Coupled-*In-vitro*-Transkription-Translation-System (Coupled-TNT) von Promega durchgeführt. Die Proteinsynthese erfolgte entsprechend den Herstellerangaben. Das eingesetzte radioaktive L-³⁵S-Methionin (Typ SJ 1015) von der Firma Amersham hatte eine Aktivität von 1 bis 1,2 mCi/ml (1000 - 1200 Ci/mmol).

Im Translationssystem der Firma Roche wurde für alle Ansätze 50 mM Kaliumacetat und 1 mM Magnesiumacetat verwendet. Als RNA wurde im allgemeinen 1 µl Transkriptionsansatz verwendet. Die Inkubation zur Proteinsynthese erfolgte für 60 min bei 30 °C.

Im „Coupled-TNT“-System war keine vorherige RNA-Synthese nötig, da diese parallel zur Translation stattfand.

2.4.2. Kotranslationaler Proteinimport

2.4.2.1. Transport in ER-Vesikel

Zur Untersuchung des kotranslationalen Proteintransports wurden die zu untersuchenden Proteine in Translationsansätzen mit zugegebenen Hundepankreas-Mikrosomen der Firma Promega translatiert. Es wurden 1,8 µl Mikrosomenlösung pro 25 µl Standardtranslationsansatz verwendet.

Nach der Inkubation wurde der halbe Ansatz zur proteolytischen Spaltung externer Proteine mit Proteasen behandelt. Für den Mikrosomenimport wurden die Proteasen Thermolysin (0,1 mg/ml, 2 mM Ca₂Cl) und Proteinase K (0,1 mg/ml) verwendet. Der proteolytische Verdau wurde für 30 min auf Eis durchgeführt und mit PMSF (1 mM) für Trypsin bzw. EGTA (2,5 mM) für Thermolysin, Zugabe von SDS-Probenpuffer (1 : 1) und sofortiges Denaturieren der Probe bei 80 bis 95 °C, 3 min gestoppt.

2.4.2.2. Deglykosylierung von Glykoproteinen

Zur Deglykosylierung von importierten Proteine in ER-Mikrosomen wurde der kotranslationale Importansatz nach seiner Inkubationszeit gedrittelt. Der erste Teil diente als Kontrolle, der Zweite wurde mit Protease behandelt (siehe Kap. 2.4.2.1.) und der Dritte mit der Amidase PNGase F entsprechend den Herstellerangaben behandelt. Zuerst wurde die Probe für 100°C, 10 min. denaturiert, 1/10 Vol. G7-Puffer und NP-40 (10%)-Lösung zugesetzt und mit 0,5 µl PNGase F (250 U) für 1 Std., 37°C, inkubiert.

2.4.3. Integration von FCP in ER-Vesikel

3 µl iFCP-Translationsansatz wurden mit 4 µl Hundepankreas-ER-Vesikel und 10 µl 1xSRM-Medium für 30 min., 18°C, inkubiert. Anschließend wurden die Vesikel mit 100 µl KSCN (2M) analog den Thylakoidintegrationsexperimenten (Kap. 2.4.5.1.) gewaschen und nach Auffüllen auf 3,5 ml mit KSCN (2M) für 10 min. gelagert. Nach einer Zentrifugation für 45 min., 116000 g (SW55Ti-Rotor, Fa. Beckmann, 35.000 rpm), wurde der Überstand restlos entfernt, die Mikrosomen mit HM-Puffer vorsichtig, kurz überspült und anschließend in einem gewünschten Volumen rückgelöst.

2.4.4. Posttranslatonaler Import in Plastiden von höheren Pflanzen

Ein 400 µl-Importansatz bestand standardmäßig aus 100 µl intakten Plastiden (50 – 100 µg Chl. in Isolationsmedium), ATP (2 mM), 133 µl Importpuffer (3xPuffer : 750 mM Sorbit, 150 mM HEPES/KOH pH 7,5, 30 mM L-Methionin, 75 mM Kaliumgluconat, 6 mM MgCl₂, 0,6 % BSA) und 5 - 10 µl Proteinansatz. Der posttranslationale Import wurde für 20 - 30 min bei 25 °C und unter Beleuchtung (150 µmol Quanten/m² sec, Lampe: Philips E/86 160 W) ermöglicht. Modifikationen des Energiebedarfs des Import sind im weiteren angegeben. Gestoppt wurde der Import durch die Weiterverarbeitung in einem Proteaseansatz oder erneuten Zentrifugation des Importansatzes durch 40 % Percoll-Medium (Plastiden-Isolationsmedium mit 40 % Percoll) für 30 sec., 3000g, Eppendorf-Tischzentrifuge. Je nach Zielsetzung wurden die pelletierten, intakten Plastiden anschließend in 1xProteinprobenpuffer für die Elektrophorese aufgenommen oder fraktioniert.

Für den Proteaseansatz wurden die Proteasen Thermolysin (0,2 mg/ml, 2 mM CaCl₂), Proteinase K (0,1 mg/ml) oder Trypsin (0,1 mg/ml) verwendet. Der proteolytische Verdau wurde normalerweise für 30 min. auf Eis durchgeführt, mit PMSF (1 mM) für Proteinase K, EGTA (2,5 mM) für Thermolysin bzw. mit Trypsininhibitor (0,1 mg/ml) gestoppt. Nach anschließender Aufreinigung der Plastiden durch Zentrifugation durch einen 40 % Percollkissen wurden die gedauten Chloroplasten fraktioniert oder Proben in 1xProteinprobenpuffer (5xProteinprobenpuffer: 10 % SDS, 25 % Glycerin, 0,025 % Bromphenolblau, 25 % Mercaptoethanol, 250 mM Tris /HCl pH 8) aufgenommen.

Zur Fraktionierung wurden die Plastiden abzentrifugiert (6000 rpm, 15 sec., Tischzentrifuge), osmotisch mit Medium C (10 mM Tricine pH 7,6, 0,1 mM PMSF oder 0,1 mg/ml Pefabloc) geschockt und dann für 30 sec. bei 3000g, Eppendorf-Tischzentrifuge, zur Abtrennung der Thylakoide (Pellet) von der Stroma-/Hüllmembranfraktion (Überstand) zentrifugiert. Die Thylakoide wurden mit 200 µl Medium C gewaschen, erneut zentrifugiert und in 1xProteinprobenpuffer aufgenommen. Die Stromafraktion wurde mit 0,25 Volumen VE 3 N TCA-Lösung versetzt, vorsichtig geschüttelt und für 30 min zur Proteinfällung ruhen gelassen. Die gefällten Protein wurden nach einer Zentrifugation (10 min, 15.000 g, 4°C) mit Waschpuffer (0,1 M Dithiothreitol, 0,1 M Na₂CO₃) rückgelöst und in 1xProteinprobenpuffer (5xProteinprobenpuffer : 10 % SDS, 25 % Glycerin, 0,025 % Bromphenolblau, 25 % Mercaptoethanol, 250 mM Tris /HCl pH 8) aufgenommen.

2.4.5. Thylakoidimport

2.4.5.1. Import in Thylakoide von Kieselalgen

Für den Import von Proteinen wurden 45 µl Thylakoide (0,5 – 1 µg Chl./µl) und 10 µl 1:1 verdünnter Translationsansatz in einem 60 µl-Ansatz verwendet. Die Aufnahme der Thylakoide nach der Isolation richtete sich nach Art des Experimentes. Stromaler Extrakt (1:1 verdünnt mit H2SM (50 mM HEPES pH 8, 680 mM Sorbit, 10 mM MgCl₂)) wurde für Experimente wie dem Sec-, SRP-Weg verwendet, HSM (50 mM HEPES pH 8, 340 mM Sorbit, 10 mM MgCl₂) für Untersuchungen des ΔpH-Weges. Die Verdünnung des Translationsansatzes reduzierte die Schwankungen der Radioaktivität im Gesamtansatz und wurde generell mit H2SM durchgeführt. Die Verwendung von Nukleotiden, Belichtung und Inhibitoren richtete sich nach der Untersuchung und sind im Ergebnisteil beschrieben. Standardmäßig wurden die Zusätze in folgenden Konzentrationen verwendet: Azid (5 mM), Nigericin (4 µM) und Valinomycin (0,1 mM) beide supplementiert mit 50 mM KCl zum Ionenaustausch sowie ATP, GTP bzw. NTP-Mix mit 8 mM Endkonzentration. Die Verwendung von Apyrase schließt eine

Inkubation des Translationsansatzes und, getrennt davon, die Inkubation der Thylakoide mit je 0,25 U Apyrase, 15 min., Eis mit ein. Gestartet wurde der Import durch Thylakoidzugabe.

Nach einer Inkubation des Ansatzes bei 16-18°C, i.d.R. Belichtung (150 µm Photonen/m²sec) für 25-30 min. wurde der Ansatz gedrittelt:

Ein Ansatz wurde als Gesamtansatz (Probenkennung: G) mit 5xProteinprobenpuffer versetzt.

Ein weiteres Drittel wurde zur Entfernung unspezifischer Bindungen einmal gewaschen (Probenkennung: W). Als Waschmedien wurde HSM, KSCN (2M), NaCl (2M), Urea (6,8 M) oder Na₂CO₃/DTT (85 mM) verwendet. Der Importansatz wurde mit 5 Volumeneinheiten Waschmedium kurz gevortext, für 10 min. bei Raumtemperatur inkubiert und einem Gefrier-/Auftauzyklus unterworfen. Der Vortex- und Gefrier-/Auftauschritt wurden wiederholt, anschließend die Probe zentrifugiert (10 min., 22.000g, 4°C) und mit wenig HSM und Proteinprobenpuffer (1x) resuspendiert. Bei Verwendung des Waschmediums KSCN (2M) wurden die Thylakoide nach der Zentrifugation zur Entfernung von Kalium-Ionen in HSM kurz resuspendiert und erneut für 1 min. zentrifugiert bevor sie in Probenpuffer aufgenommen wurden.

Das letzte Drittel wurde in einem Proteaseansatz mit Thermolysin (0,2 mg/ml, 2 mM CaCl₂) bzw. in einer Proteasemischung (Thermolysin 200 µg/ml, Trypsin 10 µg/ml, 2 mM CaCl₂) für 30 min. auf Eis inkubiert (Probenkennung: D). Anschließend wurde der Ansatz mit 5 VE HSME₂ (HSM mit 10 mM EDTA und zusätzlich 2,5 mM EGTA) mit oder ohne Trypsininhibitor (0,1mg/ml) gewaschen, zentrifugiert (1 min., 13.000 rpm Eppendorf-Tischzentrifuge), in wenig HSME und in Proteinprobenpuffer (1x) zur Denaturierung aufgenommen.

2.4.5.2. Import in Thylakoide von höheren Pflanzen

Die Methode zum Import von Proteinen in Erbsenthylakoide wurde angelehnt an das Standardprotokoll aus dem Labor von Colin Robinson, University of Warwick, Coventry, Großbritannien. Es stellte die Basis zu dem Protokoll für den Import in Kieselalgenthylakoide und verläuft deswegen analog dazu.

Es wurden 45 µl Erbsenthylakoide (0,5 – 1 µg Chl./µl) und 10 µl 1:1 verdünnter Translationsansatz in einem 60 µl-Ansatz verwendet. Stromaler Extrakt wurde durch den osmotischen Schock von intakten Erbsen-Plastiden mit HM (50 mM HEPES pH 8, 10 mM MgCl₂) gewonnen. Ein osmotischer Ausgleich erfolgte nicht. Die Thylakoide wurden nach der Isolation entsprechend der Art des Experimentes in HM oder stromalen Extrakt aufgenommen. Die Verwendung von Nukleotiden, Belichtung, Inhibitoren und Apyrase erfolgte wie unter 2.11.4 bzw. Ergebnisteil beschrieben.

Nach Thylakoidzugabe zum Starten der Importreaktion wurden die Proben bei 25°C, i.d.R. Belichtung (150 µm Photonen/m²sec) für 25-30 min inkubiert. Die Aufarbeitung der Probe erfolgte im Anschluß wie beim „Thylakoidimport für Kieselalgen“ erläutert. Anstelle von HSM wurde HM verwendet. Für den Proteaseansatz wurde HMC (HM mit 2 mM CaCl₂) und HME₂ (HM mit 10 mM EDTA und zusätzlich 2,5 mM EGTA) genutzt.

2.4.6. Auftrennung und Nachweis von Proteinen

2.4.6.1. Polyacrylamidgelelektrophorese

Die Proteinauftrennung erfolgte in denaturierenden Polyacrylamidgelen nach Laemmli (1970). Als Ausgangssubstanz wurde eine 30%ige Fertigacrylamidlösung (30 : 0,8 Acrylamid/Bisacrylamid) der Firma Roth verwendet. Es wurden je nach Bedarf zwischen 9 - bis 15 %ige Trenngele und 5%ige Sammelgele gegossen. Neben dem Acrylamid beinhalten die Gele 1xSammelgelepuffer (Sammelgelepuffer 5x : 0,5 % SDS, 300 mM Tris/HCl pH 6,7)

bzw. 1xTrenngelpuffer (Trenngelpuffer 2,5x : 0,25 % SDS, 1,875 M Tris/HCl pH 8,9), APS (0,034 ‰ für Trenngele, 0,08 ‰ für Sammelgele) und TEMED (0,05 ‰ für Trenngele, 0,08 ‰ für Sammelgele). Das Trenngel wurde zuerst hergestellt, zur besseren Kantenbildung mit etwas Isobutanol überschichtet und nach einer Polymerisierungszeit von mindestens 1 Std. mit Sammelgel überschichtet. Nach dem Einsetzen des Probenkammes wurde das Gel für mindestens eine Stunde polymerisiert.

Große Gele (20 cm x 30 cm x 0,1 cm) wurden mit 120 bis 140 V (max. 100 mA am Anfang) als Laufbedingungen über Nacht (12-15 Std.) laufen gelassen. Bei Minigelen (10 cm x 10 cm x 0,1 cm) wurden die Laufbedingungen von 3 bis 4 Std. bei 100 bis 120 V gewählt. Als Laufmittel wurde ein 1xElektrophoresepuffer (Elektrodenpuffer 5x : 0,5 % SDS, 1,92 M Glycin, 0,25 M Tris) verwendet.

Generell wurden alle Proben mit 1 bis 5xProbenpuffer versetzt und nach guter Durchmischung für 3 min bei 80 bis 95 °C denaturiert.

2.4.6.2. Proteinfärbung, Autoradiographie und Quantifizierung

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für mindestens 30 min. in 25 % Ethanol +10 % Essigsäure unter Schütteln fixiert.

Gele mit radioaktiven Proben wurden nach der Fixierung entweder direkt in einer Verstärkerlösung (Amplify, Fa. Amersham) inkubiert oder vorher mit Coomassie gefärbt. Anschließend wurde das PAA-Gel in einem Geltrockner bei 65 - 70 °C für 2 Stunden unter Vakuum getrocknet. Die Expositionsdauer der radioaktiven Gele auf den Röntgenfilmen bei -70 °C richtete sich nach der Intensität. Zur Quantifizierung der radioaktiv markierten, importierten Proteine wurde der Fujifilm-Phosphorimager BAS-1800 mitsamt Scanningsoftware „Image Reader“ (MacIntosh-System) verwendet. Auswertung erfolgte über die mitgelieferte Software „AIDA 2.0“ (Dos-System) oder „Image Gauge“ (MacIntosh-System). Die Lagerung der getrockneten Gele mit der Imager-Matrix (Fa. Fujifilm) richtete sich nach der Intensität der Strahlung. Quantifizierungen von Restaktivitäten berechnen sich in der Regel aus einem gleichen Aliquot behandelte Probe mit unbehandelte Probe als Quotient.

Proteine auf nicht-radioaktiven Gelen wurden über Coomassie- bzw. Silberfärbung detektiert. Die Coomassiefärbung erfolgte durch eine mindestens 60 minütige Inkubation der fixierten Gele unter Schütteln in einer Färbelösung (50 % Ethanol, 10 % Essigsäure, 0,1 % Coomassie) und anschließender mehrmaliger, mehrstündiger Waschung in Entfärber (30 % Ethanol, 10 % Essigsäure). Bei Bedarf wurde das Gel wie für radioaktive Gele beschrieben getrocknet.

Die Silberfärbung basiert auf Heukeshoven und Dernick (1986) und ist eine äußerst empfindliche Färbemethode von Proteinen (bis zu 2 ng). Zur elektrochemischen Reduzierung der Proteine wurden die fixierten Gele für 30 bis 60 min in Inkubator-Lösung (30% Ethanol, 0,5 M Natriumacetat, 0,5 % Glutardialdehyd, 0,2 % Natriumthiosulfat) geschwenkt und nach dreimaliger Waschung von je 15 min. mit Aqua bidest. in einer silberhaltigen Tränke (0,1 % Silbernitrat, 0,02 % Formaldehyd) für 30 min. gelagert. Zur Färbung wurde das Gel von restlicher Silberlösung durch zweimaliges, kurzfristiges Waschen mit Aqua bidest. befreit und dann mit der Entwicklerlösung (2,5 % Natriumcarbonat, 0,02 % Formaldehyd) geschwenkt. Der Inkubationszeitraum richtet sich nach der gewünschten Intensität der Bande und nach dem Hintergrund. Die Reaktion wird durch eine Inkubation mit einer Stop-Lösung (0,05 M EDTA) für ca. 30 min und einer Waschung mit Aqua bidest. gestoppt.

2.4.6.3. Western Blot und Immunodetektion

Die Immunodetektion wurde zur Identifikation nichtradioaktiver Proteine in einem Proteingemisch eingesetzt. Die Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und dann auf eine Nitrocellulosemembran in einer Western-Blot-Apparatur (Elektroden : Pharmacia-Biotech NovaBlot, Gehäuse : LKB - 2117 Multiphor II) transferiert. Das Gel wurde in einem Semi-dry-Sandwich-Aufbau zwischen mehreren Lagen Filterpapier und der Nitrocellulosemembran in identischer Größe zum Gel aufgebaut. Auf die gut befeuchtete Anode wurden 2 Lagen Filterpapier mit Blot-Lösung 1 (300 mM Tris, 20 % Methanol, pH 10,4) und anschließend eine Lage mit Lösung 2 (25 mM Tris, 20 % Methanol, pH 10,4) getränkt übereinander gestapelt. Auf die Filterpapierlagen wurde zuerst die Nitrocellulosemembran (Fa. Schleicher&Schuell, Typ Protan 0,1 – 0,45 µm) und dann das Polyacrylamidgel, beide ebenfalls kurz in Lösung 2 geschwenkt, aufgelegt. Abschließend folgten drei Lagen Filterpapier in Lösung 3 (40 mM ε-Aminocaprinsäure, 25 mM Tris, 20 % Methanol) getränkt und die mit Wasser gut befeuchtete Kathode. Alle Lösungen wurden zuvor entgast und die Lagen luftblasenfrei aufgelegt.

Die Transferierung der Proteine erfolgt für 1,5 Std. mit 0,8 mA/cm² Gel und einer Begrenzung der Spannung von 13 V. Zur Kontrolle des Blots wurde die Nitrocellulosemembran anschließend für 5 min. reversibel mit Ponceau-Färbelösung (0,1 % Ponceaurot) gefärbt und dann zur Hintergrundentfernung mit Aqua bidest. gewaschen.

Nach der Transferierung der Proteine auf die Membran wurde die Membran in die für die verschiedenen Antikörper oder Nullseren vorgesehenen Spuren geteilt und dann zweimal zur Absättigung der Membran mit Proteinen in 50 ml Caseinlösung (130 mM NaCl, 20 mM NaOH, 1 % Casein (alkali-löslich), 10 mM Tris/HCl pH 8), 15 min, unter Schütteln inkubiert. Nach einer Waschung der Membran in TN-Medium (150 mM NaCl, 10 mM Tris/HCl pH 8) wurde die Membran mit dem primären, für das gesuchte Protein spezifischen Antikörper, als Antikörper/Caseinlösung (1:100 bis 1: 2000) über Nacht in einer Folie eingeschweißt und bei 4°C geschüttelt. Anschließend wurde die Membran zweimal zur Entfernung unspezifisch gebundener Antikörper in 50 ml TNT (50 mM NaCl, 1% Triton, 10 mM Tris/HCl pH 8), zweimal mit 50 ml Caseinlösung und einmal mit 50 ml TN-Medium für je 15 min gewaschen.

Zum Nachweis der Protein-Antikörper-Bindung wurde die Membran mit einem zweiten, auf Antikörper reagierenden Antikörper, als Antikörper/Caseinlösung (1: 3000), in einer Folie eingeschweißt und für 1 bis 1,5 Std. bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaliger Waschung mit 50 ml TNT und einmaliger Inkubation mit 50 ml TN, wurden die Proteinbanden mit Hilfe eines ECL-Westernblot-Systems (Fa. Roche) nach Herstellerangaben sichtbar gemacht. Die dabei entstehende Lumineszenz wurde durch Exposition mit einem Röntgenfilm im Zeitbereich von 2 sec. bis 5 min (je nach Stärke) aufgenommen.

2.5. Transformation von *Phaeodactylum tricornerutum*

Die gentechnische Veränderung der kleinen Kieselalge *Phaeodactylum tricornerutum* beruht auf einer Transformation über den Beschuß der Zellen mit DNA-beschichteten Wolfram- oder Goldpartikel. Es wurde die „Particle-gun“ der Fa. Biorad verwendet.

Von 100-200 ml Algenkultur wurde die Zellzahl mittels einer Thoma-Kammer bestimmt; bei 2500 g, RT, für 10 – 15 min. aufkonzentriert und das Zellpellet auf eine Konzentration von 1x10⁹ Zellen/ml mit sterilem Seewasser eingestellt. Je 100 µl (1x10⁸ Zellen) wurden für den Beschuß auf Seewasser-F2-Agarplatten (ohne Antibiotika, siehe Kultivierung) mittig, auf eine Kreisfläche von 3,5 bis 12 cm² ausgestrichen und anschließend angetrocknet.

Zwischenzeitlich wurden 5 µg DNA 1 µl/µg mit 50 µl CaCl₂ 0,2 M, 20 µl Spermidin 0,1 M, 50 µl gut geschüttelten Wolfram- bzw. Goldpartikel (in Wasser) unter permanenten, kräftigen Schütteln versetzt. Nach 1 min., RT, vortexen

wurde der Ansatz für 10 min. bei Raumtemperatur zur Sedimentation ruhen gelassen, der Überstand vorsichtig abgenommen und die an den Beads adsorbierte DNA mit 250 µl EtOH 100% fixiert. Nach kurzen Vortexen wurden die Partikel für 3 – 5 min. sedimentiert und in 50 µl frischem EtOH (100%) aufgenommen. Die Beads sind für 1 Std. für die Transformation verwendbar.

Die vom Hersteller gelieferten Wolfram- oder Goldpartikel wurden in EtOH geliefert und nach der Beschreibung der Particle gun (Fa. Biorad) vor der Verwendung in steriles Aqua bidest. aufgenommen.

Die Vorbereitung und der Beschuß der Algen wurde entsprechend der Herstellerangabe durchgeführt. Nach Errichten eines Unterdruckes in der Schußkammer wurde ein Druck aus einer Helium-Gasflasche (5% Helium) auf eine „Burst plate“ aufgebaut, welche bei einem spezifischen Druck bricht und den Druck auf eine Trägerplatte freigibt. Diese mit den DNA-Metallbeads beschichtete Trägerplatte wird durch die Druckfreigabe beschleunigt und nach kurzem Flug schlagartig an einem Metallgitter abgebremst. Durch die Abbremsung werden die Metallbeads von der Trägerplatte losgerissen und schlagen auf die darunterliegende Algen auf. Die Algen-Platten wurden auf der höchstmöglichen Stufe, so nah als möglich unter dem Bremsgitter plaziert. In der Regel wurde eine „Burst plate“ von 1550 PSI verwendet, jedoch wurden auch 1350 PSI-Platten verwendet. Der Druck innerhalb der Kammer betrug ungefähr 25 mbar. Es wurden 10 µl Beads (äquivalent 1 µg DNA) pro Schuß verwendet.

Nach dem Beschuß wurden die Algen für 24 Std. kultiviert und am nächsten Tag mit wenig sterilen F2-Seewasser (ca. 600 µl) auf 4 bis 5 Antibiotika-haltigen F2-Seewasser-Agarplatten (Zeocin 75 µg/ml, 37,5 µg Kanamycin) übertragen. Nach ungefähr 2 Wochen waren die erste Transformandenkolonien zu erkennen. Das Sichten der Zellen erfolgte zwei Wochen später, zuerst mit einer erneuten Selektion auf Antibiotika-haltigen Seewasserplatten und anschließend mit Untersuchungen am Fluoreszenzmikroskop.

Alle untersuchten Transformanden wurden mittels PCR auf ihr Insert kontrolliert.

2.6. Mikroskopie

2.6.1. Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie

Lichtmikroskopische Untersuchungen von isolierten Plastiden und von kultivierten Algen erfolgten mit dem Lichtmikroskop Leica Biomed und mit dem Auflichtmikroskop Leica DMIL. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen erfolgten mit dem Zeiss Axiphot (Inst. für Entwicklungsbiologie der Pflanzen, HHU Düsseldorf). Einstellungen und Durchführung entsprechend den Herstellerangaben.

2.6.2. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)

Die Überprüfung der Lokalisation vom „Green-fluorescent-protein (GFP)“ in transformierten Zellen von *Phaeodactylum tricornerutum* erfolgte mit dem „Leica-TCS-NT confokal laser scanning mikroskop“, Mikroskop-Einheit Leica DMRBE (Institut für Genetik). Die GFP-Fluoreszenz wurde gemessen bei 488 nm, angeregt wurde das GFP mittels eines Argon-Krypton Lasers. Die Aufnahme der Bilder wurde gesteuert mit der mitgelieferten Software von Leica (TCS-NT Version 1.6.551), mit dem FS-Screengrabber gespeichert und mit Micrografx Picture Publisher 7.0 die Falschfarbenbilder („Invertieren“) erstellt.

3. Ergebnisse

3.1. Kotranslationaler Transport von kernkodierten Plastiden-Proteinen aus Kieselalgen in ER-Vesikel

Die kernkodierten, plastidären Vorläuferproteine vom Fucoxanthin-chlorophyll-a,c-bindenden Protein (pFCP), der Phosphoribulokinase (pPRK) und der γ -Untereinheit der plastidären ATPase ($p\gamma$) aus der Kieselalge *Odontella sinensis* zeigen nach Berechnungen der primären Aminosäuresequenz eine zweigeteilte N-terminale Erweiterung. Die erste Domäne weist Merkmale einer eukaryotischen Signalsequenz, die nachfolgende der einer Transitsequenz höherer Pflanzen auf (Kroth-Pancic 1995; Pancic und Strotmann 1993). Das FCP-Präprotein und das Vorläuferprotein der γ -Untereinheit konnten kotranslational in ER-Mikrosomen importiert werden (Lang 1996).

Um den kotranslationalen Transport von kernkodierten Plastiden-Proteinen der Diatomeen in ER-Vesikel genauer zu untersuchen, wurden verschiedene Varianten von der γ -Untereinheit der ATPase und der Phosphoribulokinase hergestellt und in Mikrosomen importiert.

3.1.1. Modifikation von kernkodierten Plastiden-Proteinen aus der Kieselalge *Odontella sinensis*

Das um die Signalsequenz verkürzte Protein der prä- γ -UE der ATPase, **ToMo** (AtpCA1-17 Q18M; To: Transitseq. *Odontella*, Mo: reifes („mature“) Protein *Odontella*), besitzt als neuen Translationsstart an Position 17 anstelle eines Glutamins ein Methionin und wurde von Dr. Kroth bereitgestellt. Zur Steigerung der Translationseffizienz wurde das *ToMo*-Genkonstrukt (pBluescript) mit BamHI und KpnI in Sp6-Promoter-Orientierung in einen sp72-Vektor (BamHI-KpnI) und sp73-Vektor (BgIII-KpnI) überführt.

Um eine genauere Größenbestimmung zu erhalten und um eine mögliche Rolle der Sequenzbereiche des reifen Proteins auf den Import zu untersuchen, wurde von dem Vorläuferprotein ($p\gamma$) und dem ToMo-Konstrukt ein großer Teil des reifen Proteins deletiert. Hierzu wurde die natürlich vorkommende SphI-Erkennungsstelle (Pos. 534) im *atpC*-Gen und die im Vektorsystem sp73 hinter dem Gen liegende SphI-Stelle genutzt. Nach Restriktionsverdau mit SphI und intramolekularer Ligation entstanden die Konstrukte *pgD170-370* bzw. *ToMoD170-370*. Beide besitzen einen 63 Nt (21 AS) großen Linker bis zum neuen Stopkodon.

Das *iPRK*-Genkonstrukt (pPRK ohne Signalsequenz: PrkA1-17 F18M) wurde mittels den Primern *iPRK3* und *iPRK4* in einer Kreis-PCR mit Pfu-Polymerase (Stratagene) von *prk*-Gen (Vektor pBluescript SK, T3-Orientierung) erzeugt (Primersequenz siehe Kap. 2.2.4.4). Mittels der PCR wurde direkt vor dem neu erzeugten Startmethionin (F18M, im Primer fett dargestellt) eine Erkennungsstelle für XbaI eingeführt (im Primer unterstrichen). Die neue Schnittstelle und eine vor dem Gen liegende XbaI-Erkennungsstelle wurden geschnitten und intramolekular wieder ligiert. Der Verdau führte zu dem Verlust des kodierenden Bereiches für die Signalsequenz, welche zwischen diesen beiden Schnittstellen lag.

3.1.2. Import der γ -Untereinheit der plastidären ATPase in ER-Vesikel

Zum Nachweis des kotranslationalen Imports und der Größe der Signalsequenz wurde das Vorläuferprotein und das verkürzte Konstrukt der γ -UE der ATPase (ToMo) mit bzw. ohne Zugabe von ER-Vesikeln in einem *in-vitro*-Translationsansatz synthetisiert und die resultierenden radioaktiv markierten Proteine anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt.

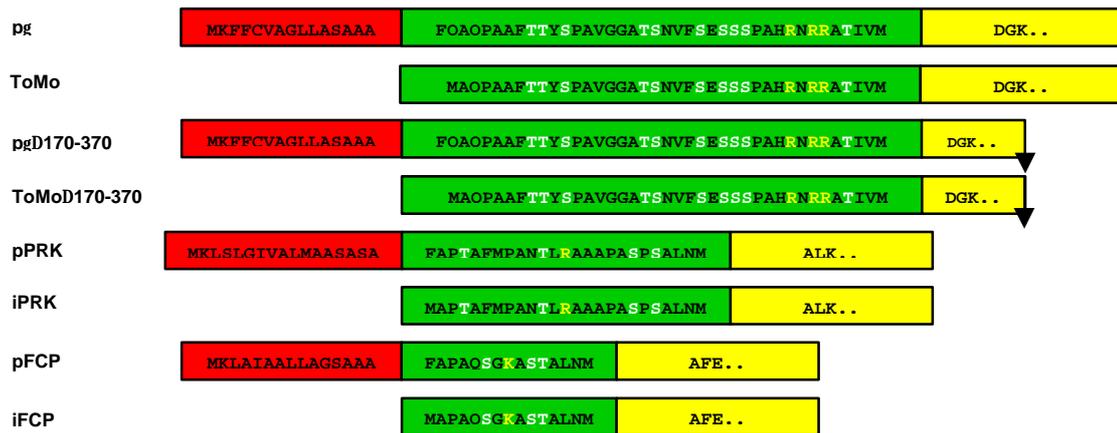


Abbildung 3 - 1 Verwendete Konstrukte von plastidären Diatomeen-Proteinen für die Untersuchung des kotranslationalen Transportes

Schematische Darstellung des N-terminalen Bereiches kernkodierter Plastiden-Proteine aus der Kieselalge *Odontella sinensis* sowie davon abgewandelte Varianten mit zusätzlicher Angabe der Aminosäuresequenzen. Rot dargestellt ist die eukaryotische Signalsequenz und grün die Transitsequenz der zweigeteilten Kieselalgen-Präsequenz. Das stark verkürzt dargestellte reife Protein ist gelb unterlegt. Pfeile markieren die Konstrukte mit C-terminaler Verkürzung des reifen Proteins. Hydroxylierte Aminosäuren in der Transitsequenz sind in weiß, positiv geladene sind in gelb geschrieben. pγ: prä-γ-Untereinheit der plastidären ATPase (Pancic und Strotmann 1993); ToMo: Intermediatkonstrukt der γ-UE der ATPase (To: Transitseq. *Odontella*, Mo: reifes („mature“) Protein *Odontella*); pPRK: Prä-Phosphoribulokinase (AccNo. Y08610); iPRK: Intermediatkonstrukt der Prä-Phosphoribulokinase; pFCP: Prä-Fucoxanthin-chlorophyll-a,c-bindendes Protein (Kroth-Pancic 1995); iFCP: Intermediatkonstrukt des Prä-Fucoxanthin-chlorophyll-a,c-bindendes Proteins.

Nach der Auftrennung findet sich im Importansatz für die pγ-UE der ATPase inklusive der ER-Vesikel zusätzlich zur Proteinbande des Vorläuferproteins (pγ) eine weitere atpC-Proteinbande in der Größe des intermediären, um 17 AS verkleinerten ToMo-Proteins.

Besonders deutlich wird dies anhand der C-terminal im reifen Protein verkürzten Konstrukte pγΔ170-370 und ToMoΔ170-370, welche eine bessere gelelektrophoretische Auftrennung erlauben (Abb. 3-2A). Der Größenunterschied zwischen dem pγΔ170-370- und dem ToMoΔ170-370-Protein betrug im SDS-Proteingel ungefähr 1,6 kDa. Im Gegensatz zum Vorläuferprotein erweist sich das zusätzlich entstandene Protein (Abb. 3-2A, *) bei nachfolgenden Proteasebehandlungen der Importansätze für mindestens 30 Minuten (Abb. 3-2A, MD(PK)15' bzw. 30') und gegenüber unterschiedlichen Proteasen wie Trypsin und Carboxypeptidase Y als resistent. Die vorherige Zugabe von Triton-X100 macht das Protein jedoch für die Proteasen zugänglich (Abb. 3-2A, letzte Spur), was zusammengefaßt darauf hindeutet, daß das Protein innerhalb der Mikrosomen importiert vorliegt. Die Experimente mit pγΔ170-370 zeigen zudem, daß der C-Terminus des reifen Proteins keinerlei Einfluß auf den kotranslationalen Transport in das ER besitzt.

Importversuche mit dem ToMo-Protein führten zu keinem erkennbaren Transport in die ER-Vesikel (Daten nicht gezeigt). Zusammengefaßt weist dies auf eine strikte Abhängigkeit des Imports von der Signalsequenzdomäne hin.

3.1.3. Glykosylierung der PRK beim kotranslationalen Import in ER-Vesikel

Im Gegensatz zu pγ oder pFCP zeigt die Untersuchung des Vorläuferproteins der Phosphoribulokinase (PRK) aus der Kieselalge *Odontella sinensis* in kotranslationalen Importexperimenten die Bildung von drei zusätzlichen Proteinen (Abb. 3-2B). Alle drei Proteine sind nach ihre gelelektrophoretische Auftrennung größer als das Vorläuferprotein (pPRK) (Abb. 3-2B, K).

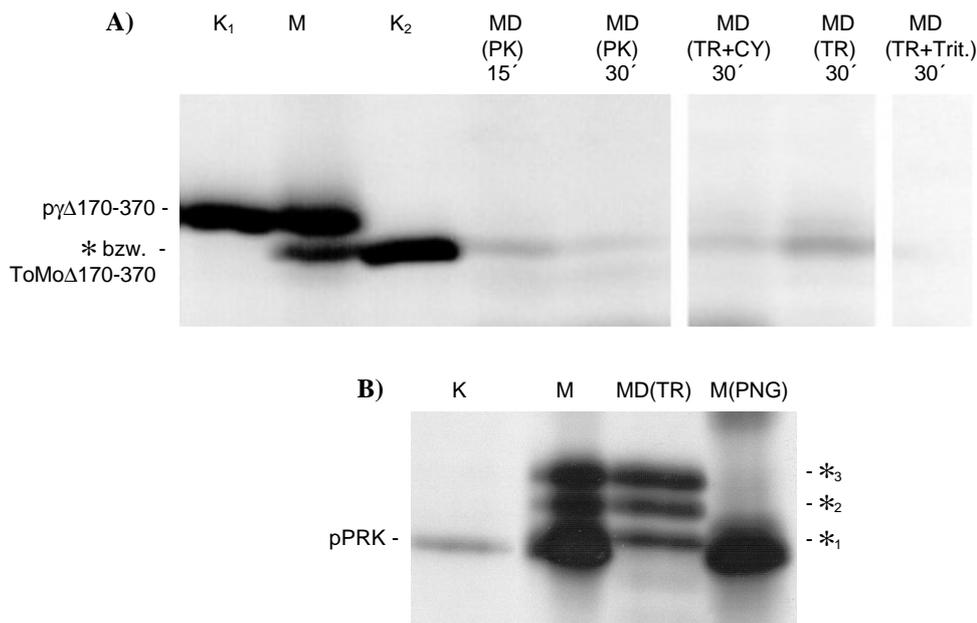


Abbildung 3 - 2 Import kernkodierter Plastiden-Proteine aus Diatomeen in ER-Mikrosomen

Import vom $p\gamma\Delta 170-370$ - (A) und pPRK-Protein (B) aus *Odontella sinensis* in Hundepankreas-mikrosomen. Autoradiographie der radioaktiv markierten Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung im SDS-PAA-Gel. (A) K₁: *in-vitro*-Translationsansatz von $p\gamma\Delta 170-370$ (Kontrolle), M: Ansatz mit Mikrosomen, K₂: *in-vitro*-Translationsansatz von ToMo $\Delta 170-370$ (Kontrolle), MD: nachträgliche Proteasebehandlung des Importansatzes (M) mit Protease K (PK), 265 $\mu\text{g/ml}$ Ansatz, mit Trypsin und Carboxypeptidase Y (TR+CY), 6 μg TR + 50 μg CY/ml Ansatz, mit Trypsin alleine (TR), 28 $\mu\text{g/ml}$ Ansatz, und Trypsin + Triton (TR+Trit.), 33 μg TR/ml Ansatz und 0,5 %Triton-X100. (*) markiert das in ER-Vesikel importierte atpC-Protein. (B) K: Translationsansatz von pPRK (Kontrolle), M: mit Mikrosomen, MD: nachträgliche Proteasebehandlung des Importansatzes (M) mit Trypsin (TR), 45 $\mu\text{g/ml}$ Ansatz, M(PNG): Importansatz mit nachträglicher Deglykosylierung der Zuckerkomplexe durch PNGase F, 250 U. (*₁₋₃) markiert die drei Varianten an importierten und glykosylierten PRK-Proteinen.

Die entsprechenden Proteine werden nicht durch nachträglich zugegebene Proteasen angegriffen (Abb. 3-2B, MD(TR)), können aber durch Zugabe von Triton-X100 (0,5 %) vor der Proteasebehandlung degradiert werden (Daten nicht gezeigt). Hieraus läßt sich folgern, daß diese zusätzlichen PRK-Proteine in die ER-Vesikel importiert wurden.

Die drei unterschiedlich großen, importierten PRK-Proteine weisen auf eine ein-, zwei oder dreifache Glykosylierung im ER hin. Glykosylierte Proteine zeigen im PAA-Gel durch das Anbinden von Zucker-Komplexen ein langsames Laufverhalten. Die Massenzunahme durch die Kohlenhydratkette überdeckt dabei den Massenverlust durch die Prozessierung der Signalsequenz. Um die Möglichkeit einer PRK-Glykosylierung zu überprüfen, wurde der Importansatz nachträglich mit der Amidase PNGase F (Peptide-N-Glycosidase F) aus *Flavobacterium meningosepticum* (Maley et al. 1989) behandelt (Abb. 3-2B, letzte Spur). Das Enzym PNGase F spaltet im Fall einer N-Glykosylierung die Amid-Bindung zwischen Asparagin und dem ersten Zuckerbaustein der Kohlenhydratkette (N-Acetyl-Glucosamin). Die Inkubation mit dem Enzym resultiert in einer Verkleinerung der importierten PRK-Protein (Abb. 3-2B, letzte Spur). Die deglykosylierten Proteine weisen die Größe des um die Signalsequenz verkürzten iPRK-Proteins auf (nicht gezeigt).

Die Glykosylierung der pPRK erfolgt nicht innerhalb der zweiten Domäne der zweigeteilten Transportsequenz. Berechnungen der N-Glykosylierungsstellen (Asn-X-Ser/Thr) in der pPRK-Sequenz mit dem Programm PC Gene weisen auf die Positionen 157 (..HVNGTLD..), 341 (..LSNTSTK..) und 365 (..SNNGTGL..) im reifen Protein hin.

3.2. Untersuchungen zum posttranslationalen Transport von kernkodierten Plastiden-Proteinen aus Diatomeen in Erbsen-Chloroplasten

Alle derzeit bekannten kernkodierten Plastidenproteine aus Diatomeen weisen eine zweigeteilte Transportsequenz für den Transport in die Vier-Hüllmembran-Plastiden auf. Berechnungen an der zweiten Domäne der Transportsequenz der γ -Untereinheit der ATPase aus *Odontella* deuten dabei Eigenschaften einer möglichen Transitsequenz für den Import in Plastiden aus höheren Pflanzen an (Panic und Strotmann 1993). Ein Transport mit dem um die Signalsequenz verkürzten Intermediat der γ -Untereinheit (γ -UE) der ATPase in isolierte Plastiden von Spinat und Erbsen konnte gezeigt werden (Lang 1996).

Zur detaillierten Untersuchung der Funktion und Prozessierung der Diatomeen-Transitsequenz der γ -Untereinheit wurden verschiedene Proteinkonstrukte erstellt und posttranslational in Erbsen importiert. Des Weiteren wurden um die Signalsequenz verkürztes PRK- und FCP-Protein mit Erbsen-Plastiden inkubiert.

3.2.1. Posttranslationaler Import der γ -Untereinheit der ATPase in Erbsen-Chloroplasten

3.2.1.1. Proteinimport der γ -Untereinheit in den Erbsen-Chloroplasten

Für die Untersuchung der Funktion der zweiten Domäne wurde die intermediäre Form der γ -UE (ToMo) in einem posttranslationalen *in-vitro*-Importansatz für Plastiden höherer Pflanzen getestet.

Wie in Abb. 3-3A (Spur K) zu erkennen ist, führt die Transkription und Translation des *ToMo*-Genes in einem *in-vitro*-Translationssystem zur Bildung eines radioaktiv markierten ToMo-Proteins mit einer Größe von ungefähr 40 kDa und zu zwei weiteren Translationsprodukten von 35 kDa und 33 kDa. Die beiden zusätzlichen Proteine stellen Produkte eines Translationsstarts an nachfolgenden Startkodons dar (Lang 1996). Das 35 kDa-Protein beginnt mit dem zweiten Methionin (Pos. 54) der γ -UE der ATPase, welches direkt vor dem reifen Protein liegt. Das 33 kDa-Protein fängt mit dem Methionin an Pos. 77 oder 79 an. Das 35 kDa-Nebenprodukt dient im nachfolgenden als Größenstandard für das reife Protein.

Die Inkubation des Translationsansatzes in Gegenwart von Erbsen-Plastiden, Licht und 2 mM ATP (Abb. 3-3A) führt nach gelelektrophoretischen Auftrennung des Importansatzes zu einer zusätzlichen Proteinbande (Δ Mo) (Spur G, GD, SD). Das entsprechende Protein ist gegen nachträgliche Proteasebehandlungen geschützt (Spur GD, SD) und ist im Stroma (Spur SD) und nicht im Thylakoid lokalisiert (Spur TD). Entgegen der Erwartung verläuft das importierte γ -Protein im PAA-Gel nicht auf der Höhe des Größenmarkers für das reife Protein (35 kDa), sondern unterhalb des dritten Translationsproduktes mit einer Größe von 32 kDa.

Der Import des *atpC*-Proteins der Diatomeen in die Erbsen-Plastiden weist auf eine zu höheren Pflanzen funktionelle Transportsequenzen hin.

Der Transport des Diatomeen-*atpC*-Proteins in Erbsen-Plastiden ist, wie für höhere Pflanzen beschrieben, von ATP oder Licht als Energielieferant abhängig (Abb. 3-3D Spur 2, 3). Kopplung beider Faktoren führt zu keiner erkennbaren Steigerung der Translokation (Spur 1).

Der Importansatz besitzt vermutlich durch den Translationsansatz eine geringe Menge verwertbarer Energieäquivalente, die ohne Belichtung und Zugabe von ATP zu einem geringen Import führt (Spur 4). Diese Energieäquivalente im Translationsansatz konnten durch vorhergehende Phosphorylierung von Glucose (10 mM Glukose, 1 U Hexokinase für 10 min., 25°C) vor der Importreaktion entfernt werden (Spur 5).

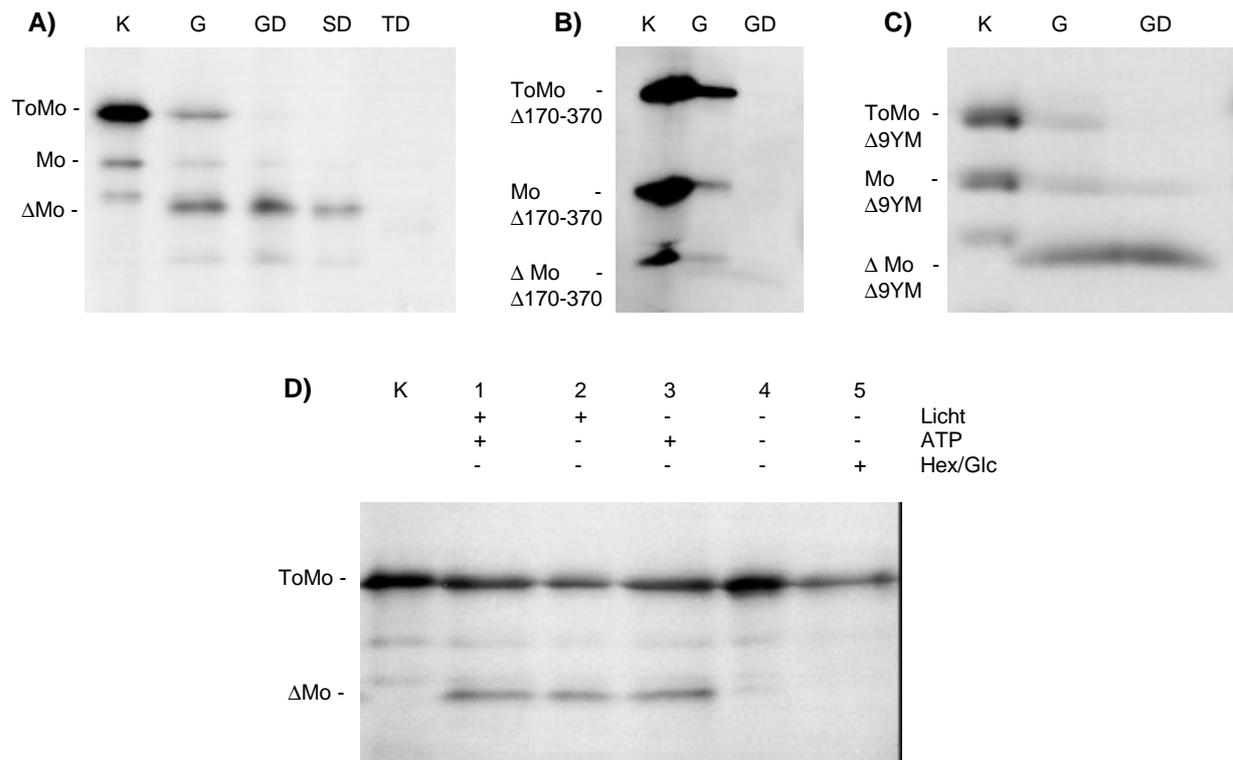


Abbildung 3 - 3 Posttranslationaler Import der g-Untereinheit der ATPase aus *Odontella* in Erbsen-Plastiden

Import der Intermediatform der γ -Untereinheit der ATPase (ToMo-Protein) (A,D) bei verschiedenen Energiebedingungen (D), vom ToMo Δ 170-370-Protein (B) sowie von ToMo Δ 9YM (C) in Erbsen-Chloroplasten. (A-D) Autoradiographie der radioaktiv markierten Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung im SDS-PAA-Gel. K: Translationsansatz, Gesamtimportansatz nach Percollaufreinigung ohne (G) bzw. mit (GD) nachträglicher Proteasebehandlung (Thermolysin 0,2 mg/ml, 30min., 4°C). Fraktionierung nachträglich proteasebehandelter Plastiden (GD) in Stroma (SD) und Thylakoidfraktion (TD). (D) K: Translationsansatz, (Spur 1-5) Gesamtimportansatz nach Percollaufreinigung bei verschiedenen Energiebedingungen (Licht: 150 μ mol Quanten/m² sec, ATP: 2 mM Endkonzentration, Hex/Glc: Vorinkubation des Translationsansatzes mit 10 mM Glucose / 1 U Hexokinase, 10 min., 25°C vor Importreaktion). + oder – bezeichnen die Zugabe bzw. das Fehlen der betreffenden Bedingung.

Ebenso ist der Import des ToMo-Proteins abhängig von Proteinfaktoren auf der Plastidenmembran, da Anbindung und Import durch eine vorherige Inkubation der Plastiden mit Proteasen inhibiert werden (Daten nicht gezeigt).

Posttranslationale Importversuche vom Vorläuferprotein $p\gamma$ in die Erbsen-Plastiden zeigen dagegen kein Ergebnis (Daten nicht gezeigt). Dies deutet auf eine Störung der Rezeptorerkenkung oder des Imports durch das erste, signalsequenzartige Adressierungssignal in der zweigeteilten Diatomeen-Transportsequenz hin.

Ein Einfluß des reifen Protein auf den Plastidenimport von ToMo zeigt sich nicht. Die Inkubation des im reifen Protein C-terminal verkürzten ToMo Δ 170-370 mit den Erbsen-Plastiden führt zum Import und zu einer gleichartigen Prozessierung wie beim ToMo-Protein (Abb. 3-3B).

Die Deletion des N-Terminus der Diatomeen-Transitsequenz (ToMo Δ 9YM, Konstrukt von Dr. Kroth erstellt) führt zu keinem veränderten Import in die Erbsen-Plastiden. Die verbleibenden C-terminalen 30 AS der Transitsequenz führen zu einer effektiven Translokation in die Erbsen-Plastiden und zu einer Prozessierung zu einem 32 kDa-Protein (Abb. 3-3C).

3.2.2. Funktionelle Charakterisierung der Transitsequenz und der Prozessierungsstelle der γ -Untereinheit der ATPase

Wie in Kapitel 3.2.1 gezeigt, führt der Import des um die Signalsequenz verkürzten γ -UE-Konstruktes (ToMo) in Plastiden höherer Pflanzen zu einem kleineren Produkt als erwartet. Somit stellte sich die Frage, ob überhaupt die Prozessierungsstelle der Diatomeen-Transitsequenz durch die stromale Transitpeptidase der Erbsen-Plastiden erkannt wird.

3.2.2.1. Konstrukterstellung

Die Prozessierungsstellen der stromalen Transitpeptidasen in höheren Pflanzen weisen häufig das Aminosäuremotiv I/V-X-A/C (Gavel und v. Heijne 1990). Ein entscheidender Unterschied zwischen den Erkennungsstellen der höheren Pflanzen und denen der Kieselalgen ist das fast ausnahmslose Vorhandensein der Aminosäure Methionin an Position -1 direkt vor dem reifen Protein (Abb. 3-1, 3-19).

Um einen möglichen Effekt dieses Methionins an der Prozessierung in Erbsen-Plastiden zu untersuchen, wurde im ToMo-Konstrukt das Methionin (IVM) der Prozessierungsstelle gegen ein Cystein ausgetauscht (IVC) und somit die Sequenz den höheren Pflanzen angenähert (Proteinkonstrukt: **ToMoIVC**) (Abb. 3-4).

Zu diesem Zweck wurde eine Erkennungsstelle (MstI), die zu glatten Schnittenden führt, mittels PCR eingeführt. Die PCR wurde in zwei Ansätzen mit *ToMo*-pBluescript als DNA-Vorlage und der Pfu-Polymerase durchgeführt (Primer siehe Kap. 2.2.4.4). Für den ersten Ansatz wurde der Primer Tomo1 und ein Primer gegen die T3-Promoterregion des Vektors verwendet. Der zweite Ansatz wurde mit dem Primer Tomo2 und einem Primer gegen die T7-Promoterregion durchgeführt. Nach der Aufreinigung der PCR-Produkte in einem Agarosegel wurde das PCR-Fragment aus dem ersten Ansatz (Tomo1) mit BamHI und das zweite PCR-Produkt mit KpnI geschnitten. Bevor die Fragmente in geschnittenen sp72-Vektor (BamHI-KpnI) kloniert werden konnte, wurden die Fragmente mit T4-Polynukleotidkinase phosphoryliert und mit ihren glatten Enden (MstI) ligiert.

Neben der Erstellung des ToMoIVC-Proteinkonstruktes wurden mehrere Varianten mit dem Ziel zur Eliminierung der neuen Prozessierungsstelle im reifen atpC-Protein erzeugt (**ToMo-A84-85D**, **ToMo-A85M**, **ToMoD80-89**) (Abb. 3-4). Um die zusätzliche Prozessierungsstelle im reifen Protein zu finden, wurden zuerst die apparenten Molekulargewichte der Translationsprodukte in der Kontrolle und der importierten Proteine bestimmt. Durch einen Vergleich mit der Primärsequenz wurde die Prozessierungsstelle auf die Region 80 bis 87 des Vorläuferproteins geschätzt. Hierin findet sich an der Position 83-85 die Aminosäuresequenz $_{83}$ VAA in einer stark helikalen Struktur, welche dem häufigen Transit-Prozessierungsmotiv I/V-X-A/C entspricht. Das Proteinkonstrukt ToMoA84-85D besitzt einen Austausch der zwei Alanine an Pos. 84 und 85 gegen die großvolumige, geladene Aminosäure Asparagin. ToMoA85M besitzt dagegen einen Austausch des zweiten Alanins gegen ein Methionin. Durch beide Mutationen bleibt die helikale Struktur der Region jedoch erhalten, wobei durch die Austausche in ToMoA84-85D die Helix-Wahrscheinlichkeit der Region von rund 50 % auf unter 20 % gesenkt wird.

Die Gene *ToMoA84-85D* und *ToMoA85M* wurden mittels einer Standard-PCR mit dem Primer QAM29 für *ToMoA85M* und QAD2829 für *ToMoA84-85D* sowie einem Gegenprimer, welcher gegen die hinter dem Gen liegende T7-Promoterregion im Vektor gerichtet war, erzeugt. Vor den Mutationsstellen lag im Primer eine natürlich vorkommende Erkennungsstelle für das Enzym HindIII. Nach Isolation der PCR-Fragmente und dem Verdau mit HindIII und KpnI (Gen-Ende) wurden die äquivalente Region im *ToMo*-Gen, herausgeschnitten mit HindIII und KpnI, gegen das Fragment ausgetauscht.



Abbildung 3 - 4 Schematische Darstellung der modifizierten ToMo-Proteine

Darstellung der unterschiedlichen Proteinkonstrukte der γ -Untereinheiten der plastidären ATPase aus der *Odontella* und Spinat zur Untersuchung der zusätzlichen Prozessierungsstelle. Rot sind Signalsequenzen und grün Transitpeptide (T) unterlegt. Gelbe Balken stellen das reife Protein (M) dar. Proteinbereiche aus Spinat sind zusätzlich straffiert. o: *Odontella sinensis*, s: Spinat, Mo' bzw. Ms': Teile des reifen Proteins der γ -UE-ATPase von *Odontella* oder Spinat.

Die Herstellung des Genkonstruktes *ToMoD80-89* wurde mittels der natürlich vorkommenden NcoI-Schnittstelle an Position 252 in *Odontella-atpC*-Gen möglich. Zielsetzung war es mit dieser und einer über Kreis-PCR neu erstellten NcoI-Schnittstelle 27 Nt weiter hinten in der Sequenz eine Deletion des kodierenden Bereiches für die Aminosäuresequenz $_{80}\text{KLVA}^{\text{kursiv}}\text{AAKVRR}_{89}$ zu erhalten. Diese Peptidsequenz beinhaltet die vermutete neue Prozessierungsstelle (kursiv). Für die PCR wurden als Primer d80-89P1 und d80-89P2 und das *ToMo*-Genkonstrukt als DNA-Vorlage verwendet. Nur der Primer d80-89P1 beinhaltet die neue NcoI-Schnittstelle. Der Primer d80-89P2 ist nur zur Amplifikation der weiter unterhalb in der Sequenz liegenden natürlichen Erkennungsstelle notwendig.

Um ein genaueres Bild der Funktion der Transitsequenz zu bekommen, wurden drei weitere Konstrukte unter Verwendung des kodierenden Bereiches des Spinat-*atpC*-Gens erzeugt. Die Proteinkonstrukte **ToMs** und **TsMo** zeichnen sich durch einen kreuzweisen Austausch der Transitsequenzen zwischen dem Kieselalgen- und dem Spinat-*atpC*-Protein aus (Transitsequenz, „mature“ reifes Protein, *Odontella*, Spinat). Abschließend wurden die ersten 77 AS aus dem reifen Kieselalgen-Protein anstelle der ersten Aminosäuren im reifen Protein von Spinat ausgetauscht (**TsMo'Ms'**).

Die Genkonstrukte *ToMs*, *TsMo* und *TsMo'Ms'* wurden kreuzweise über mehrere Stufen erstellt. Hierzu wurden für die Klonierung die natürlich vorkommenden Erkennungsstellen MstI (AviII) im Spinat-*atpC*-Gen und BstXI im *Odontella-atpC*-Gen am Übergang zwischen dem kodierenden Bereich für die Transitsequenz und dem reifen Protein verwendet. Im Prinzip wurden zuerst über PCR die natürlichen Schnittstellen eines Gens an die vergleichbare Stelle im anderen Gen eingeführt. Anschließend wurde der kodierende Bereich für das reife Protein herausgeschnitten und mit dem Genbereich des anderen reifen Proteins ersetzt. Die originalen Prozessierungsstellen der Transitsequenzen wurden bei der Erstellung der Varianten beibehalten.

Für die Herstellung der Variante *ToMs* wurde zuerst eine Kreis-PCR mit den Primern TsMs1 und TsMs2, welche beide die *Odontella*-BstXI-Schnittstelle beinhalten, vom *atpC*-Gen aus Spinat in sp73 (T7-Orientierung) durchgeführt.

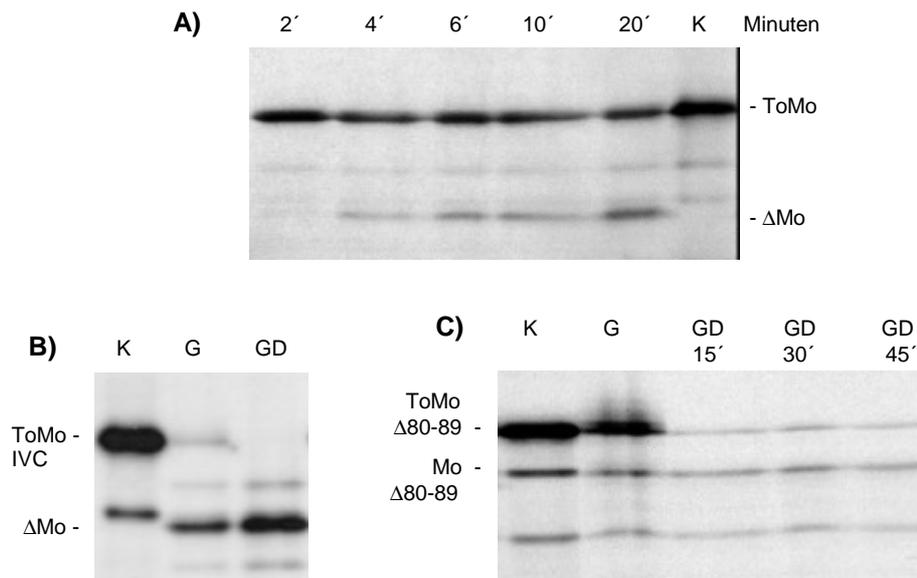


Abbildung 3 - 5 Charakterisierung der Prozessierung der g-UE aus *Odontella* in Erbsen-Plastiden

Posttranslationale Importexperimente von ToMo- (A), von ToMoIVC- (B) und ToMo Δ 80-89-Protein (C) mit Plastiden aus Erbsen. (A-C) Autoradiographie der radioaktiv markierten Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung im SDS-PAA-Gel. K: Translationsansatz zur Kontrolle, Gesamtimportansatz nach Percollaufreinigung mit (GD) oder ohne (G) vorheriger Proteasebehandlung, (A) Gesamtimportansätze mit unterschiedlicher Inkubationszeit von 2 bis 20 Minuten nachträglich aufgereinigt über eine Percollstufe (40%) (2' bis 20'), (C) Gesamtimportansatz mit nachträglicher Proteasebehandlung für 15 bis 45 Minuten und anschließender Percollaufreinigung (GD15'-GD45').

Nach Inkubation des Amplifikats mit BstXI, Ligation der Enden und Transformation (Konstrukt *TsMsIVM*) wurde das neu entstandene Gen mit BstXI und ScaI geschnitten. Parallel dazu wurde das Konstrukt *ToMo* in sp72-Vektor mit den selben Enzymen geschnitten und das dabei herausgeschnittene Fragment (kodierender Bereich des reifen *Odontella*-Proteins) gegen das Analoge aus dem Spinatkonstrukt (kodierender Bereich des reifen Spinat-Proteins) nach Klonierung ersetzt.

Das *TsMo*-Genkonstrukt wurde mit Hilfe des schon erstellten *ToMoIVC* (sp72-Vektor) gewonnen, welches die Spinat-Schnittstelle (MstI) am Übergang zwischen den Genbereichen für die Transitsequenz und dem reifen Protein besaß. Dieses Konstrukt und das *atpC*-Gen aus Spinat (sp73-vektor) wurden beide mit MstI geschnitten. Es entstanden jeweils zwei Fragmente, da zusätzlich noch innerhalb der Vektoren eine MstI-Schnittstelle (im Ampicillin-Restenzgen) vorlag. Nach Gelelution der gewünschten Fragmente wurden die glatten Fragmentenden wieder ligiert, die DNA in *E.coli* transformiert und auf Ampicillin-Platten gesichtet. Die Kenntnis über die Orientierung der Fragmente bei der Ligation war zweitrangig, da nur bei korrekter Orientierung eine funktionsfähige Ampicillin-Resistenz zu erhalten war.

Das Konstrukt *TsMoMs'* wurde über natürliche BstEII-Erkennungsstellen hergestellt, die an Position 538 im Spinatgen und an Position 421 im *Odontella-atpC*-Gen lagen. Hierzu wurde das *TsMo*-Konstrukt und das Spinat-*atpC*-Gen mit BstEII und BamHI geschnitten, was zur Deletion der vorderen Genbereiche inklusive der für die Transitsequenz kodierenden Region führte. Nach Elution der gewünschten Schnittfragmente aus einem Agarosegel wurde das vordere Genfragment von *TsMo* an den verbleibenden Teil des Spinat-Genfragmentes (kodierende Region des reifen Spinat-Proteins) fusioniert. Die Insertion führte zu einem Austausch der ersten 82 Aminosäuren des reifen Spinat-Proteins gegen die ersten 77 AS des *Odontella*-Proteins.

Alle Konstrukte sowie Zwischenprodukte wurden zur Kontrolle sequenziert.

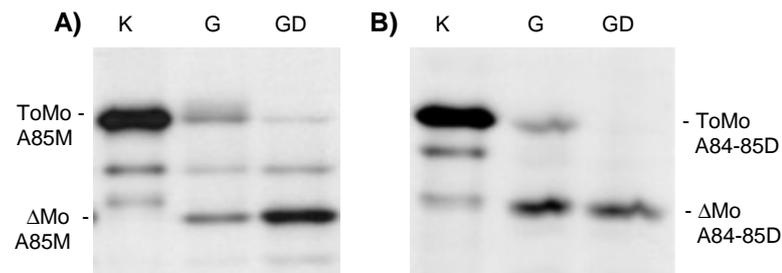


Abbildung 3 - 6 Untersuchungen zur Eliminierung der neuen Prozessierungsstelle in der g-Untereinheit aus *Odontella* in Erbsen-Plastiden

Posttranslationale Importexperimente mit dem ToMoA84M- (A) und ToMoA84-85D-Protein (B) in Erbsen-Plastiden. Autoradiographie der radioaktiv markierten Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung im SDS-PAA-Gel. K: Translationsansatz zur Kontrolle, Gesamtimportansatz nach Percollaufreinigung mit (GD) oder ohne (G) vorheriger Proteasebehandlung.

3.2.2.2. Untersuchung zur Prozessierung der γ -Untereinheit der ATPase

Wie der Transport der γ -Untereinheit in die Erbsen-Plastiden zeigt, führt die Prozessierung des Diatomeen-Proteins nicht zu der Bildung des ungefähr 35 kDa großen Proteins, sondern zu einem ca. 3 kDa kleineren Protein (32 kDa). Mit zeitabhängigen Experimenten sollte die Frage geklärt werden, ob für die γ -Untereinheit zuerst eine Prozessierung zum reifen Protein (Mo) und erst anschließend eine zu der beobachteten verkleinerten Form (Δ Mo) vorliegt (sequentielle Prozessierung).

Wie Abb. 3-5A zeigt, ist ein Import in die Plastiden schon nach einer Inkubation des radioaktiv markierten ToMo-Proteins im Translationsansatz mit den Plastiden von zwei Minuten erkennbar. Es konnte nur eine direkte Zunahme von stärker verkürztem ToMo-Protein beobachtet werden. Die Bildung von reifem atpC-Protein und eine zeitlich versetzte Zunahme an der verkleinerten Form (Δ Mo) war nicht zu erkennen. Dies deutet auf eine einmalige Reifung des Proteins an der zusätzlichen Prozessierungsstelle hin. Eine schnelle sequentielle Spaltung (< 2 min.) kann jedoch nicht ausgeschlossen werden.

Die derzeit bekannten kernkodierte Plastiden-Proteine aus *Odontella* besitzen an Position -1 ein Methionin in der Prozessierungsstelle. Um zu untersuchen, ob die originäre Prozessierungsstelle der γ -UE durch die stromale Transitpeptidase überhaupt erkannt wird, wurde das Methionin gegen ein Cystein ausgetauscht. Abb. 3-5B zeigt das Importverhalten des ToMoIVC-Konstruktes in Plastiden von Erbsen. Nach proteolytischer Degradation externer, nicht importierter Proteine zeigt sich eine intensive Bande auf Höhe des 32 kDa-Proteins. Zusätzlich ist eine geringe Spur von reifem Protein (35 kDa) zu beobachten (Spur G, GD), was auf eine Erkennung der Schnittstelle hindeutet.

Die Deletion der zusätzlichen Schnittstelle im reifen Diatomeen-Protein führt jedoch nicht zur verstärkten Erkennung der originären Diatomeen-Prozessierungsstelle. Bei Inkubation des ToMo Δ 80-89-Proteins mit Erbsen-Plastiden zeigte sich keine Bildung eines 32-kDa-Produktes (Abb. 3-5C). Jedoch ist reifes und auch unprozessiertes Protein nach gelelektrophoretischer Auftrennung im Plastid zu beobachten.

Zur Überprüfung, ob es sich hierbei auch nach der Reisolation der Plastiden über eine Percollstufe um importiertes Protein handelt, wurden die Proben bis zu 1 Std. mit Protease (Thermolysin 0,2 mg/ml) behandelt. Wie Abb. 3-5C exemplarisch an einer 45-minütigen Behandlung zeigt, erweist sich das reife bzw. unprozessierte Protein gegenüber Proteasen als stabil.

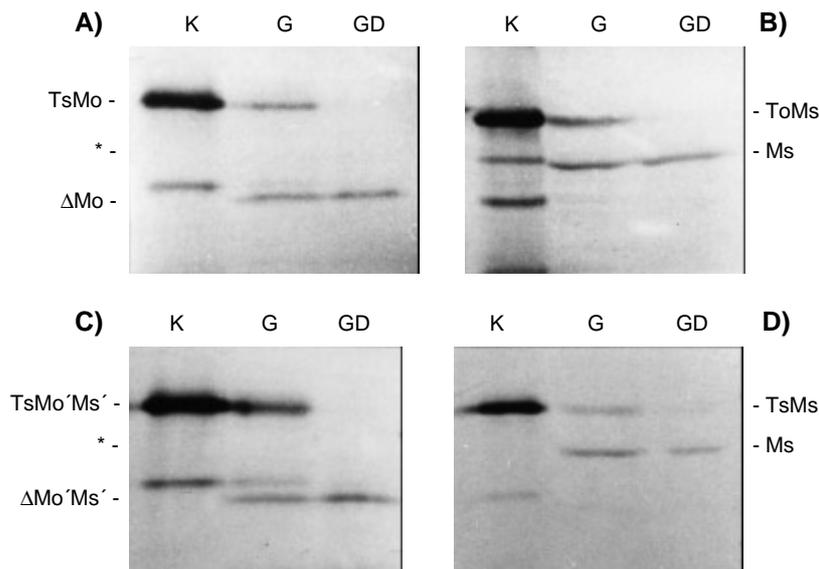


Abbildung 3 - 7 Untersuchung von chimären Proteinen der g-Untereinheit der ATPase von *Odontella* und Spinat in Erbsen-Plastiden

Translokation von Fusionsproteinen aus der γ -UE der ATPase aus *Odontella sinensis* und Spinat in Plastiden von Erbsen. Import vom TsMo- (A), vom ToMs- (B) und vom TsMo'Ms'-Protein (C) sowie von der Spinat- γ -UE TsMs (D) (Transitsequenz, „mature“ reifes Protein bzw. Teile des reifen Proteins (M') von *Odontella* oder Spinat). (A-D) Autoradiographie der radioaktiv markierten Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung im SDS-PAA-Gel. K: Translationsansatz, Gesamtimportansatz nach Percollaufreinigung mit (GD) oder ohne (G) vorheriger Proteasebehandlung, (*): ungefähre Laufhöhe des korrekt prozessierten Proteins (A, C).

Eine Bestätigung für eine fehlende Erkennung der originären Schnittstelle in Erbsen-Plastiden zeigen die Translokationsexperimente für die Konstrukte ToMoA84-85D und ToMoA85M. Wie in den Spuren G und GD zu erkennen ist, weisen beide eine starke, Protease-resistente Δ Mo-Bande auf (Abb. 3-6A,B), wobei Δ MoA84-85D minimal größer erscheint.

Die Spaltung zum kleineren Importprodukt (32 kDa) liegt nicht in der Diatomeen-Transitsequenz begründet. Wie Abb. 3-7D zeigt, führt der Import von TsMs (atpC-Protein von Spinat) in Erbsen-Plastiden bzw. Spinat-Plastiden (nicht gezeigt) zur Bildung des reifen, ungefähr 35 kDa großen Spinat-atpC-Proteins (Ms).

Ein Protease-resistentes 35 kDa-Protein findet sich ebenfalls in Importexperimenten vom ToMs-Protein (Abb. 3-7B), welches die Transitsequenz von *Odontella* und das reife Protein von Spinat besitzt. Eine zusätzliche Prozessierung der stromalen Transitpeptidase, ausgelöst durch die *Odontella*-Transitsequenz, ist nicht zu erkennen.

Im Gegensatz dazu zeigt das Kreuzkonstrukt TsMo, welches die Transitsequenz von Spinat und das reife Protein von *Odontella* besitzt, keinerlei Spaltung zum reifen *Odontella*-atpC-Protein (Abb. 3-7A *). Wie auch beim Import vom *Odontella*-Intermediat (ToMo) ist das Fehlprozessierungsprodukt von 32 kDa (Δ Mo) zu beobachten. Der Import von TsMo und ToMs in die Erbsen-Plastiden deutet an, daß die Diatomeen-Transitsequenz in Erbsen vollständig erkannt werden kann und die stärkere Prozessierung im reifen Protein begründet liegt.

Bestätigt wird dieses Ergebnis durch das Fusionsprodukt TsMo'Ms' (Abb. 3-7C). Der Import des translatierten Konstruktes führt wie bei der Untersuchung von TsMo zu einem ca. 32-kDa großen, importierten Δ Mo'Ms'-Endprodukt.

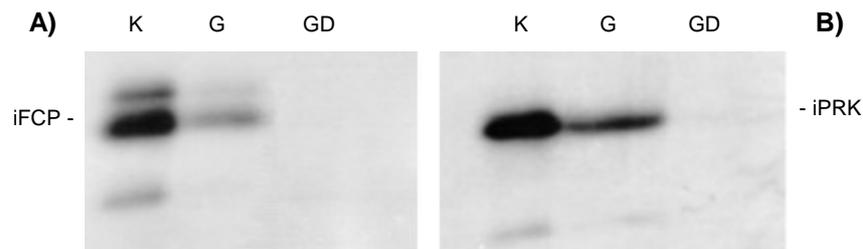


Abbildung 3 - 8 Posttranslationales Importexperiment von iFCP und iPRK mit Erbsen-Plastiden

Inkubation von intermediärem FCP- (A) oder PRK-Protein (B) aus *Odontella sinensis* mit Plastiden von Erbsen. (A,B) Autoradiographie der radioaktiv markierten Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung im SDS-PAA-Gel., K: Translationsansatz (Kontrolle), Gesamtimportansatz nach Percollaufreinigung ohne (G) bzw. mit (GD) nachfolgender Proteasebehandlung (Thermolysin 0,2 mg/ml, 30 min., 4°C).

Dies deutet darauf hin, daß die Prozessierung durch sequentielle oder strukturelle Unterschiede zwischen den beide atpC-Proteinen im Bereich der ersten 77 AS des reifen Kiesalgen-Proteins ausgelöst wird sowie der C-terminale Bereich (ab der 77. AS) des reifen Proteins und die Transitsequenz alleine nicht an dieser Spaltung beteiligt sind.

3.2.3. Posttranslationale Importversuche mit FCP- und PRK-Protein in Erbsen-Chloroplasten

Die γ -UE der ATPase zeigt von allen drei kernkodierte Plastiden-Proteinen aus *Odontella* die längste Transitsequenz von 40 Aminosäuren. Diese erlaubt, wie in Kap. 3.2.1. gezeigt, einen Import in die Plastiden von höheren Pflanzen. Das pPRK-Protein besitzt hingegen eine Transitsequenz von 25 AS und pFCP-Protein eine von nur 15 AS. Zur Untersuchung der Fragestellung, ob auch diese kürzeren Transportdomänen einen heterologen Import in die Erbsen-Plastiden erlauben, wurden von den Proteinen Intermediat-Formen ohne Signalsequenz erstellt und mit den Plastiden inkubiert.

3.2.3.1. Konstrukterstellung

Für die Untersuchung des FCP-Proteins wurden intermediäre Transportformen, ohne die Signalsequenz, erstellt. Das Genkonstrukt für das iFCP-Protein (i = Intermediatform) wurde mittels Kreis-PCR vom *fcp*-Gen (in sp73-Vektor) mit den Primern iFCP1 und iFCP2 hergestellt (Primer siehe Kap. 2.2.4.4.). Beide Primer wie auch der Vektor enthielten eine ClaI-Schnittstelle. Durch Inkubation mit ClaI wurde der kodierende Bereich der Signalsequenz deletiert und nach intramolekularer Ligation anschließend das Konstrukt zur Kontrolle sequenziert. Durch den Primer iFCP1 wurde die Aminosäure Phenylalanin an Position 16 durch ein Methionin als Translationsstartpunkt ausgetauscht (FCP Δ 1-15 F16M) (Abb. 3-1). Die Orientierung des Fragments verläuft in Sp6-Promoterrichtung.

Die Erstellung der Intermediatform der pPRK (iPRK) ist im Kapitel 3.1.1 beschrieben (Abb. 3-1).

3.2.3.2. Versuche zum Proteintransport von iFCP und pFCP

Die Inkubation der beiden Intermediatproteine iFCP und iPRK mit Plastiden aus höheren Pflanzen zeigt in allen Fällen keinen erkennbaren Import (Abb. 3-8). Detektierbares iPRK- und iFCP-Protein im PAA-Gel nach der Aufreinigung der Plastiden über einen Percollgradienten (Abb. 3-8A/B Spur G) könnte möglicherweise auf eine Bindung der kurzen Transitsequenzen an die Plastidenhüllmembran bzw. den Toc-Rezeptor von Erbsen hinweisen. In diesem Fall wäre eine Störung der nachfolgenden Transportschritte durch die Struktur oder die Länge der kurzen Diatomeen-Transitsequenz zu vermuten.

3.3. Untersuchung des plastidären Proteintransportes von Kieselalgen *in vivo*

3.3.1. Gentechnische Veränderung der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum*

In Zusammenarbeit von Dr. Kirk Apt, Martek Corporation, und unserer Arbeitsgruppe wurde ein Transformationssystem für die kleine Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* entwickelt (Apt et al. 1996; Zaslavskaja et al. 2000). Die Transformationsmethodik und die Sichtung der transformierten Algen auf den Antibiotika-haltigen Seewasser-Agar-Platten sind in Kapitel 2.12 beschrieben. Als Sichtungsmarker wurde das Gen für die Bleomycin-Resistenz (*sh ble*) aus dem Streptomyceten *Streptoalloteichus hindustanus* verwendet, welches auch gegen das Antibiotika Zeocin, ein Phleomycin-Derivat, schützt. Als Terminatoren und Promotoren für die Resistenz und für die Fusionsgene wurden die entsprechenden Regionen des *fcpA*-Gens aus *Phaeodactylum* verwendet. Der verwendete *Phaeodactylum*-Transformationsvektor (PTV) wurde von Dr. Apt bereitgestellt.

Zur *in-vivo*-Untersuchung des Proteintransportes wurden von kernkodierten Plastiden-Proteinen sowohl verschiedene Transportsequenzen als auch Teile derselben mit dem Reportergen „Green-fluorescent-protein“ (GFP) fusioniert. Alle Konstrukte wurden mit „high precision“-Polymerasen, DNA-Replikasen mit geringer Fehlerrate, in der PCR-Reaktion erzeugt, anschließend im Agarosegel aufgereinigt und danach eluiert. Die PCR-Produkte und bei Verwendung einer der Klonierungskassetten, das endgültige Konstrukt, wurden abschließend mit EcoRI und HindIII in den Algen-Transformationsvektor (PTV) kloniert. Alle Genkonstrukte wurden zur Kontrolle sequenziert.

Die Sequenzen der Primer sind im „Material und Methoden“-Teil aufgeführt (Kap. 2.2.4.4.).

3.3.1.1. Erstellung homologer Genkonstrukte zur Transformation von *Phaeodactylum tricornutum*

Die erste Frage, die sich für die *in-vivo*-Untersuchung des Proteintransportes in die Kieselalgen-Plastiden stellte, war, ob sich innerhalb der verschiedenen Diatomeen-Transitsequenzen eine für den Transport essentielle Region finden läßt. Zu diesem Zweck wurden von der *atpC*-Transportsequenz aus *Phaeodactylum tricornutum* 5 verschieden lange Bereiche an den N-Terminus des GFP-Proteins fusioniert. Zur Erstellung der dafür notwendigen Gene mittels Fusions-PCR (Kap. 2.2.4.3.) wurden die Primer *atpC*-Nter und eGFP-Cter-H3 bzw. GFP-DDEL sowie die im nachfolgenden aufgeführten Fusionsprimer verwendet. Als DNA-Vorlage diente das *egfp*-Gen und das *atpC*-Gen aus *Phaeodactylum tricornutum*. Die Endprimer führten am 5'-Ende des Konstruktes eine EcoRI (*atpC*-Nter) und am 3'-Ende eine HindIII-Schnittstelle (eGFP-Cter-H3, GFP-DDEL) für die Klonierung in den Transformationsvektor ein. Je nach Kombination der Endprimer entstanden bei der Expression Fusionsproteine mit bzw. ohne dem ER-Retentionssignal (-DDEL) vom ER-luminalen BiP-Protein aus *Phaeodactylum tricornutum* (Abb. 3-9). Bis auf das *atpC5GFP*-Protein weisen alle verbleibenden Proteinkonstrukte nicht mehr die originale Prozessierungsstelle der Transitsequenz auf. Die Prozessierungsstelle der Signalsequenz wurde jedoch bei allen Konstrukten erhalten.

Die Fusionsproteine **atpC2GFP** bzw. **atpC2GFP-DDEL** beinhalten den kürzesten Transportsequenzbereich mit der Signalsequenz und den ersten vier Aminosäuren der Transitsequenz. Für die Herstellung des *atpC2GFP*-Genkonstruktes wurde der Fusionsprimer *atpC2GFP* verwendet.

Die Proteinkonstrukte **atpC1GFP** und **atpC1GFP-DDEL** (Fusionsprimer *atpC1GFP*) umfassen die Signalsequenz und die ersten fünfzehn N-terminalen Aminosäuren.



Abbildung 3 - 9 Schematische Darstellung der *Phaeodactylum*-Transformationskonstrukte

Illustration von GFP-Fusionsproteinen mit teilweise modifizierten Transportsequenzen aus *Phaeodactylum tricornutum*. atpC: γ -UE der ATPase (*Phaeodactylum tricornutum*) (AccNo. U29898), FCP: Fucoxanthin-chlorophyll-a,c-bindendes Protein (*Phaeodactylum tricornutum*) (Bhaya und Grossman 1993), DDEL: ER-Retentionssignal (DDEL) vom BiP-Protein (*Phaeodactylum tricornutum*) (AccNo. U29675). Signalsequenzen sind rot, Transitsequenzen sind grün, das GFP ist hellgrün dargestellt. Die stark verkürzt dargestellten reifen Proteine sind gelb unterlegt. Hydroxylierte Aminosäuren innerhalb der Transitsequenz sind mit der Farbe Weiß geschrieben.

Die Varianten **atpC3GFP** und **atpC3GFP-DDEL** (Fusionsprimer atpC3GFP) besitzen die Signalsequenz und die ersten 23 N-terminalen Aminosäuren.

Für die Herstellung der Gene für die Proteine **atpC4GFP** und **atpC4GFP-DDEL** wurde der Primer atpC4GFP benutzt, der den kodierenden Genbereich für die Signalsequenz und die ersten 29 N-terminalen Aminosäuren an das *gfp*-Gen fusioniert.

Als „Vollängen“-Protein wurde das Fusionsprotein **atpC5GFP** (Fusionsprimer atpC5GFP) erstellt. Es beinhaltet die gesamte Präsequenz und die erste Aminosäure des reifen Proteins (Asparaginsäure). Das Startmethionin des GFP-Proteins wurde bei der PCR deletiert.

Im weiteren wurden von den vier größeren *atpCGFP*-Genkonstrukten (*atpC1*-, *atpC3*-, *atpC4*-, *atpC5GFP*) zusätzlich Gene ohne den Signalsequenz-kodierenden Bereich hergestellt. Ziel war es, die entsprechenden Proteine (**iatpC1**-, **iatpC3**-, **iatpC4**-, **iatpC5GFP**) *in vitro* in Erbsen-Plastiden zu importieren. Die Berechnung der Signalsequenz-Prozessierungsstelle des atpC-Proteins mit dem Programm SignalP (V1.1) weist auf eine Reifung zwischen Position 15 und 16 im Vorläuferprotein hin. Nach der PCR-Reaktion mit den Primern iatpC-Phaeo und eGFP-Cter-H3 von den *atpCGFP*-Genkonstrukten wurden die Fragmente mit EcoRI und HindIII geschnitten, im Agarosegel aufgetrennt und in vorbereiteten sp73-Vektor in Sp6-Promoterrichtung ligiert. Der Primer iatpC-Phaeo beinhaltet das neue Startkodon (Pos. 16 F→M, im Primer fett gedruckt).

Ebenso wie für die Transitsequenz der γ -Untereinheit stellte sich für die kleinere Transitsequenz des FCP-Proteins die Frage, welche Bereiche der Transportsequenz für den Import in die Plastiden notwendig sind.

Die Verkürzungen der FCP-Transportsequenz wurden per Fusion-PCR vom *FCPGFP*-Genkonstrukt erzeugt (Abb. 3-9). Die verwendeten Endprimer fcp-Nter und eGFP-Cter-H3 enthielten zur Klonierung der Gene eine EcoRI (fcp-Nter) und eine HindIII-Erkennungsstelle (eGFP-Cter-H3). Das *FCPGFP*-Gen wurde von Dr. Kirk Apt bereitgestellt.

Das **FCPGFP**-Protein beinhaltet die vollständige Präsequenz des Diatomeen-LHC-Proteins von *Phaeodactylum tricorutum* einschließlich der ersten fünf Aminosäuren des reifen Proteins. Das Fusionsprotein **FCP2GFP** (Fusionsprimer Fcp2GFP) besitzt eine Deletion des C-terminalen Teils der Transitsequenz (achte Aminosäure bis Ende der Transitsequenz), während **FCP3GFP** (Fusionsprimer Fcp3GFP) den N-terminalen Teil deletiert hat (erste bis achte Aminosäure).

Das *BipGFP*-Gen wurde von Dr. Apt bereitgestellt (**BiPGFP**). Das Gen beinhaltet den kodierenden Bereich für die Signalsequenz des ER-Chaperons BiP. An das *BiPGFP*-Konstrukt wurde mittels des GFP-DDEL-Primers und des BiP-Nter-Primers in einer Standard-PCR zudem das BiP-eigene ER-Retentionssignal DDEL fusioniert (*BiPGFP-DDEL*). Nach Harter und Wieland (1996) wird das BiP-Protein durch das Signal über den COPI-Weg mit dem Retentionssignal wieder in das ER zurücktransportiert und nicht sekretiert.

3.3.1.2. Erstellung heterologer Genkonstrukte zur Transformation von *Phaeodactylum tricorutum*

Um eine mögliche Verwandtschaft der Proteintransportsysteme von verschiedenen Pflanzen- bzw. Algengruppen zu untersuchen, wurde zuerst aus der zentrischen Kieselalge *Odontella sinensis* ein Teil (**PRK2GFP**) und die gesamte Präsequenz (**PRK1GFP**) der Phosphoribulokinase (PRK) an das GFP fusioniert. Das PRK2GFP-Fusionsprotein besteht aus der Signalsequenz der PRK und aus dem C-terminalen Bereich der Transitsequenz (Abb. 3-10).

Für die Fusions-PCRs wurden als 5'-Endprimer das Oligonukleotid Prk-Nter (EcoRI), der Fusionsprimer Prk2GFP für das *PRK2GFP*-Genkonstrukt bzw. Prk1GFP für das *PRK1GFP*-Gen und als 3'-Endprimer das eGFP-Cter-H3 (HindIII) verwendet. Als DNA-Vorlagen dienten das *gfp*-Gen und das *prk*-Gen aus *Odontella sinensis*. Die Klonierung des Fragmentes erfolgte analog der *atpC*- bzw. *fcp*-Genkonstrukte.

Zur Untersuchung der Transportsequenzen von höheren Pflanzen wurden im pBluescript KS-Vektor zwei Klonierungskassetten mit dem kodierenden Bereich für eine Signalsequenz und der GFP-Sequenz erstellt. Die beiden entsprechenden Genbereiche sind mittels einer NcoI-Schnittstelle verbunden, welche zur Einklonierung von Transitsequenzen genutzt werden kann. Als Signalsequenzen wurde einerseits die *atpC*-Signalsequenz aus *Phaeodactylum tricorutum* und andererseits die Signalsequenz von Präprolactin (ppL) aus Rindern verwendet.

Der Genbereich der *atpC*-Signalsequenz wurde mittels Standard-PCR aus dem *atpC*-Gen von *Phaeodactylum* amplifiziert. Als Primer wurde das *atpC*-Nter-Oligonukleotid und der Primer SatpC-NcoI genutzt. Das mit EcoRI und NcoI geschnittene PCR-Fragment wurde nach Gelelektion in identisch geschnittenes *egfp*-pBluescript KS zur Bildung der *SatpCGFP*-Klonierungskassette inkloniert (*SatpCGFP*-pBluescript). Das *egfp*-Gen wurde von Dr. Apt, Martek Corporation, im originalen Vektorsystem (Stratagene) bereitgestellt und mit EcoRI und HindIII in pBluescript KS überführt. Für die Fusion der Genfragmente wurde die natürlich vorkommende NcoI-Schnittstelle direkt am Startkodon verwendet (eGFP wird im weiteren auch synonym bezeichnet auch als GFP)

Um den Genbereich der Signalsequenz des Präprolactin-Proteins zur Erstellung der SpplGFP-Klonierungskassette zu amplifizieren, wurde zunächst das gesamte Gen in einen bekannten Vektor (pBluescript KS) mit definierten Schnittstellen (EcoRI, HindIII) überführt. Für die Standard-PCR wurden die Primer ppL-EcoRI (Gen-Anfang) und ppL-HindIII (Gen-Ende) verwendet. Anschließend wurde über eine Kreis-PCR (Kap. 2.4.2) der Genbereich für das reife Protein deletiert und gleichzeitig eine NcoI-Schnittstelle hinter den Signalsequenzbereich eingefügt (Primer Sppl-NcoI-2 und Sppl-HindIII-2 (Bindung vor HindIII-Stelle)). Nach dem Verdau des PCR-Produktes mit den Enzymen NcoI und HindIII konnte ein mit den identischen Enzymen geschnittenes *gfp*-Gen (*egfp*-pBluescript) in das PCR-Fragment kloniert werden (= *SppLGFP*-pBluescript)..

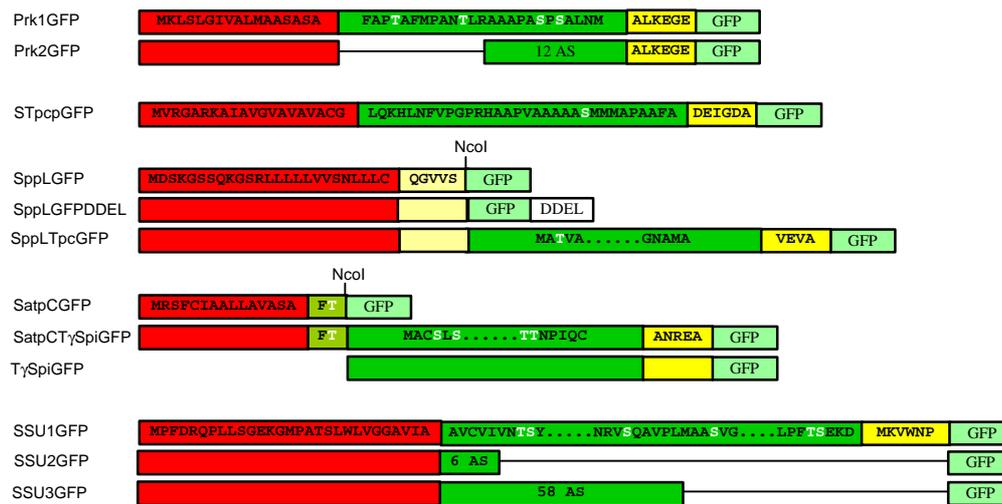


Abbildung 3 - 10 Schematische Darstellung der heterologen GFP-Fusionskonstrukte

Illustration von GFP-Fusionsproteinen mit kombinierten, teilweise modifizierten Transportsequenzen aus unterschiedlichen Organismen. PRK: Phosphoribulokinase (*Odontella sinensis*) (AccNo. Y08610), PCP: Peridinin-Chlorophyll-c-bindendes Protein (*Symbiodinium spec.*) (Norris und Miller 1994), PCP: Peridinin-Chlorophyll-c-bindendes Protein (*Symbiodinium spec.*) (Norris und Miller 1994), PPL: Präprolactin (*Bos taurus*) (AccNo. J00022, V00112), PC: Plastocyanin (Spinat) (Rother et al. 1986), atpC: γ -UE ATPase (*Phaeodactylum tricorutum*) (AccNo. U29898), γ -Spi: γ -UE ATPase (Spinat) (Mason und Whitfeld 1990), SSU: kleine UE der Rubisco (*Euglena gracilis*) (Tessier et al. 1995), S: Signalsequenz, T: Transitsequenz. Signalsequenzen sind rot, Transitsequenzen sind grün bzw. gelb-grün, das GFP ist hellgrün und gelb sind Aminosäuren des reifen Proteins unterlegt. Hydroxylierte Aminosäuren innerhalb der Transitsequenz sind weiß dargestellt.

Das nach Expression resultierende SppLGFP-Proteinkonstrukt besitzt neben der Signalsequenz die ersten fünf Aminosäuren des reifen Proteins. Mit dem Überhang an reifen Protein wurde erreicht, daß die Prozessierungsregion der Signalsequenz erhalten blieb.

In die *SatpCGFP*-Klonierungskassette (*SatpCGFP*-pBluescript) wurde der Genbereich für die Transitsequenz des atpC-Proteins aus Spinat kloniert (*SatpCT γ spiGFP*-pBluescript). Die kodierende Region der atpC-Transitsequenz aus Spinat wurde über eine Standard-PCR mit den Primern SppLTspi-NcoI und Tspi-NcoI amplifiziert, anschließend mit NcoI geschnitten und in die identisch geschnittene *SatpCGFP*-Klonierungskassette kloniert

Als Kontrolle für das Importverhalten vom SatpCT γ spiGFP-Protein in den Transformanden wurde zudem die Transitsequenz direkt an das GFP fusioniert (*T γ spiGFP*-Protein). Für die Amplifikation der kodierenden atpC-Transitsequenz-Region wurden die Primer Tspi-EcoRI als Anfangsprimer und Tspi-NcoI als Endprimer verwendet. Nach dem Verdau des PCR-Fragmentes mit EcoRI und NcoI wurde das aufgereinigte Fragmente in entsprechend geschnittenen und gereinigten *egfp*-pBluescript kloniert.

In die *SppLGFP*-Klonierungskassette wurde der Genbereich für die gesamte Präsequenz des thylakoidalen Lumen-Proteins Plastocyanin (Spinat) inklusive der ersten vier Aminosäuren des reifen Proteins kloniert. Die Transitsequenz wurde mit den beiden Endprimern Tpc-NcoI-1 und Tpc-NcoI-2 amplifiziert und nach dem Verdau mit NcoI in die identisch geschnittene *SppLGFP*-Kassette kloniert (= *SppLTpcGFP*-pBluescript).

Die Gene *SppLTpcGFP*, *T γ spiGFP* und *SatpCT γ spiGFP* wurden anschließend aus dem pBluescript-Vektor herausgeschnitten und in den Algen-Transformationsvektor (PTV) kloniert.

Die Transportsequenzen der kleinen Untereinheit der Rubisco vom Euglenophyten *Euglena gracilis* und dem PCP-Protein vom Dinoflagellaten *Symbiodinium spec.* wurden mittels PCR direkt an das GFP fusioniert (Abb. 3-10).

Für die PCR vom Gen des Peridinin-Chlorophyll-a-bindenden Protein (PCP) (Norris und Miller 1994) wurde der Anfangsprimer STpcp-EcoRI (Startkodon und Umgebung nach Kozak 1983) und das Oligonukleotid STpcp-NcoI verwendet. Das *egfp*-Gen (in pBluescript KS) und das PCR-Fragment wurden jeweils beide mit EcoRI und NcoI gedaut und miteinander ligiert (= *STpcpGFP*-pBluescript).

Das *STpcpGFP*-Konstrukt beinhaltet den kodierenden Bereich der gesamte zweigeteilten Dinoflagellaten-Transportsequenz von Signal- und möglicherweise Transitsequenz-artiger Domäne.

Von der kleinen UE der Rubisco aus *Euglena gracilis* (SSU) wurden zwei verschiedene Konstrukte erstellt. Das Gen *SSUIGFP* führt zur Expression der gesamten Transportsequenz sowie der ersten sechs Aminosäuren des reifen Proteins fusioniert an GFP.

Der gesamte Genbereich der Präsequenz wurde mit dem Primer STssu-Nter (EcoRI-Schnittstelle) und dem Oligomer STssu/Tssu-NcoI (NcoI-Schnittstelle) in einer PCR-Amplifikation vom *pSSUnitIGFP*-pet28-Konstrukt amplifiziert und nach anschließender Inkubation mit EcoRI und NcoI vor geschnittenes *egfp*-pBluescript ligiert (= *SSUIGFP*-pBluescript). Das Originalkonstrukt *pSSUnitIGFP*-pet28 wurde freundlicherweise von Prof. Schwartzbach (University of Nebraska, USA) zur Verfügung gestellt.

Das *SSU3GFP*-Protein besitzt von der Euglenophyten-Transportregion die Signalsequenz und zusätzlich noch die N-terminale Hälfte der Transitsequenz. Das entsprechende Gen-Konstrukt wurde in einer zweistufigen PCR von *pSSUnitIGFP*-pet28-Konstrukt und anschließend von *egfp*-pBluescript amplifiziert (Kap. 2.4.3). In der ersten PCR-Reaktion wurden Megaprimer mit dem Primer STssu-Nter und dem Fusionsprimer ST1/2ssuGFP hergestellt. Die Megaprimer dienen zusammen mit eGFP-Cter-H3 in der zweiten PCR-Reaktion als Endprimer (= *SSU3GFP*-pBluescript).

3.3.2. Analyse der transformierten *Phaeodactylum*-Zellen

Die beschriebenen Konstrukte wurden durch ballistische Transformation in Zellen von *Phaeodactylum tricornutum* eingebracht. Ein Teil der Konstrukte wurde von Dr. Apt, Martek Corp. (Maryland), transformiert.

Nach Sichtung der Transformanden wurden in Kooperation mit Dr. Whetherbee, University of Melbourne, und Dr. Apt die Zellen am Fluoreszenzmikroskop untersucht (Abb. 3-11). Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Zellen, die mit dem *gfp*-Gen transformiert wurden, zeigen eine cytoplasmatische Lokalisation des GFP mit einer diffusen Verteilung in der Zelle (Abb. 3-11). Das GFP-Protein liegt gehäuft im Cytoplasmabereich zwischen den Plastiden (Kernregion) vor. Die Transformation der Algen mit einer ER-determinierenden eGFP-Variante zeigt eine deutliche GFP-Fluoreszenz in scharfen Linien außerhalb der Plastiden.

Für die weitere Auswertung der verschiedenen Konstrukte wurde das „konfokale Laser-Scanning-Mikroskop“ (CLSM) der Firma Leica verwendet. Die geringe Dicke des Laserstrahls und die Fokussierung des Strahls in einem Punkt erlauben im Gegensatz zum Fluoreszenzmikroskop die Betrachtung der Fluoreszenz in dünnen Schichten innerhalb der Zellen (ab > 015 µm) und in einer Gesamtansicht der Zelle. Die gleichzeitige Detektion der Autofluoreszenz des Chlorophylls im CLSM erleichtert zudem die GFP-Lokalisation im Plastid. Die Fluoreszenz des GFP liegt nach Anregung im grünen und die der Chlorophyllfluoreszenz im roten Bereich. Innerhalb der gezeigten Bildern wird neben den einzelnen Fluoreszenzaufnahmen eine Überlagerung beider Kanäle dargestellt. Für einige Aufnahmen wurde zudem eine inverse Farbdarstellung zur besseren Verdeutlichung der Lokalisation gewählt. Im Anhang sind exemplarisch Aufnahmen von Zellen in mehreren Schnittebenen zu sehen.

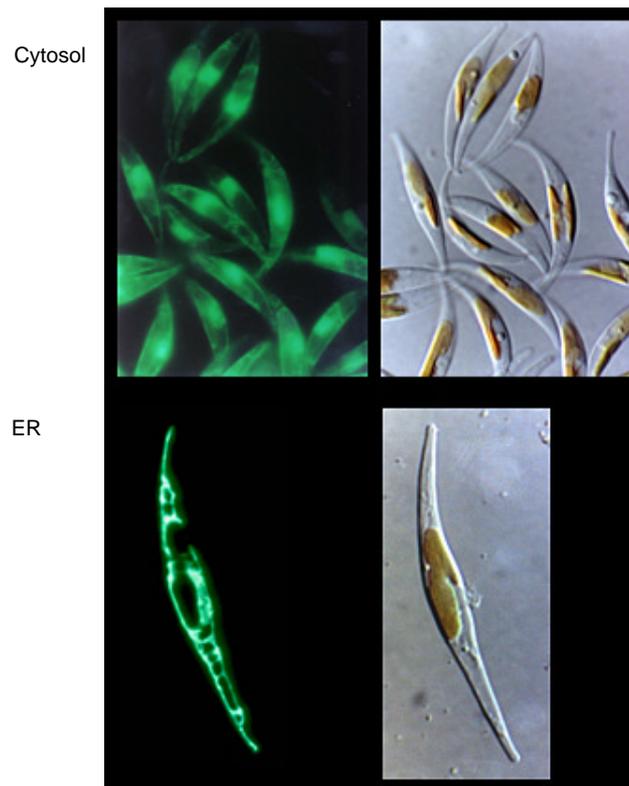


Abbildung 3 - 11 Fluoreszenzaufnahmen verschiedener *Phaeodactylum*-Transformanten

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von unterschiedlichen Transformanten zur Lokalisation des GFP-Proteins im Cytosol (t-GFP) und ER (t-BiPGFP). Vergleich der Fluoreszenz- (links) mit Lichtmikroskopaufnahmen (rechts). (Aufnahmen durch Dr. Apt)

Zur sprachlichen Vereinfachung sind im nachfolgenden die Transformanten eines Genkonstruktes mit einem kleinen „t“ vor dem Konstruktnamen bezeichnet (z.B. Transformanten mit dem *gfp*-Gen = t-eGFP).

3.3.2.1. BiPGFP-, BiPGFP-DDEL- und GFP-Transformanten

CLSM-Untersuchung der Transformanten t-BiPGFP und t-BiPGFP-DDEL zeigen eine deutliche, scharfe Verästelung der GFP-Fluoreszenz innerhalb der Zelle, was auf eine Lokalisation des GFP im ER schließen lässt (Abb. 3-12). In Abb. 3-12B ist bei t-BiPGFP-DDEL zudem deutlich eine kreisrunde GFP-Markierung, vermutlich der Intermembranraum der Kernmembran, zu erkennen. Die N-terminale Sequenzierung des BiPGFP-Proteins, isoliert aus den Transformanten, zeigt eine Prozessierung der Signalsequenz hinter dem Motiv IRA (MMFMRIAVAALALLAAPSIRA*EEAGEEAK) (Dr. Apt, pers. Mitteilung) und unterstützt damit den beobachteten Transport in das ER.

Entgegen der ER-Lokalisation von BiPGFP zeigt die Transformation mit dem *gfp*-Gen ohne eine Transportsequenz nach der Expression eine diffus verteilte GFP-Fluoreszenz im Cytoplasmabereich um den Kern sowie einen deutlichen Cytoplasmasaum (Abb. 3-12C).

3.3.2.2. atpC-GFP-Transformanten

Die Transformation der Alge *Phaeodactylum tricoratum* mit dem Genkonstrukt *atpC1GFP* resultiert in einer GFP-Fluoreszenz in feinen, scharfen Verästelungen innerhalb der Zelle (Abb. 3-13A). Sie ist nicht deckungsgleich mit der Chlorophyllfluoreszenz, was deutlich in Aufnahmen mit mehreren Schnittebenen zu erkennen ist (siehe Anhang).

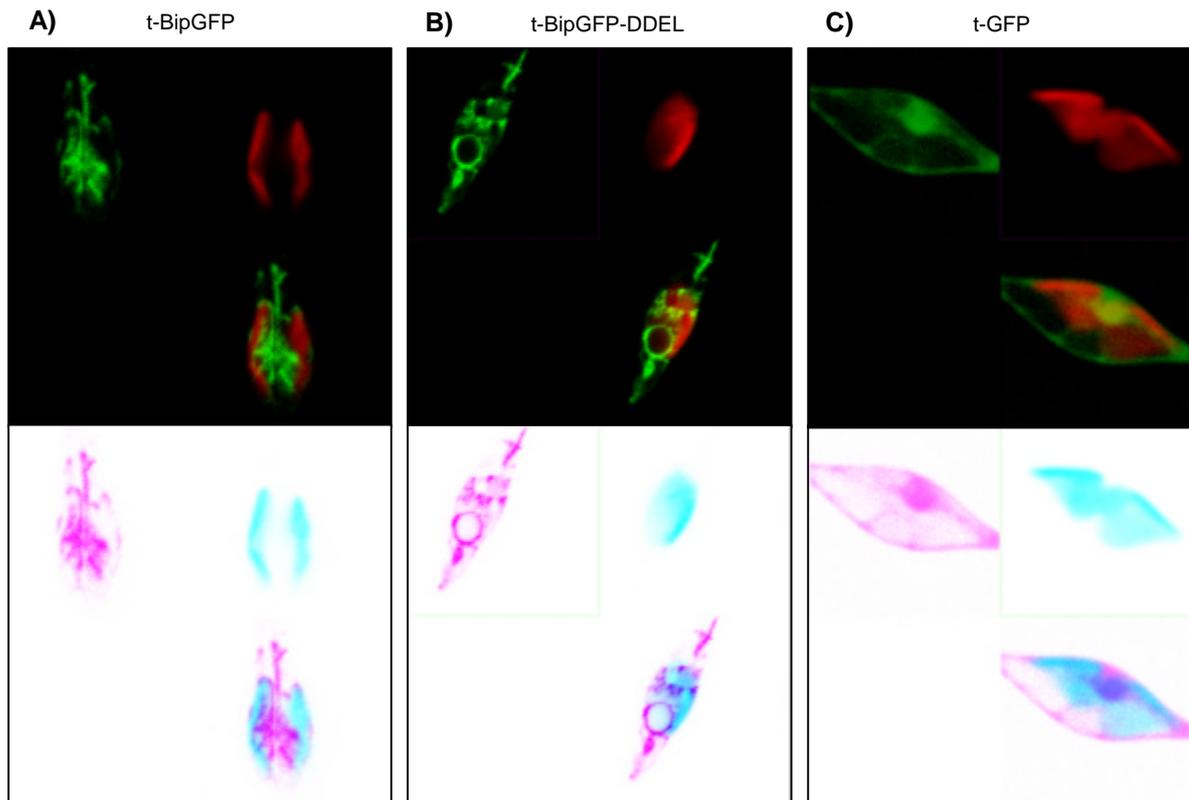


Abbildung 3 - 12 CLSM-Aufnahmen von t-GFP, t-BiPGFP und t-BiPGFP-DDEL

CLSM-Aufnahmen von *Phaeodactylum*-Transformanten, die das GFP-Protein mit der Signalsequenz des ER-Lumen-Proteins BiP, t-BiPGFP (A), sowie zusätzlich noch mit dem BiP-ER-Retentionssignal DDEL, t-BiPGFP-DDEL (B) oder ohne eine gekoppelte Transportsequenz, t-GFP (C), exprimieren. In rot ist die Autofluoreszenz der Chloroplasten und in grün die Fluoreszenz von GFP zu erkennen. Unterhalb der Fluoreszenzaufnahmen sind in Inversfarben die gleichen Aufnahmen dargestellt.

Dies weist auf eine ER-Lokalisation vermittelt durch die vorhandene Signalsequenz der γ -Untereinheit der ATPase aus *Phaeodactylum tricornutum* hin. Trotz der zusätzlichen 15 Aminosäuren der Transitsequenz ist ein weitergehender Transport in die Plastiden nicht zu beobachten. Die Fluoreszenz vom atpC1GFP-Protein ist nicht auf den Bereich um den Chloroplasten, dem CER-Bereich, alleine beschränkt.

Diese fehlende ER/CER-Unterscheidung spricht gegen eine Diskriminante innerhalb der Signalsequenz, die für den kotranslationalen Transport der Plastiden-Proteinen zwischen den beiden ER-Membranen unterscheidet.

Um zu untersuchen, ob es sich wirklich um eine Lokalisation in das ER handelt, wurde eine ER-Isolationsmethode für *Phaeodactylum tricornutum* etabliert (Kapitel 2.10). Der Aufbau einer Plastidenisolationmethode für die kleine Kieselalge war aufgrund der zum Aufbruch der Kieselschale benötigten Kräfte nicht möglich (French-Press 2000 – 3000 PSI). Die Scherung der Zellen führte automatisch zum Zerreißen der Plastiden.

Die Fraktionierung und anschließende Western-Blot-Analyse von t-atpC1GFP (Anti-GFP der Fa. Clontech bzw. Fa. Molecular Probes) belegen die Lokalisation des GFP in der 100.000 x g-Membran-Fraktion (Abb. 3-15A). Durch aufgerissenes ER während des Aufbruchs des Algenzellen kann GFP-Protein in der verbleibenden Fraktion mit löslichen Proteinen gefunden werden.

Das *in vivo* vorliegende atpC1GFP-Protein zeigt nach gelelektrophoretischer Auftrennung die gleiche Größe (29 kDa) im Proteingel wie translatiertes iatpC1GFP-Protein (Abb. 3-15A).

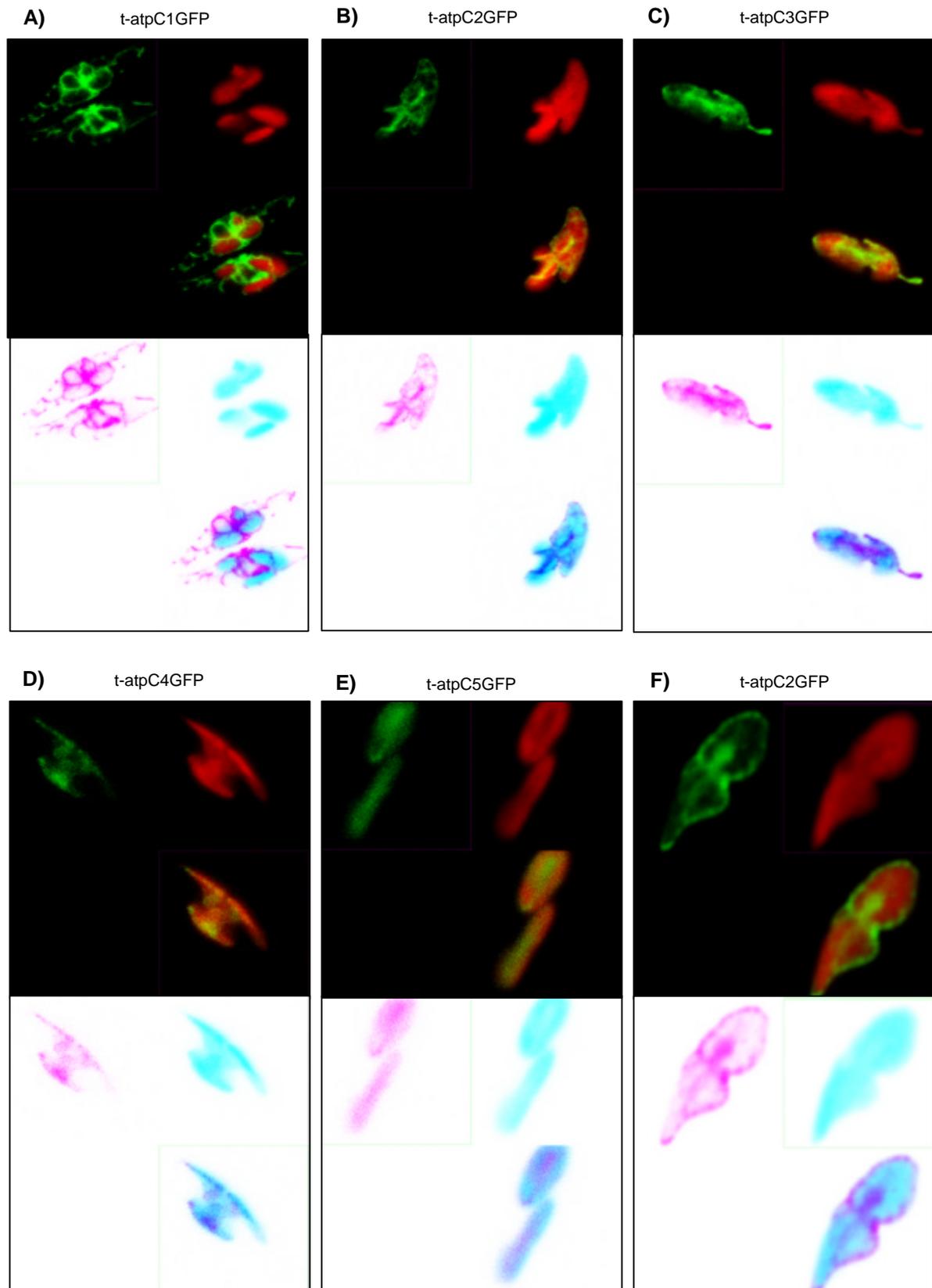


Abbildung 3 - 13 CLSM-Aufnahmen der atpCGFP-Transformanden

Aufnahmen von gentechnisch veränderten *Phaeodactylum*-Zellen, transformiert mit den Fusionsgenen *atpC1GFP* (A), *atpC2GFP* (B), *atpC3GFP* (C), *atpC4GFP* (D), *atpC5GFP* (E). (F) stellt ein Sonderfall der *atpC2GFP*-Transformanden dar. In rot ist die Autofluoreszenz der Chloroplasten und in grün ist die Fluoreszenz von GFP zu erkennen. Unterhalb der Fluoreszenzaufnahmen sind in Umkehrfarben die gleichen Aufnahmen dargestellt.

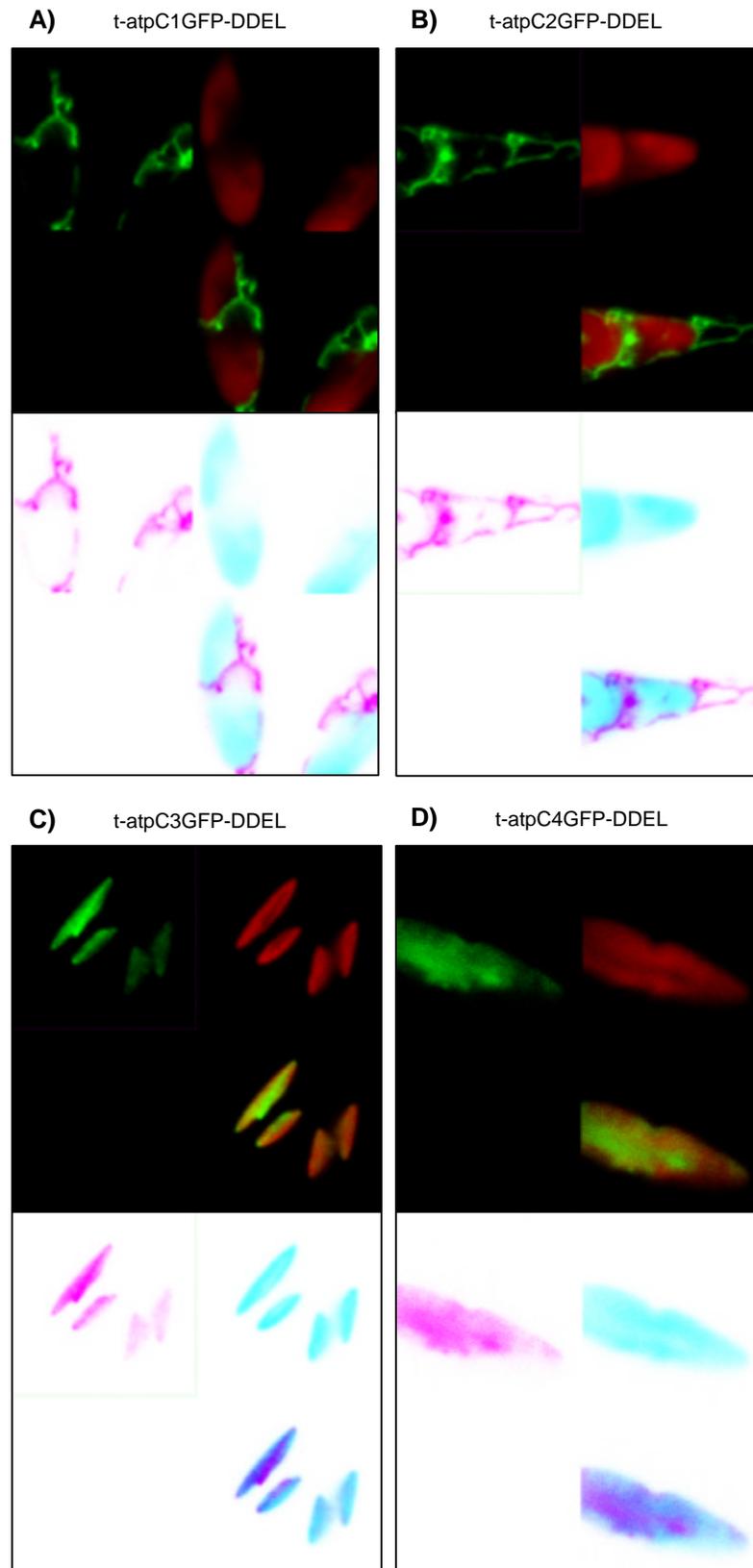


Abbildung 3 - 14 CLSM-Aufnahmen von atpCGFP-DDEL-Transformanten

Aufnahmen von gentechnisch veränderten *Phaeodactylum*-Zellen, die nach Transformation die Fusionsproteine atpC1GFP-DDEL (A), atpC2GFP-DDEL (B), atpC3GFP-DDEL (C) oder atpC4GFP-DDEL (D) exprimieren. In rot ist die Autofluoreszenz der Chloroplasten und in grün ist die Fluoreszenz von GFP zu erkennen. Unterhalb der Fluoreszenzaufnahmen sind in Umkehrfarben die gleichen Aufnahmen dargestellt.

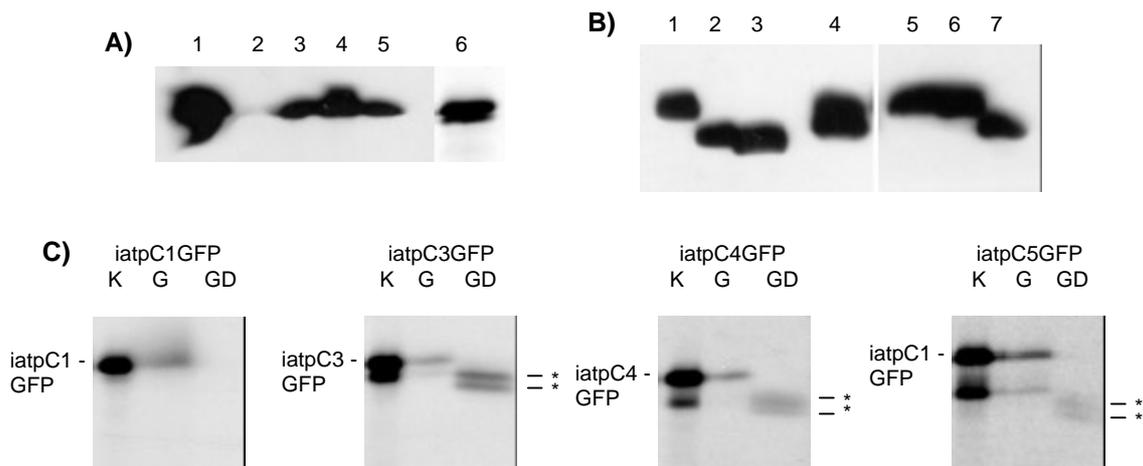


Abbildung 3 - 15 Western-Blot-Analyse der atpC-GFP-Transformanden und posttranslationale Importexperimente der verkürzten atpC-GFP-Fusionsproteine mit Erbsen-Plastiden

Analyse der Lokalisation von atpC1GFP innerhalb der Zelle (A) und Größenbestimmung der atpC-GFP-Proteine aus den Transformanden (B). Inkubation der um die Signalsequenz verkürzten atpCGFP-Proteine (iatpC1GFP, iatpC3GFP, iatpC4GFP, iatpC5GFP) mit Erbsen-Plastiden (C).

(A): Western-Blot-Analyse (Antikörper Anti-GFP, Fa. Clontech) von im SDS-PAA-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennten Fraktionen von t-atpC1GFP: Gesamtzellextrakt (1), lösliche Proteine (4) und Membranfraktion (5). Vor der Isolation der Membranfraktion wurden die Thylakoidmembranen vorab durch eine Zentrifugation mit 20.000 x g größtenteils entfernt. Als Größenkontrolle wurde *in-vitro*-translatiertes (radioaktives) iatpC1GFP aufgetragen und über Autoradiographie detektiert (6). (2, 3) Proben aus dem Versuch zur „Plastidenisolation“ aus *Phaeodactylum*: (2) Probe der „Plastiden“ führenden Percollschicht, (3) Überstand über der Percollstufe bestehend aus Zellextrakten und Thylakoiden.

(B): Elektrophoretische Auftrennung im SDS-PAA-Gel und Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen GFP (Fa. Clontech) von Gesamtzellextrakt aus (1) t-atpC1GFP, (2) t-atpC2GFP, (3) t-atpC3GFP, (4) t-atpC5GFP, sowie von (5) t-atpC1GFP-DDEL, (6) t-atpC2GFP-DDEL und (7) t-atpC3GFP-DDEL.

(C): Gesamtimportansatz nach Inkubation des Translationsansatzes (K) mit isolierten Plastiden von Erbsen ohne (G) oder mit (GD) nachträglicher Proteasebehandlung (Thermolysin 0,2 mg/ml, 30 min., 4°C). Alle Proben (G, GD) wurden anschließend über eine 40% Percollstufe aufgereinigt. Dargestellt sind die Autoradiographien der radioaktiv markierten Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem SDS-PAA-Gel.

Es besitzt im Gegensatz zum ursprünglichen atpC1GFP-Proteinkonstrukt keine Signalsequenz mehr und beginnt mit einem eingefügten Methionin an Pos. 16 (F16M). Das identische Laufverhalten der Proteine weist auf eine Prozessierung der Signalsequenz während des kotranslationalen Transportes in den Zellen hin.

Bestätigt wird dieses Ergebnis durch N-terminale Sequenzierung des atpC1GFP-Proteins isoliert aus den Transformanden (Dr. Apt, pers. Mitteilung). Die isolierten Proteine beginnen mit der Aminosäure Threonin an Pos. 17 und weisen somit auf eine Prozessierung zwischen Position 16 und 17 (MRSFCIAALLAVASAF*TTQP...).

Die Expression der längeren atpC-GFP-Konstrukte *atpC3-* bis *atpC5GFP* in den transformierten Zellen zeigen nach den CLSM-Aufnahmen eine GFP-Lokalisation in den Plastiden (Abb. 3-13). Wie t-atpC3GFP andeutet, reichen *in vivo* schon die ersten 23 N-terminalen Aminosäuren der γ -UE-Transitsequenz aus *Phaeodactylum* für einem Import in die Plastiden. Es zeigt sich kein Unterschied zu den Transformanden, welche die vollständige Transportsequenz des atpC-Proteins mit dem GFP-Protein exprimieren (t-atpC5GFP).

Entgegen der Erwartung zeigen die CLSM-Aufnahmen von t-atpC2GFP jedoch ebenfalls eine Überlappung der GFP- mit der Chlorophyllfluoreszenz (Abb. 3-13B). Eine zusätzliche Akkumulation von atpC2GFP-Protein in der Plastidenhülle kann zudem nicht ausgeschlossen werden (Abb. 3-13F). Das atpC2GFP-Protein besitzt mit nur 4 Aminosäuren von allen atpC-Konstrukten den kleinsten verbleibenden Transitsequenzbereich. Es wurde deswegen erwartet, daß nur ein kotranslationaler Import in das ER, vermittelt durch die Signalsequenz, möglich ist. Die

beobachtete Plastidenlokalisierung legt möglicherweise eine Beteiligung des N-terminalen Bereiches des GFP-Proteins am Plastidenimport nahe.

Transformationsexperimente mit den Genkonstrukten *atpC1-*, *atpC3-* und *atpC4GFP-DDEL* zeigen keinerlei Unterschiede zu den Varianten ohne das C-terminale ER-Retentionssignal (-DDEL) vom BiP-Protein aus *Phaeodactylum tricornutum*. In t-atpC1GFP-DDEL verbleibt das GFP-Protein im ER, wogegen t-atpC3GFP-DDEL und t-atpC4GFP-DDEL eine GFP-Fluoreszenz in den Plastiden besitzen (Abb. 3-14). AtpC4GFP-DDEL zeigt zudem eine starke Akkumulation des GFP in einem Bereich des Plastiden. Bei dieser Region könnte es sich nach vergleichender Betrachtung von EM-Aufnahmen von *Phaeodactylum tricornutum* um den Pyrenoidbereich des Chloroplasten handeln (Borowitzka 1978).

Die Expression vom *atpC2GFP-DDEL*-Gen in den Algenzellen führt dagegen zu einer von t-atpC2GFP veränderten GFP-Lokalisation. Die Transformanden zeigen einen GFP-Transport in das ER und nicht mehr in die Plastiden. Immunoelektronenmikroskopische Aufnahmen von Dr. Whetherbee bestätigen den CLSM-Befund (pers. Mitteilung). Die ER-Lokalisation vom atpC2GFP-DDEL-Protein im Gegensatz zur plastidären Lokalisation vom atpC2GFP-Protein könnte auf eine mögliche Konkurrenz der Transport- und Retentionssignale während des Importweges hinweisen.

Der Plastidenimport vom atpC2GFP-Protein legt eine mögliche Beteiligung des N-terminalen Bereiches des reifen GFP-Proteins als „Transitsequenzergänzung“ nahe. Unterstützung wird die Annahme durch Western-Blot-Analysen der atpCGFP-Transformanden und anschließender Berechnung der resultierenden GFP-Proteingrößen (Abb. 3-15B). Als Basis der Näherung wurde die bekannte Größe des atpC1GFP-Proteins in den Transformanden verwendet (iatpC1GFP). Es wurden zwei Experimente ausgewertet. Die Fehlerschwankung für die Näherung liegt bei maximal 4 Aminosäuren (Verschiebungen um 1 mm im Gel bei Ablesung).

Das atpC2GFP-Protein aus den t-atpC2GFP-Zellen deutet nach den Analysen eine Prozessierung um die Position -4 im GFP-Protein an (..MVSK-GEE..). Das exprimierte GFP-Konstrukt in t-atpC3GFP zeigt sogar eine tiefergehende Prozessierung um Position -10 (..ELF**TGV*..), wogegen das atpC5GFP-Protein eine Modifizierung um Position +5 vor dem GFP in der Transitsequenz aufweist (..KAT**IVM*..).

Die Berechnungen der Konstrukt-Prozessierungsstellen bei t-atpC1- bis atpC3GFP-DDEL unterstützen das im CLSM beobachtete Transportverhalten. Die nach den Fluoreszenz-Aufnahmen in das ER transportierten atpC1GFP-DDEL- und atpC2GFP-DDEL-Proteine weisen auf eine Prozessierung um der Größenordnung der Signalsequenz hin. Für das atpC1GFP-DDEL-Protein wurde eine Prozessierung identisch zum atpC1GFP-Protein bei Position +14 vor dem GFP (..ASAF**TTQ*..) berechnet. Das atpC2GFP-DDEL-Protein zeigt eine Reifung vor dem GFP um Position +8 auf (..AVA**ASAFTT*..). Exprimiertes atpC3GFP-DDEL-Protein, welches innerhalb der *Phaeodactylum*-Zellen in die Plastiden transportiert wird, zeigt dagegen eine Prozessierung nahe der von atpC3GFP-Protein (Pos. -8 im GFP (..KGEE**LFTG*..)).

Parallel zu den gentechnischen Veränderungen mit den atpCGFP-Konstrukten wurden mit den um den Signalsequenzbereich verkürzten atpCGFP-Varianten (iatpC1GFP bis iatpC5GFP) posttranslationale Importversuche in Plastiden von Erbsen (Kap. 3.2) durchgeführt (Abb. 3-15C). Zielsetzung dieser Experimente war es, mögliche Unterschiede im *in-vitro*- und *in-vivo*-Verhalten der Konstrukte zu finden. Inkubationen von Translationsansätzen der Proteine iatpC3- bis iatpC5GFP mit isolierten Erbsen-Plastiden führten zu keiner Prozessierung der GFP-Fusionsproteine in den Plastiden.

Die nachträgliche Proteasebehandlung der Importansätze führte jedoch zu zwei distinkten, proteasestabilen Banden (Abb. 3-15C, *). Dies könnte möglicherweise auf einen unvollständigen Import der GFP-Proteine über die Plastidenmembran hindeuten.

Die Inkubation mit dem *iatpC1GFP*-Protein läßt keinen Import in die Plastiden erkennen. Die nachträgliche Proteasebehandlung resultierte in einer vollständigen Degradation.

3.3.2.3. FCP-GFP-Transformanden

Analog zu den Untersuchungen des *atpC*-Proteins wurden zusätzlich GFP-Fusionskonstrukte mit der vollständigen bzw. mit Teilen der kurzen Transportsequenz vom FCP-Protein aus *Phaeodactylum* hergestellt.

Die Expression der drei verschiedenen FCP-GFP-Varianten in *Phaeodactylum*-Zellen zeigt, daß nur das Konstrukt mit der vollständigen FCP-Präsequenz (FCPGFP) via dem CER zu einem Import in die Plastiden führt (Abb. 3-16). t-FCP2GFP mit der C-terminalen und t-FCP3GFP mit der N-terminalen Hälfte der FCP-Transitsequenz in ihrem Proteinkonstrukt zeigen beide eine verstärkte Ansammlung von GFP, die „ring- bzw. wurmartig“ um die Plastide herumführen. Die für eine ER-Lokalisation feine Verästelung des GFPs innerhalb der Zelle wurde nicht beobachtet. Die GFP-Verteilung weist keine Ähnlichkeit zu einer cytoplasmatischen GFP-Lokalisation auf. Möglicherweise akkumuliert das GFP in einer nach dem Transport in das ER nachfolgenden Region wie z.B. dem periplastidären Membranraum zwischen der Plastidenhülle. Auch eine Lokalisation im Golgi-Apparat kann derzeit nicht ausgeschlossen werden, ist aber durch die fehlende ER-Markierung und der Nähe des GFP an den Plastiden zu bezweifeln. Bei großer Verstärkung der GFP-Signale ist bei beiden Varianten eine geringe Lokalisation im Plastid zu beobachten.

3.3.2.4. PRK-GFP-Transformanden

Die Lokalisation des GFPs in t-PRK1GFP und t-PRK2GFP zeigt, daß Signal- und Transitsequenzen aus der Kieselalge *Odontella sinensis* von dem ER bzw. den Plastiden aus *Phaeodactylum tricornutum* erkannt werden können. CLSM-Aufnahmen von beiden Zelllinien zeigen eine identische Lokalisation der GFP- und der Chlorophyllfluoreszenz in den Plastiden (Abb. 3-16D,E).

Das PRK1GFP-Protein besitzt die vollständige Präsequenz der Phosphoribulokinase aus *Odontella sinensis*, wogegen das PRK2GFP-Proteinkonstrukt eine Halbierung der PRK-Transitsequenz auf die Länge des FCP-Transitbereiches aufweist.

3.3.2.5. Transformanden mit Transportsequenzen aus höheren Pflanzen, Euglenophyten und Dinoflagellaten

Zur Untersuchung möglicher analoger Transportmechanismen in den Plastiden von evolutionär auseinanderstehenden Organismen wurden die kodierenden Genbereiche von Präsequenzen aus höheren Pflanzen, Euglenophyten und Dinoflagellaten an das GFP fusioniert und in der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* exprimiert.

Die Transformation mit dem *TgSpiGFP*-Genkonstrukt, welches den kodierenden Bereich der Transitsequenz der γ -UE-ATPase aus Spinat beinhaltet, führt nicht zu einem Transport von GFP in die komplexen Diatomeen-Plastiden (Abb. 3-17D). Eine cytoplasmatische GFP-Akkumulation ist zu beobachten.

Entgegen der Erwartung führte die Klonierung der γ -UE-Transitsequenz in die *SatpCGFP*-Kassette nach der Transformation nicht zu einer Lokalisation des GFPs im Diatomeen-Plastid (Abb. 3-17E).

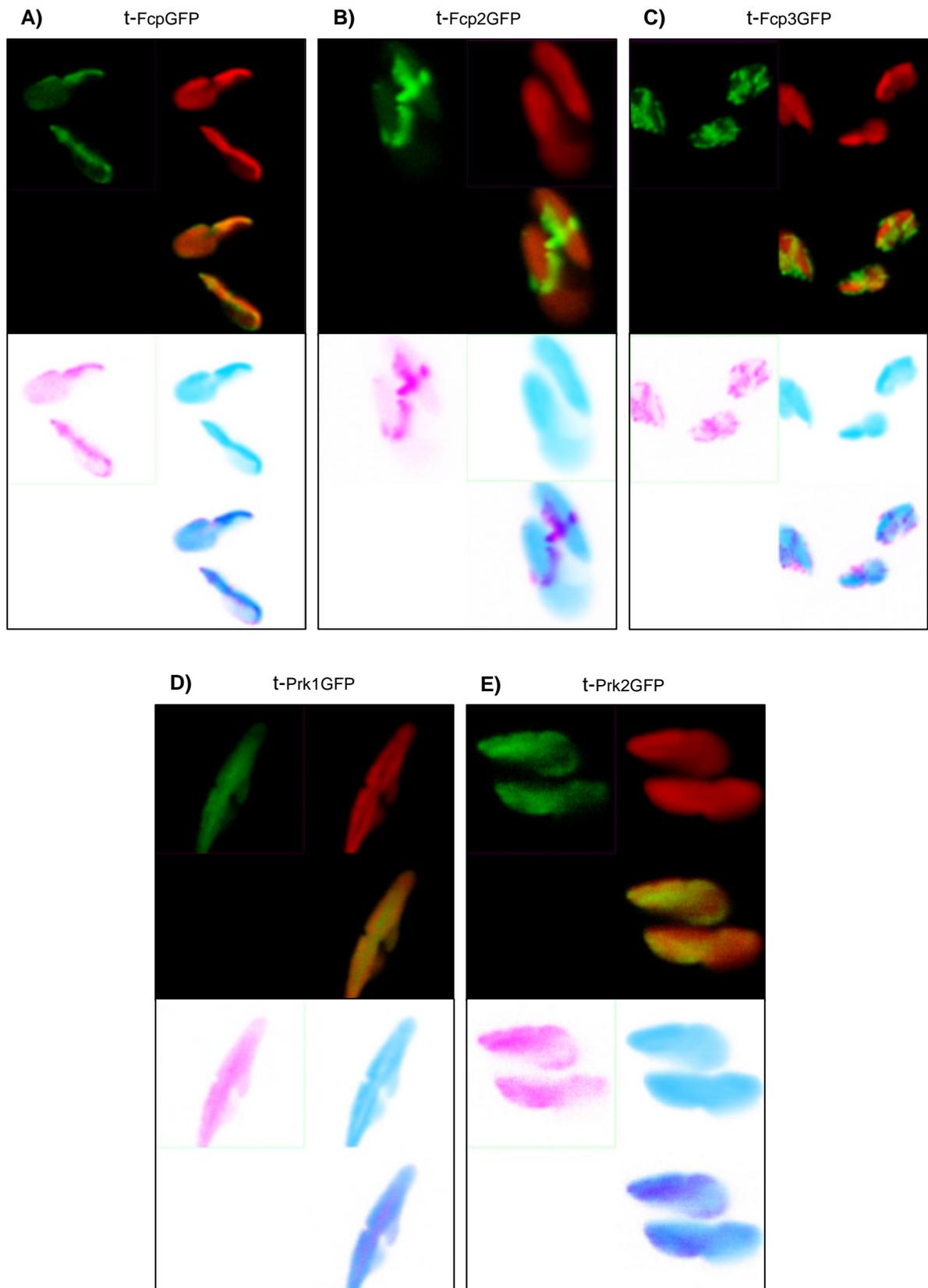


Abbildung 3 - 16 CLSM-Aufnahmen der FCP-GFP- und PRK-GFP-Transformanden

Aufnahmen von gentechnisch veränderten *Phaeodactylum*-Zellen, transformiert mit den Fusionsgenen *FCPGFP* (A), *FCP2GFP* (B) und *FCP3GFP* (C) bzw. mit den Konstrukten *PRK1GFP* (D) und *PRK2GFP* (E). In rot ist die Autofluoreszenz der Chloroplasten und grün ist die Fluoreszenz von GFP zu erkennen. Unterhalb der Fluoreszenzaufnahmen sind in Umkehrfarben die gleichen Aufnahmen dargestellt.

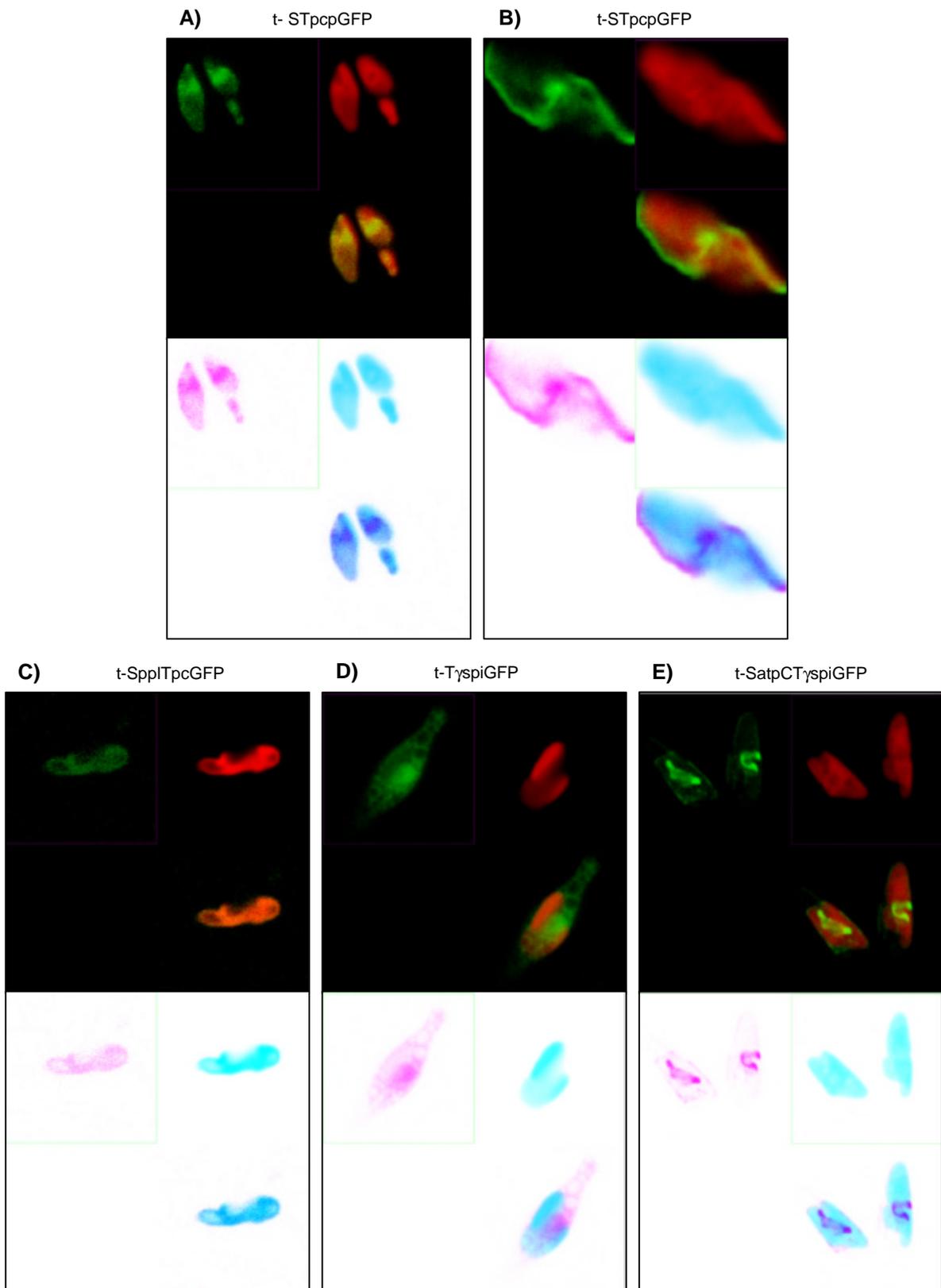


Abbildung 3 - 17 CLSM-Aufnahmen von Transformanten mit Transportsequenzen aus Dinoflagellaten und höheren Pflanzen

CLSM-Aufnahmen von ballistisch transformierten *Phaeodactylum*-Zellen t-STpcpGFP (A, B), t-SppLTpcGFP (C), t-TyspiGFP (D) und SatpCT γ spiGFP (E). Rot ist die Autofluoreszenz der Chloroplasten und grün ist die Fluoreszenz von GFP. Unterhalb der Fluoreszenzaufnahmen sind in Umkehrfarben die gleichen Aufnahmen dargestellt.

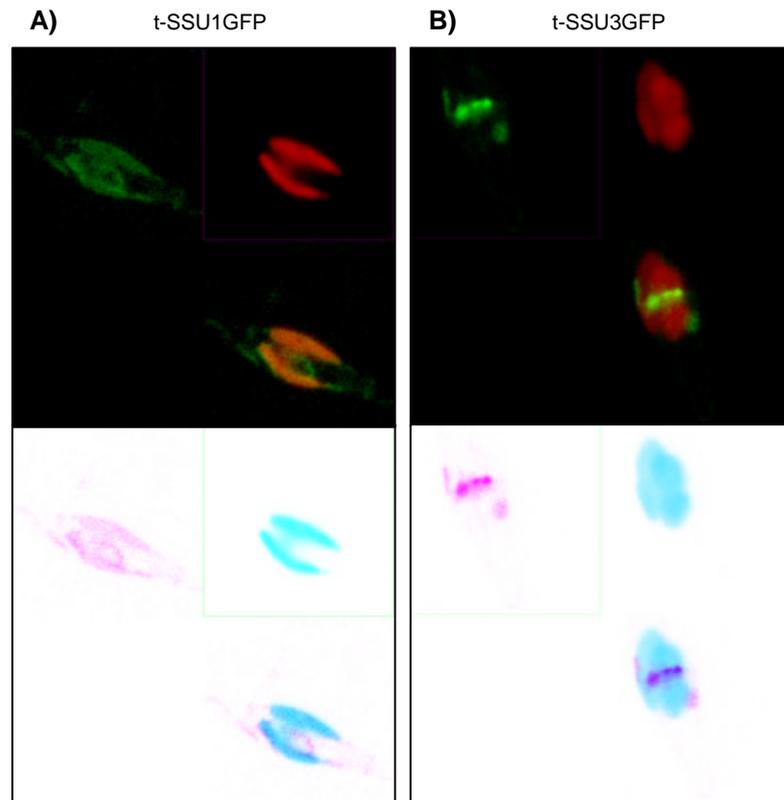


Abbildung 3 - 18 CLSM-Aufnahmen von Transformanden mit Transportsequenzen aus Euglenophyten

CLSM-Aufnahmen von *Phaeodactylum*-Zellen, die nach Transformation die eingeführten GFP-Fusionsgene *SSU1GFP* (A), *SSU3GFP* (B) exprimieren. In rot ist die Autofluoreszenz der Chloroplasten und in grün ist die Fluoreszenz von GFP zu erkennen. Unterhalb der Fluoreszenzaufnahmen sind in Umkehrfarben die gleichen Aufnahmen dargestellt.

Die CLSM-Aufnahmen von t-SatpCT γ spiGFP zeigen analog den Bildern von t-FCP2- oder t-FCP3GFP eine Fluoreszenz an dem Plastid in „fleckigen“ oder „lappigen“ Strukturen sowie eine schwache GFP-Lokalisation in ER-artigen Verästelungen innerhalb der Zelle. Dies könnte auf eine Lokalisation im Golgi-Apparat hindeuten.

Die Zelllinie t-SpplTpcGFP war durch eine sehr schwache GFP-Fluoreszenz gekennzeichnet (Abb. 3-17C). Diese findet sich in den CLSM-Aufnahmen größtenteils innerhalb der Plastiden. Der Transport des SpplTpcGFP-Proteins in die Diatomeen-Plastiden deutet auf die Erkennung der Säuger-Signalsequenz durch das ER und der Plastocyanin-Transitsequenz durch den Plastidenimportapparat hin. Eine GFP-Markierung der Thyakoide in den Diatomeen-Zellen ist durch die geringe Fluoreszenz nicht zu erkennen.

Die komplette Präsequenz des PCP-Proteins aus dem Dinoflagellaten *Symbiodinium spec.* ermöglicht einen Transport in die Diatomeen-Plastiden (t-STpcpGFP) (Abb. 3-17A). CLSM-Aufnahmen der transformierten Zellen in unterschiedlichen Schnittebenen verdeutlichen das deckungsgleiche Auftreten der GFP- mit der Chlorophyllfluoreszenz (siehe Anhang). Es finden sich aber auch Zellen, die zusätzlich eine starke oberflächliche GFP-Fluoreszenz um bzw. in der Plastide besitzen (Abb. 3-17B). Aufgrund der GFP-Lokalisation ist zu vermuten, daß die erste Domäne der zweigeteilten Dinoflagellaten-Präsequenz, die einen kotranslationalen Import in Säuger-ER erlaubt (Lang 1996), einen Transport in das Diatomeen-ER und die zweite Domäne einen Transport in die Plastide bewirkt.

	Signalsequenz	Transitsequenz	reifes Protein
py Odo.	MKFFCVAGLLASAAA	FQAQPAAFTTYS PAVGGATSNV FSESSSPAHRNRRATIVM	DGK..
py Phaeo.	MRSFCIAALLAVASA	FTTQPTSFTVK T ANVGERASGV FPEQSSAHRTRKATIVM	DGK..
pPRK Odo.	MKLSLGI VALMAASASA	FAPTAFMPANTLR AAAPASPSALNM	ALK..
pGapC1 Odo.	MKLSIAALLVGSAAA	YAPSSFSGTSLK ASSNGASMSM	STG..
pFBA Odo.	MKLAVAALLAVQAAA	FAPAPQFGAPRTAMHM	STE..
pFCP Phaeo.	MKFAVFASLLASRAA	FAPAQQSARTSVATNM	AFE..
pFCP Odo.	MKLAI AALLAGSAAA	FAPAQSGKASTALNM	AFE..
pFCPa Skele.	MKS AIIAALIGSAA	FAPAQTGKATTALN-	AFE..
pFCP2 Cyclo.	MKS AIFASLIAGAAA	FAPAQTGKATTSLA-	AFE..
pFCPa Macro.	MKSAVM AVACAAAAPGLRRPSA	FNGAALT TSAKSSSAMKM	SFE..
pFCP Lam.	MKLSRRCADAAAASA	FNGAALT TSSAKASSAMKM	SFE..
pFCP Hetero.	MSLKLATLAAALMGASA	FVAPNKMGVAKSSSALKM	SFE..
pGapC1 Guill.	MAYFKAVAYLAALASAAA	FNPGSSFVPRLNAPATQPKAAKMTGPVM	AEQ..

Abbildung 3 - 19 Vergleich der Transitsequenzen verschiedener kernkodierter Chloroplasten-Proteine aus Kieselalgen

Vergleich von Transitsequenzen von verschiedenen kernkodierten Plastiden-Proteinen aus Kieselalgen und anderen Heterokontophyta. Trotz hoher Homologie der FCP-Proteine von Kieselalgen zeigen die FCP-Proteine von *Skeletonema* und *Cyclotella* kein Methionin an der Schnittstelle der Transitsequenz (-).

py: prä- γ -Untereinheit der plastidären ATPase, pPRK: Prä-Phosphoribulokinase, pFCP: Prä-Fucoxanthin-chlorophyll-a,c-bindendes Protein, pFBA: Prä-Fructose-bis-Phosphat-Aldolase, pGapC1: Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Odo.: *Odontella sinensis*, Phaeo.: *Phaeodactylum tricorutum*, Skele.: *Skeletonema costatum*, Cyclo.: *Cyclotella cryptica* (Diatomeen); Macro.: *Macrocyctis pyrifera*, Lam.: *Laminaria saccharina* (Phaeophyta); Guill.: *Guillardia theta* (Cryptophyta); Hetero.: *Heterosigma carterae* (Raphidophyta).

py Odo. (Pancic und Strotmann 1993), py Phaeo. (AccNo. U29898), pPRK Odo. (AccNo. Y08610), pGapC1 Odo. (Liaud et al. 2000), pFBA Odo. (unpubliziert), pFCP Phaeo. (Bhaya und Grossman 1993), pFCP Odo. (Kroth-Pancic 1995), pFCPa Skele. (Smith et al. 1997), pFCP2 Cyclo. (Eppard und Rhiel 1998), pFCPa Macro. (Apt et al. 1995), pFCP Lam. (Caron et al. 1996), pFCP Hetero. (Durnford et al. 1996), pGapC1 Guill. (Liaud et al. 1997).

Alle *Phaeodactylum*-Zellen, die Bereiche der Transportsequenzen der kleinen Untereinheit der Rubisco (SSU) aus *Euglena gracilis* gekoppelt an das GFP-Protein exprimierten, zeigten eine uneindeutige GFP-Lokalisation (Abb. 3-18A-C). Zudem wiesen alle ausgewerteten Transformanten (t-SSU1GFP: 34, t-SSU3GFP: 42) eine schwache GFP-Fluoreszenz auf.

Die Expression des SSU-GFP-Fusionsproteins mit der vollständigen *Euglena*-SSU-Präsequenz in t-SSU1GFP führte zu einer GFP-Lokalisation einerseits in das ER, angedeutet durch die ringartige Struktur (Kernmembran), und in die Plastiden.

Das SSU3GFP-Fusionsprotein besitzt im Gegensatz zum SSU1GFP-Protein eine C-terminale Deletion; in der Transitsequenz, die zu einer Entfernung der zweiten hydrophoben Domäne in der Präsequenz führt. Die Transformation der Algen mit dem *SSU3GFP*-Konstrukt resultierte vergleichbar zu den FCP-GFP-Transformanten in einer GFP-Akkumulation um die Plastide, aber auch in feineren Strukturen in der Zelle. Dies könnte möglicherweise auf eine GFP-Lokalisation innerhalb des Golgi-Apparates hinweisen.

Eine phototechnische Überhöhung der GFP-Fluoreszenz weist bei allen Konstrukten auf einen Anteil an cytoplasmatischer GFP-Lokalisation hin.

3.3.2.6. Strukturbetrachtung der Transitsequenzen von Diatomeen-Proteinen und der atpC-GFP-Konstrukte

Die Variabilität der Transitsequenzen bei den Diatomeen könnte auf unterschiedliche Transportmotive und somit möglicherweise auf verschiedene Transportwege hinweisen. Um Unterscheidungsmerkmale zwischen den Diatomeen-Transitsequenzen zu finden, wurde die Aminosäuresequenz und die Sekundärstruktur genauer analysiert.

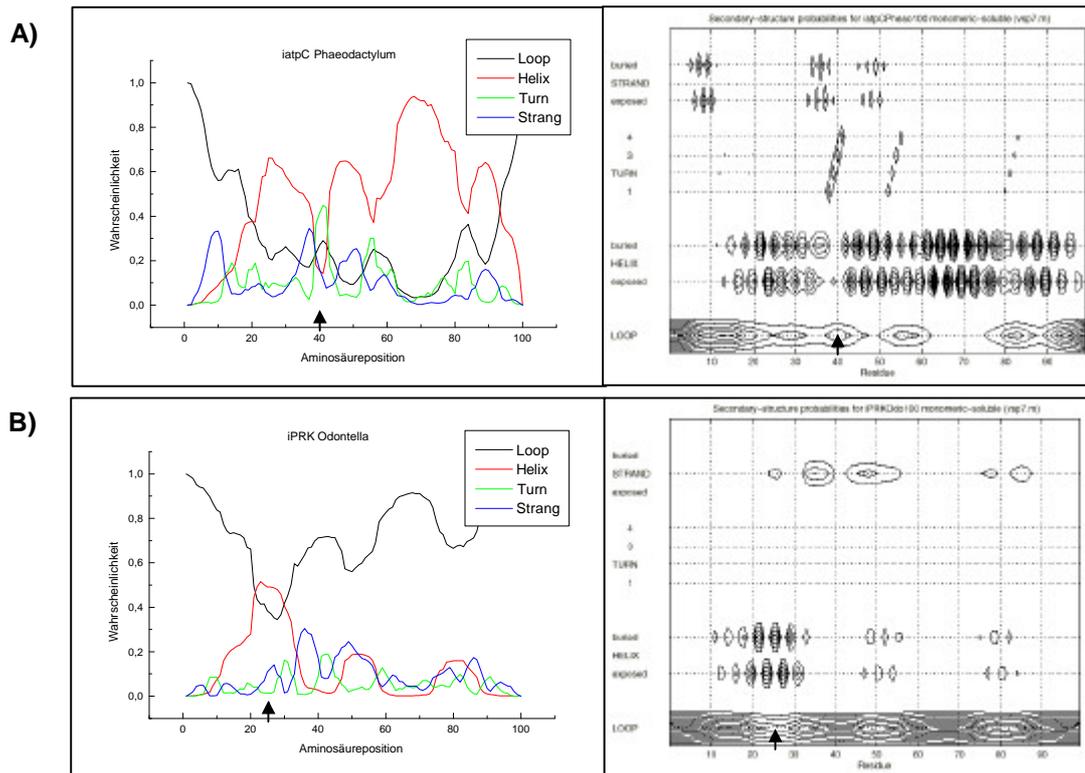


Abbildung 3 - 20 Strukturvorhersagen von Transitsequenzdomänen kernkodierten Plastiden-Proteinen von Kieselalgen und von atpCGFP-Fusionsproteinen

Berechnung der Sekundärstruktur der Transitsequenz der γ -UE der ATPase (A) aus *Phaeodactylum tricornutum* und der PRK (B) aus *Odontella sinensis* mit den ersten N-terminalen Aminosäuren der reifen Proteine und der beiden Fusionsproteine iatpC2GFP (C) und iatpC5GFP (D). Die Pfeile geben den Beginn des reifen Proteins an. Die Graphiken links geben die Strukturwahrscheinlichkeiten für jede Aminosäure an und in den Abbildungen rechts sind die Strukturwahrscheinlichkeiten unter Einbeziehung der Hydrophobizität der Aminosäure dargestellt. Die Strukturvorhersagen wurden am PSA-Proteinstrukturserver (<http://bmerc-www.bu.edu>) durchgeführt und basieren auf Stultz et al. (1993), White et al. (1994) und Stultz et al. (1997).

Um zudem eine mögliche Erklärung für die GFP-Lokalisation in t-atpC2GFP zu erhalten, wurde zusätzlich die Struktur der Transportsequenzen der atpCGFP-Proteine ermittelt.

Die Transitsequenz von pFCP aus *Odontella* (bzw. *Phaeodactylum*) weist mit 15 AS die geringste Ähnlichkeit zu den bekannten Adressierungssignalen höherer Pflanzen hin. Der Anteil hydroxylierter Aminosäuren liegt bei 20%.

Die zweite Transportdomäne der Phosphoribulokinase aus *Odontella* liegt dagegen mit einer Größe von 25 AS an der unteren Grenze der bekannten, pflanzlichen Transitsequenzen. Sie besitzt einen Anteil von 16% an Serinen oder Threoninen in der Transitsequenz. Die γ -UE der plastidären ATPase aus *Odontella* oder *Phaeodactylum* weisen allerdings eine Transitsequenzlänge von 40 AS mit einem prozentualen Anteil von 25% an hydroxylierten Aminosäuren auf (Abb. 3-19).

Die Untersuchung der Primärsequenz der nachfolgend aufgeführten Diatomeen-Transitsequenzen weist auf eine positive Ladung an Position -6 bis -8 gefolgt von einer Region mit kleinen, mehr hydrophoben Aminosäuren (A, S, T, V) vor der Schnittstelle (FCP-Protein aus *Phaeodactylum tricornutum*, *Odontella sinensis*, *Cyclotella cryptica* sowie *Skeletonema costatum*, dem atpC-Protein aus *Phaeodactylum tricornutum* und *Odontella sinensis*, dem PRK-Protein bzw. dem FBA-Protein aus *Odontella sinensis*).

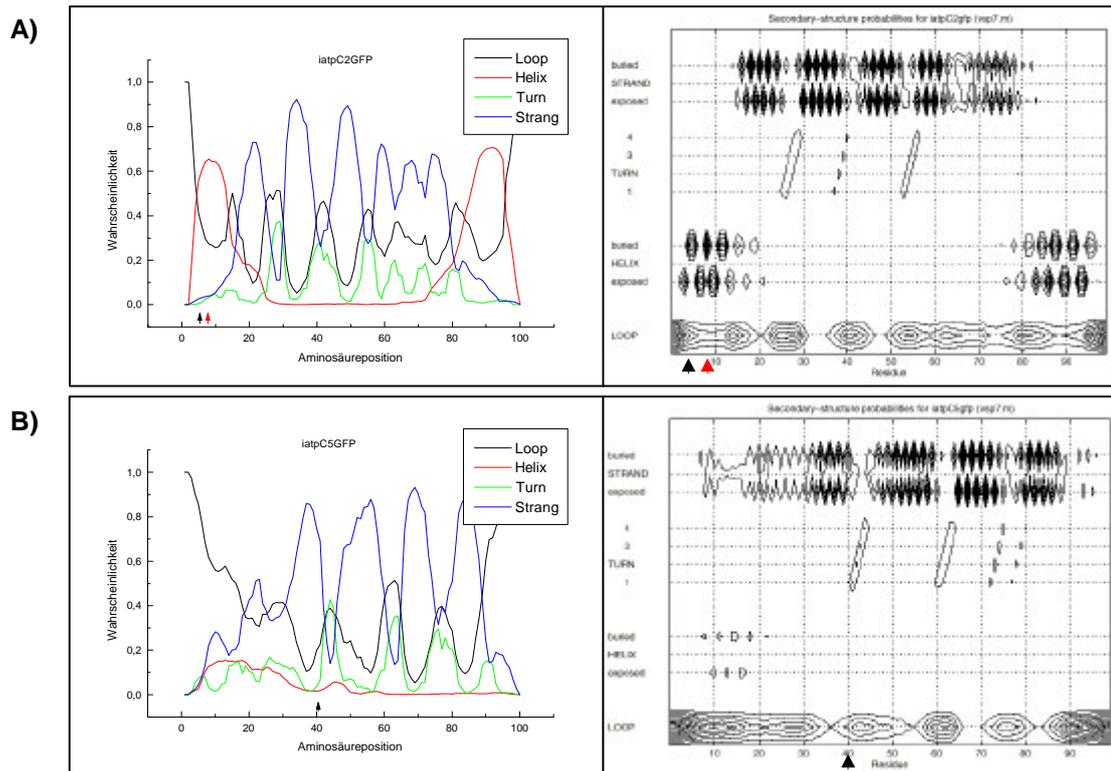


Abbildung 3 - 21 Strukturvorhersagen der Transitsequenzdomänen von atpCGFP-Fusionsproteinen

Berechnung der Sekundärstruktur der Transitsequenz der beiden Fusionsproteine iatpC2GFP (A) und iatpC5GFP (B). Die Pfeile geben den Beginn des reifen Proteins an. Der rote Pfeil bei iatpC2GFP markiert die über Western-Blot-Analysen angedeutete Prozessierungsstelle an. Die Graphiken links geben die Strukturwahrscheinlichkeiten für jede Aminosäure an und in den Abbildungen rechts sind die Strukturwahrscheinlichkeiten unter Einbeziehung der Hydrophobizität der Aminosäure dargestellt. Die Strukturvorhersagen wurden am PSA-Proteinstrukturserver (<http://bmerc-www.bu.edu>) durchgeführt und basieren auf Stultz et al. (1993), White et al. (1994) und Stultz et al. (1997).

Die hydrophobe Region ist mindestens zwei Aminosäuren lang und zeigt direkt vor dem Schnittstellenmotiv $^3(L/I/T/M)-X^{-1}M$ das Motiv $^{-5}(S/T/A/V) -^4(A/T/S)$. Die Phosphoribulokinase und die Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase besitzen die längste Region bis zur positiven Ladung.

Die Sekundärstrukturberechnungen erfolgten nach Stultz et al. (1993), White et al. (1994) und Stultz et al. (1997) über den PSA-Proteinstruktur-Server (<http://bmerc-www.bu.edu>). Für die Vorhersagen wurden die intermediären Formen der kernkodierten Plastiden-Proteine d.h. ohne die Signalsequenz verwendet, so, wie sie nach einem kotranslationalen Import im CER einem möglichen Rezeptor vorliegen könnten.

Nach der Strukturbestimmung lassen sich für die Diatomeen-Transitsequenz zwei ähnliche Strukturtypen vermuten. Die kleineren Transitsequenzen der Diatomeen wie z.B. die FCP-Proteine (aus *Odontella sinensis*, *Phaeodactylum tricorutum*, *Skeletonema costatum*, *Cyclotella cryptica*), die PRK (*Odontella sinensis*) und das OEE33 (*Odontella sinensis*) weisen über große Teile einschließlich des angrenzenden reifen Proteins eine amphipatische Helix-Struktur auf (Abb. 3-20B). Im mittleren Bereich der Transitsequenz liegt eine positive Ladung, die ungefähr im Anfangsbereich der helikalen Struktur liegt. Die Prozessierungsstellen dieser Transitsequenzen liegen im mittleren Bereich der Helix-Struktur. Im Gegensatz dazu besitzen die atpC-Proteine von *Phaeodactylum tricorutum* und *Odontella sinensis* nur innerhalb der Transitsequenz eine amphipatische Helix. Am Übergangsbereich zum reifen

Protein findet sich im Fall von *Phaeodactylum* ein Turn-Helix-Motiv (Abb. 3-20A) und bei *Odontella* ein Loop-Helix-Motiv.

Die Berechnung der atpCGFP-Konstrukte weisen auf eine Änderung der Sekundärstruktur der Transportsequenzen durch die Fusion mit dem GFP-Protein (Abb. 3-19C,D). Wie beschrieben, zeigt die vollständige atpC-Transitsequenz in natura eine amphipatische Helix. Nach Anbindung der Transportsequenz an das GFP-Protein wechselt die Struktur jedoch über zu einer Loop-Struktur in der ersten und einer Faltblattstruktur in der hinteren Hälfte (Abb. 3-21B). Je nach Länge der an das GFP addierten Transitsequenzteile (atpC1, 3, 4GFP) wird die Faltblattstruktur im Gegensatz zu der Loop-Struktur ausgeprägter. Da die Proteine zum Teil in die Plastiden von *Phaeodactylum tricornutum* transportiert werden, ist zu vermuten, daß die Sekundärstruktur nicht das einzige Kriterium für einen Import in die Plastiden darstellt.

Eine Ausnahme in der Umwandlung der Transitsequenzstruktur bildet das atpC2GFP-Fusionsprotein. Die vier verbliebenen Aminosäuren der Transitsequenz führen zusammen mit den ersten fünfzehn Aminosäuren des GFP zu einer amphipatischen Helix (Abb. 3-21A). Die in Western-Blot-Analysen eingegrenzte Schnittstelle liegt vergleichbar zu den Strukturen der Transportsequenzen von FCP bzw. PRK mittig in der helikalen Region.

3.4. Voruntersuchungen zum möglichen vesikulären Proteintransport in der Diatomeen-Plastidenhülle

Elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen im periplastidären Raum zwischen dem Chloroplasten-ER und den beiden inneren Plastidenhüllen der Diatomeen bzw. Heterokontophyten vesikuläre oder retikuläre Strukturen (Gibbs 1981). Zur Charakterisierung eines möglichen vesikulären Transportes wurden Genfragmente von kleinen GTPasen der RAB-Familie, welche eine regulatorische Funktion im Vesikeltransport besitzen (Nuoffer und Balch 1994), aus der *Odontella*-cDNA-Bibliothek amplifiziert. Zielsetzung der Untersuchung war das Auffinden von GTPase-Genen, deren Translationsprodukte in den periplastidären Raum mit mindestens einer Signalsequenz-artigen Transportsequenz transloziert werden. Alle derzeit bekannten kleinen GTPasen (rab-, arf-, ypt-Familie) sind cytoplasmatisch lokalisiert (Martinez und Goud 1998).

3.4.1. Primer- und Genauswahl

Für die Suche in der cDNA-Bibliothek mit degenerierten Primern wurden folgende Gene von GTPasen aus drei konservierten Transportwegen innerhalb der eukaryotischen Zelle als Ziel ausgewählt: das Gen für das RAB5-Protein, welches im phagotrophen Weg von der Zellmembran zu den Endosomen involviert ist, das Gen für das YPT1-Protein aus dem Transport vom ER zum Golgi (COPII-Weg) und zuletzt für den retrograden Transport vom Golgi zurück zum ER (COPI) das Gen vom Protein ARF1.

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde generell mit einem Primer gegen den im Phagenvektorsystem (Lambda-Zap) klonierten pBluescript (Promotorregion T7 oder T3) und einem gegen das gesuchte Gen gerichteten degenerierten Primer durchgeführt. Die Wahl der variablen Nukleotide im degenerierten Primer orientierte sich nach der Codon-Usage-Tabelle von bekannten *Odontella*-Kerngenen.

3.4.2. Das arf1-Fragment

Das Genfragment des „ADP-ribosylation-factor“ (ARF) wurde mit einem degenerierten Primer (Arf1-P1, siehe Kap. 2.2.4.4) vor dem kodierenden Bereich für die GTP-bindende-Domäne G3 und einem Primer gegen den Lambda-Zap-Phagen amplifiziert (Abb. 3-22).

```

1   GCT CCT ACC GCG GTG GCG GCC GCT CTA GAG ACC GTT GAG TAC AAG
      XbaI E T V E Y K
46  AAC ATC TCT TTC ACA GTG TGG GAT GTC GGG GGT CAG GAC AAG ATC
      N I S F T V W D V G G Q D K I
      G3-Region
91  CGC CCC CTC TGG CCG CAC TAC TAC CAA AAC ACG CAG GGG CTT ATT
      R P L W R H Y Y Q N T Q G L I
136 TTT GTT GTG GAC TCG AAT GAC GCG GAT CGT ATC GAC GCC GCG AGG
      F V V D S N D A D R I D A A R
      GAP-Binde/Effektorregion
181 GAC GAG TTG CAC AGA ATG CTT AAC GAG GAT GAG CTA CGT GAT GCT
      D E L H R M L N E D E L R D A
226 GTC CTC CTT GTA TTC GCC AAC AAG CAG GAT TTG CCT AAT GCC ATG
      V L L V F A N K Q D L P N A M
      G4-Region
271 TCG GCT GCG GAG ATG ACG GAC AAA CTT GGC CTC CAC GGT CTT CGC
      S A A E M T D K L G L H G L R
316 CCA TCC TAT CGT CAG TGG TAC ATC CAG GCC TGT TGC GCG ACT ACT
      P S Y R Q W Y I Q A C C A T T
361 GGA GAT GGG TTG TAC GAG GGT CTT GAT TGG TTG TCT GCA ACA CTG
      G D G L Y E G L D W L S A T L
406 TCA AAG AGG AAG TAG ATG TGA GAA GAC AAC TTT CAA GCT AAA AGC
      S K R K Stop
451 GCT GCA CAC CGT CAA TGG AAT TTA CAC AAG AAG CGC ACA GTC CCG
496 TGT ACG GAC ACG TTT AAG AAA GCT GGA GCA CCA AAC CAT GGT CAT
541 GAA GAT CAA CCC TCT CCT AAA GGG GAA AGA ACA GTC CAT TAA CTG
586 ATG GCG CCA TGC CCT GGT ACA ATC GGC ATG ATG CCA AGC GCG TGT
631 TCC GGT CGG CAC CAA CAG GGT GGT TGA AAG GGT TTC GTT GTT ATA
676 GAG CTT ATG AAG TAG AAA ACA TAT AAA ATT ATG TTT AAT CTG ATG
721 TCA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA CTC GAG GGG GGG CCC GGT ACC
      XhoI

```

Abbildung 3 - 22 Nukleotidsequenz des Arf1-Fragmentes aus *Odontella sinensis*

Nukleotidsequenz des arf1-PCR-Produktes amplifiziert aus einer cDNA-Bank aus *Odontella sinensis*. Die Fragmentschnittstellen zur Klonierung in den Vektor sind punktiert unterstrichen. Die Aminosäuresequenz des degenerierten Primers ist kursiv geschrieben. Bereiche, die nach Sequenzvergleich an der GTPase-Funktion beteiligt sind, sind unterstrichen und mit der Regionenbezeichnung beschriftet.

Das 720 Nukleotide lange Fragment wurde mittels der Schnittstellen XbaI und XhoI in pBluescript KS kloniert. Das PCR-Produkt besitzt einen ca. 320 Nt langen 3'-unkodierenden Bereich mit einem 21 Nt langen PolyA+-Bereich. Es kodiert für 129 (70,5%) der durchschnittlich 183 Aminosäuren der bekannten ARF1-Proteine.

Der Homologievergleich der Aminosäuresequenz weist eine Identität von 83% gegenüber pflanzlichen ARF1-Proteinen (*Arabidopsis*, *Chlamydomonas*, *Zea mays*) und 82% gegenüber menschlichen und Amphibien-Proteinen (*Xenopus*) auf. Der C-terminale Bereich beinhaltet die G3 bis G5-Region der GTP-bindenden bzw. hydrolysierenden Domäne sowie die Binde- und Effektorregion des GTPase-aktivierenden Proteins (Moore et al. 1995, Goldberg 1999).

```

1   GGT GGC GGC CGC TCT AGA CAA ATT TGG GAT ACT GCT GGT CAG GAG
      XbaI      Q   I   W   D   T   A   G   Q   E

46  CGT TTC CGC ACG ATT ACG TCA TCG TAC TAT CGT GGG GCG CAC GGA
      R   F   R   T   I   T   S   S   Y   Y   R   G   A   H   G

91  ATC ATT GTC GTC TAC GAC GTG ACT GAT AAT GAG TCG TTC AAC AAC
      I   I   V   V   Y   D   V   T   D   N   E   S   F   N   N

136 GTG AAG CAA TGG TTG CAT GAA ATT GAC CGG TAT GCT TGC GAG AAT
      V   K   Q   W   L   H   E   I   D   R   Y   A   C   E   N

181 GTG AAC AAG CTC TTG GTG GGT AAC AAG TCA GAT CTC ACC GCG AAG
      V   N   K   L   L   V   G   N   K   S   D   L   T   A   K
      G4-Region

226 CGT GTC GTG TCT ACT GAG CAG GGT AAG GAG TTC GCT GAC AGC CTC
      R   V   V   S   T   E   Q   G   K   E   F   A   D   S   L

271 GGC ATC GAA TTT CTG GAA ACT TCG GCG AAA ACC TCT ACG AAT GTT
      G   I   E   F   L   E   T   S   A   K   T   S   T   N   V
      G5-Region

316 GAA CAA GCA TTC CTC ACC ATG GCA AGC CAG ATC AAG GCA AGG ATG
      E   Q   A   F   L   T   M   A   S   Q   I   K   A   R   M

361 AAG ACT CAG CCA AGT GTC AAC GCG CCG AAC AAA GTG AAA ATC AAC
      K   T   Q   P   S   V   N   A   P   N   K   V   K   I   N

406 CCA GGC CAG TCT GTG AAG CAG AGT TCT GGA TGC TGC TAA ATG CGT
      P   G   Q   S   V   K   Q   S   S   G   C   C Stop
      Anker

451 TTG ATG TGA TGA CAA ATT TCC TGT GAA AAG AGT GGA GCT GTA GGA

496 GTT GAG CGA CAC CAA CTT GCT TTC AGG ATA AAA GGA AAA GAG GAG

541 TAA AAC TAT TTC TTC AGT GGG TGA GGC TGG TTA TTT TCT CGC ATA

586 GGT ACA ATA GAT GGA ACG AAC ACA GGT AAA GGC CTC AGA AAA GTG

631 GAA AAG AAG GGA TTT GAT TGT AAG TTT AGT GGT GGA TTG CTT TTG

676 GTC TTT GTG AAA GTA TAA AAA CAT TTC AAA ACA AAA AAA AAA AAA

721 AAA AAA AAC TCC AGG GGG GGC CCG GTA CCC AGC TTT TGT TCC CTT
      XhoI

```

Abbildung 3 - 23 Nukleotidsequenz des Ypt1-Fragmentes aus *Odontella sinensis*

Primärsequenz des ypt1-PCR-Produktes amplifiziert aus einer cDNA-Bank aus *Odontella sinensis*. Die Schnittstellen des Fragmentes zur Klonierung in den Vektor sind punktiert unterstrichen. Die Aminosäuresequenz des degenerierten Primers ist kursiv geschrieben. Bereiche, die nach Sequenzvergleich an der GTPase-Funktion beteiligt sind, sind unterstrichen und mit der Regionenbezeichnung beschriftet. Die Binderegion für den Isopren-Anker des YPT1-Fragmentes ist mit „Anker“ beschriftet.

3.4.3. Das ypt1-Fragment

Mittels PCR-Amplifikation mit dem degenerierten Primer (Ypt1-P2) wurde ein 722 Nukleotid langes Fragment vom *Ypt1*-Gen aus *Odontella* gewonnen (Abb. 3-23). Das Fragment kodiert für 143 der 203 Aminosäuren von YPT1 und besitzt einen 307 Nukleotide langen 3'-untranslatierten Bereich mit einer PolyA+-Region von 21 Adeninen. Die Proteinsequenz weist die G4- und G5-Region der GTPase-bindenden Domäne, die GAP-Effektorregion und den Bindungsbereich für den Isopren-Anker am C-Terminus (Doppel-Cystein-Motiv) auf.

Die Aminosäureidentität des Proteinfragmentes gegenüber Säugern liegt bei 73 % (RAB1 von Ratte und Mensch) und gegenüber Pilzen von 72 % (YPT1 von *Schizosaccharomyces pombe* und *Neurospora crassa*). Pflanzliche GTPasen liegen bei 73 % für *Oryza* (RIC1) und für YPT1 aus der Grünalge *Volvox carterii* bei 72 %.

```

1   CCG GGC TGC AGG AAT TCG ACA CGA GAA AAC ACC GTG ACA ATG AGC
      EcoRI
      M S

46   AAC AGG GTA TGC CAT TTC AAG CTG GTC CTT CTC GGC GAT ACA GCC
      N R V C H F K L V L L G D T A
      G1-Region

91   GTT GGA AAG TCA TGT CTT GTT GTT AGG TTC GTC CGC GAT GAG TTT
      V G K S C L V V R F V R D E F

136  TTT GAG TTT CAG GAA CCA ACA ATC GGA GCG GCG TTC TTG ACC CAG
      F E F Q E P T I G A A F L T Q
      G2-Region

181  ACG GTG GCG CTG GAT GAA GCC ACC GTC AAG TTC GAA ATT TGG GAC
      T V A L D E A T V K F E I W D

226  ACC GCT GGA CAG GAG AGG TAC CGT TCC TTG GCT CCT ATG TAC TAC
      T A G Q E R Y R S L A P M Y Y
      G3-Region

271  CGT GGC GCG AAT TCG ATA TCA AGC TTA TCG ATA CCG TCG ACC TCG
      R G A EcoRI

```

Abbildung 3 - 24 Nukleotidsequenz des rab5-Fragmentes aus *Odontella sinensis*

Amplifizierte, partielle Nukleotidsequenz von rab5 aus einer cDNA-Bank von *Odontella*. Die Aminosäuresequenz des degenerierten Primers ist kursiv geschrieben. Punktiert unterstrichen sind die zur Klonierung in den Vektor verwendeten Erkennungsstellen. Sequenzbereiche, die Motive für die GTPase-Funktion darstellen, sind unterstrichen und mit der Regionenbezeichnung beschriftet.

```

1   ACC GCG GTG GCG GCC GCT CTA GAC AAC GCT GGC AAG ACC ACT GAG
      XbaI D N A G K T T E

46   GAG CAG AAG GAG TTC CTC TCT GAC TGC AAG ACC ATC ATC ATG AAC
      E Q K E F L S D C K T I I M N

91   GGA CCC ATG GGT GTG TTC GAG TTT GAG GCC TTC AAC AAG GGA ACC
      G P M G V F E F E A F N K G T

136  TTC GGC ATT GTC GAC ATC CTT GCT GAC CTC TCC AAG GAC AAG GGC
      F G I V D I L A D L S K D K G

181  GCC ATC ACC ATC ATC GGT GGA GGT GAC TCC GTC GCT GCC TGC GAG
      A I T I I G G G D S V A A C E

226  CAG TCC GGA CGT GCG GGT GAC ATG TCC CAC ATC TCC ACT GGT GGC
      Q S G R A G D M S H I S T G G

271  GGT GCC TCC CTT GAG CTC ATG GAG GGC AAG GTG CTT CCC GGT GTT
      G A S L E L M E G K V L P G V

326  GCC GCC CTC GCT GAC AAA TAA ATT GCT TGT TTT GTC GCC CCT TAC
      A A L A D K Stop

361  TTG AAC AAA AAG AAA AAA AGC TAC ATA TAT ATG CAT CGA AAG GAT

406  CGC TGT ACC AAT TAA TTG ATT AAC TTA TTA ATT AAT TAC ATC ATT

451  CCT GGG CGA AAA AAA AAA AAA AAA AAA AAA CTT GAG GGG GGG CCC
      XhoI

```

Abbildung 3 - 25 Nukleotidsequenz des PGK-Fragmentes aus *Odontella sinensis*

Nukleotidsequenz, der aus einer cDNA-Bank von *Odontella sinensis* durch PCR amplifizierten Phosphoglycerat-Kinase. Die für die Klonierung in den Vektor verwendete XbaI- bzw. XhoI-Erkennungsschnittstelle ist punktiert unterstrichen. Die Aminosäuresequenz des degenerierten Primers ist kursiv geschrieben.

```

RL1X ODO      -----EKNNRIVKNGIWLRYSSRSGTHNMYREYRDLTLTG
RL1X ARA      -----KNPTTIKNFGIWLRYQSRTGYHNMYKEYRDTTLNG
RL1X DRO      KKT'TGEIVSIKQVYETSPVKIKNFGIWLRYDSRSGTHNMYREYRDLTVGG
RL20 YEA      KKASGEIVSINQINEAHPTKVKNFVWVRYDSRSGTHNMYKEIRDVSRVA
RL1X HUM      KKSSGEIVYCGQVFEKSPLRVKNFGIWLRYDSRSGTHNMYREYRDLTTAG
RL1X RAT      KKSSGEIVYCGQVFEKSPLRVKNFGIWLRYDSRSGTHNMYREYRDLTTAG
53              . ** . * . * . ** * * . * * * * . * * * . .

RL1X ODO      AVS QLYDEMAGRHR-----
RL1X ARA      AVEQMYTEMASRHRVRFPCIQIIK
RL1X DRO      AVTQCYRDMGARHRARAHSIQIIK
RL20 YEA      AVETLYQDMAARHRARFRSIIHILK
RL1X HUM      AVTQCYRDMGARHRARAHSIQIMK
RL1X RAT      AVTQCYRDMGARHRARAHSIQIMK
**      * . * . * * *      130

```

Abbildung 3 - 26 Aminosäurevergleich für das RL1X-Fragment aus *Odontella sinensis*

Vergleich der Aminosäuresequenz des ribosomalen Proteins L18a der 60S-Untereinheit basierend auf einem PCR-Fragment amplifiziert aus der cDNA-Bank aus *Odontella sinensis* (Odo) mit *Arabidopsis thaliana* (Ara), *Drosophila melanogaster* (Dro), *Saccharomyces cerevisiae* (Yea) und den Säugern Mensch (Hum) und Ratte (Rat). Identische Aminosäuren sind mit einem Stern und vergleichbare mit einem Punkt gekennzeichnet.

Zudem zeigt das Fragment 73 % Identität zu YPT2 von *Zea mays* (YPT1 bei 60 %). Identitäten zu YPT2 von Säuger und Pilze liegen bei weniger als 60%.

3.4.4. Das rab5-Fragment

Vom *rab5*-Gen wurde ein ca. 270 Nt große PCR-Fragment isoliert. Das Fragment weist einen 22 Basen langen 5'-untranslatierten Bereich auf und kodiert für 80 (31 %) von durchschnittlich 256 Aminosäuren der bekannten RAB5-Proteine (Herazdovsky et al. 1994; Sinder-Krüger et al. 1995) (Abb. 3-24).

Die Identität der Aminosäuresequenz zu Säugern beträgt ungefähr 71-74 % (Mensch, Hund), zu Pflanzen 73 – 74 % (*Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana*) und zu Pilzen 61 – 69 % (*Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe*).

Tendenziell ähnelt das Fragment mehr der RAB5-Isoform RAB5A bei Säugern bzw. YPT5-1 bei Pilzen. Der amplifizierte N-terminale Bereich von RAB5 beinhaltet drei der vier G-Regionen (G1 bis G3) (Moore et al. 1995). Das PCR-Fragment wurde mit der EcoRI-Schnittstelle im Vektor des Phagen und im degenerierten Primer (Rab5-P5) in pBluescript KS (T7-Orientierung) kloniert.

3.4.5. Die Phosphoglycerat-Kinase (PGK) und das 60S-ribosomale Protein L18a (RL1X)

Die im folgenden beschriebenen PCR-Fragmente stellen zufällig amplifizierte Fragmente dar. Das Genfragment der Phosphoglycerat-Kinase wurde bei niedriger Stringenz durch den degenerierten Primer für die GTPase Sar1p erhalten (Sar1p-P1). Das PCR-Fragment wurde mit XbaI und XhoI in pBluescript KS überführt und sequenziert (Abb. 3-25).

Das Genfragment der Phosphoglycerat-Kinase weist die kodierende Region der letzten 91 Aminosäuren (von 461 Aminosäure) auf. Die Identität des Proteinfragmentes liegt bei 67 % gegenüber der PGK aus *Chlamydomonas reinhardtii* (PGKH), *Arabidopsis thaliana* (PGKH) und Weizen (PGKY). Die cytoplasmatische und glycosomale PGK von *Trypanosoma congolens* weist eine Identität von 57 % auf.

Das PCR-Fragment für das Gen des 60S-ribosomalen Proteins L18a wurde mit dem Primer Tpt-P2 bei niedriger Stringenz amplifiziert und mittels den vorhandenen EcoRI-Schnittstellen in pBluescript KS kloniert (Abb. 3-26). Die ca. 450 Bp langen Fragmente wurde anschließend vom T7-Promoter her ansequenziert.

Das Fragment kodiert für mehr als 77 Aminosäuren. Durchschnittlich besitzt das RL1X-Protein 173 Aminosäuren. Dargestellt ist die *Odontella*-Aminosäuresequenz im Vergleich zu anderen Organismen (Abb. 3-26). Die höchste Ähnlichkeit zeigt das Fragment gegen das L18a-Protein von *Arabidopsis thaliana*, gefolgt von den Säugern. Die Pilze zeigen die niedrigste Identität.

3.5. Untersuchung des Proteintransportes innerhalb der Diatomeen-Plastiden

3.5.1. Aufbau eines thylakoidalen Importsystems für Kieselalgen

Für die weitergehende Untersuchung des Proteintransportes innerhalb der Plastiden von Kieselalgen war es notwendig, ein thylakoidales Importsystem aufzubauen. Als Ausgangsmaterial dienten nach Wittpoth et al (1998) isolierte Chloroplasten aus den großen marinen Diatomeen-Zellen *Odontella sinensis* und *Coscinodiscus granii*. Die etablierte Thylakoid-Isolationsmethode beruht auf einem osmotischen Aufbruch der Plastidenmembran zur Freisetzung der Thylakoide. Es war für die spätere Verwendung von Bedeutung, die Thylakoide schonend zu isolieren, so daß sie befähigt waren, bei Belichtung einen Protonengradient über die Membran aufzubauen.

Um zuerst eine Einordnung zu erhalten, bei welchen osmotischen Bedingungen ein Aufbruch der Plastiden vorliegt, wurden isolierte Plastiden von *Coscinodiscus granii* in unterschiedlichen osmolalen Medien aufgebrochen (Daten nicht gezeigt). Die verschiedenen osmolalen Medien wurden zuerst mit einer Mischung aus Plastiden-Isolationsmedium II (0,74 Osmolal) und einen HEPES/MgCl₂-Puffer (50 mM Hepes, 5 mM MgCl₂) hergestellt.

Der Grad des Plastidenaufbruchs wurde in einer Clark-Sauerstoffelektrode mittels der Hill-Reaktion gemessen (Kap. 2.8.4). Die Plastiden zeigten aufgrund der O₂-Messung (Hill-Reaktion) eine hohe „Intaktheit“ bis zu einem Anteil von ca. 40 % des Plastiden-Isolationsmediums II im Meßmedium. Eine Überprüfung der Ergebnisse mittels Messung der biochemisch komplexeren CO₂-Fixierung ergab jedoch, daß die Diatomeen-Plastiden schon bei einem Anteil des Plastiden-Isolationsmediums II unter 75 % keine Sauerstoffentwicklung mehr zeigten und somit nicht mehr „intakt“ waren.

Für die Messungen des Protonengradienten und für die nachfolgenden Importexperimente wurde in Anlehnung an die Isolationsmedien für Thylakoide aus höheren Pflanzen anstelle einer Mischung von Isolationsmedium II der HEPES/MgCl₂-Puffer mit unterschiedlichem Gehalt an Sorbit verwendet. Sorbit stellt den Hauptbestandteil des Isolationsmediums II dar und besitzt in wäßrigen Lösungen eine Korrelation zwischen Osmolarität und Osmolalität von ungefähr eins.

Im Verlauf der Thylakoidisolation wurden die Thylakoide mehrmals zur Entfernung vom stromalen Extrakt gewaschen und nach den anschließenden Zentrifugationen über eine Pipettenspitze resuspendiert (bzw. geschert). Der zeitliche Aufwand für eine Thylakoidisolation ausgehend von den Plastiden betrug zwischen 30 bis 40 Minuten.

3.5.1.1. Untersuchungen zum Aufbau eines Protonengradienten bei isolierten Thylakoiden aus Kieselalgen

Für die Untersuchung der verschiedenen Proteintransportwege in die Diatomeen-Thylakoide ist die Befähigung zum Aufbau eines transmembranen Protonengradienten über die Thylakoidmembran wichtig.

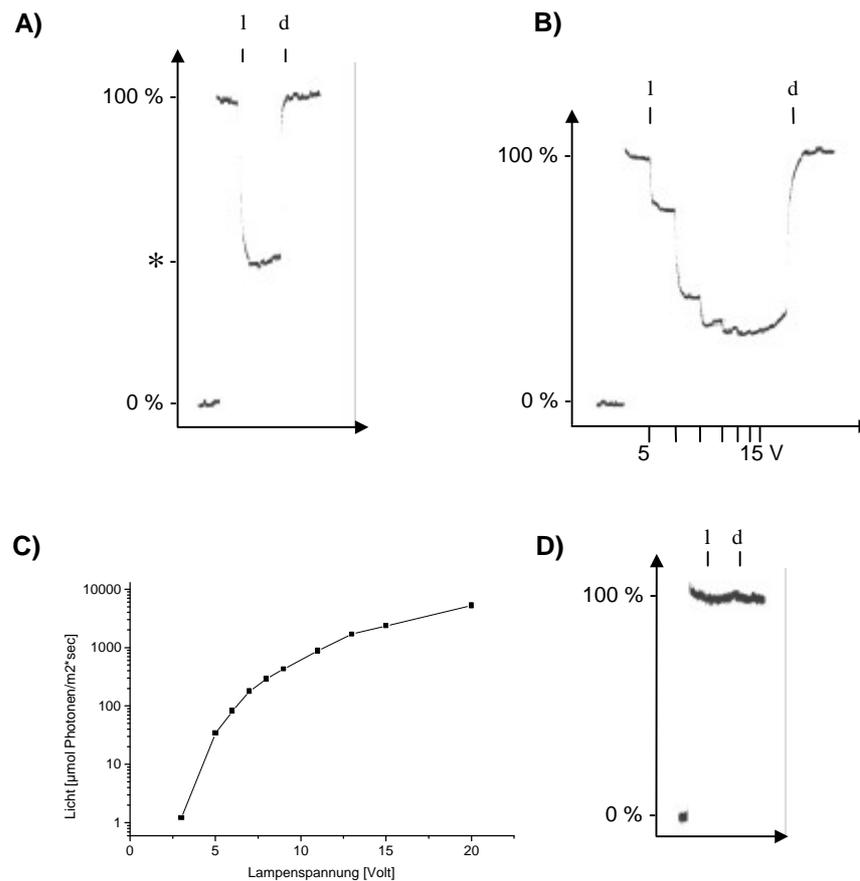


Abbildung 3 - 27 Aufbau eines transmembranen Protonengradienten über die Thylakoidmembran von *Coscinodiscus granii*

Qualitative Betrachtung des Protonengradienten über die Thylakoidmembran von *Coscinodiscus granii* mit dem Fluoreszenzfarbstoff 9-Aminoacridin (9AA). (A) Signalverlauf des ΔpH -Sprunges bei Belichtung. Es erfolgt ein Fluoreszenzsprung bei Zugabe von 9-Aminoacridin von 0 auf 100%. Bei Belichtung (l) sinkt die Fluoreszenz (*) ausgelöst durch den ΔpH -Aufbau über die Membran und steigt wieder bei Dunkelheit (d). Der horizontale Pfeil symbolisiert Laufrichtung des Signales (Zeitachse). (B) Messung des ΔpH -Sprunges bei unterschiedlicher Lichtintensität (Lampenspannung). Die Lampenspannung wurde in 2-Volt-Schritten von 5 auf 15 Volt erhöht. (C) Verhalten der Lichtintensität zur angelegten Lampenspannung. (D) Inhibition des Protonengradienten durch vorherige Proteasebehandlung (Thermolysin 0,2 mg/ml, 30min., Eis). (A, D) Es wurde eine Lampenspannung von 7 Volt ($180 \mu\text{mol Photonen}/\text{m}^2\text{sec}$) angelegt.

Die Betrachtung des ΔpH -Aufbaus über die Membran erfolgte qualitativ mit dem Fluoreszenzfarbstoff 9-Aminoacridin (9AA). Nach Grzesiek und Dencher (1988) ist die Fluoreszenz des Farbstoffes abhängig von dem Grad der Ladungen an der Membran. Es wird vermutet, daß durch die Anbindung des Farbstoffes an die Membran aufgrund einer ΔpH -Änderung zu einer Löschung der Fluoreszenz kommt. Dagegen wurde auch vermutet, daß das 9-Aminoacridin, welches im unprotonierten Zustand frei die Thylakoidmembran durchdringen kann, im Thylakoidlumen sich aufkonzentriert und dabei gequencet wird (Schuldiner et al. 1972). Eichreihen zur Bestimmung der absoluten ΔpH -Werte wurden nicht durchgeführt.

Abbildung 3-27A zeigt exemplarisch eine Messung des Protonengradienten: Bei Zugabe von 9-Aminoacridin zu den Thylakoiden steigt die Farbstoff-Fluoreszenz auf den für den pH-Wert des Mediums maximalen Betrag an (Wert 100%). Der Grundwert (0%) wird von der Autofluoreszenz der Thylakoide gebildet. Bei Belichtung sinkt die Fluoreszenzrate durch die Ausbildung eines ΔpH -Gradienten ab.

A)	Konzentration an Sorbit im Lagermedium (mM)	Konzentration an Sorbit im Meßmedium (mM)	maximale Fluoreszenzlöschung (%)	Fluoreszenzzunahme (%) pro Zeit (min)
	0	0	47,8 (60,3)	14,7 (18,3)
	170	170	49,2 (60,6)	10,8 (11,1)
	340	340	54,5 (65,3)	3,3 (4,7)
B)	Konzentration an Sorbit im Lagermedium (mM)	Konzentration an Sorbit im Meßmedium (mM)	maximale Fluoreszenzlöschung (%)	Fluoreszenzzunahme (%) pro Zeit (min)
	0	0	34,8	7,4
	0	340	27,2	3,8
	340	340	27,6	1,6
	340	680	29,5	2,2
	340 *	680	32,9	2,1
	340	340	Mehrfachbelichtung 40,3 / 34,9/ 30,3	-

Abbildung 3 - 28 Aufbau und Stabilität des Protonengradienten an isolierten Thylakoiden bei verschiedenen osmolaren Bedingungen

Tabellarische Auflistung der prozentualen 9-Aminoacridin-Fluoreszenzlöschung bei unterschiedlichen Meß- bzw. Lagermedien sowie Isolationsbedingungen während der Belichtung von Thylakoiden aus *Coscinodiscus granii*. Meß- bzw. Thylakoidlagermedien unterschieden sich in den angeführten Konzentrationen an Sorbit im HM-Puffer. Der Grad der Fluoreszenzlöschung korreliert mit der Größe des Protonengradienten. (A) Überprüfung des Δ pH-Aufbaues bei verschiedenen Isolations- und Meßbedingungen, (B) Variation der Meß- und Lagerbedingungen, (A, B) : verschiedene Meßtage. Die Messung erfolgte bei 180 μ mol Photonen/ m^2 sec bzw. 290 μ mol Photonen/ m^2 sec (in Klammern angegeben). Der Stern markiert in HM-Puffer aufgebrochene Plastiden, die anschließend in dem angegebenen Lagermedium aufgenommen wurden.

Der Fluoreszenzabfall und damit der Protonengradient ist abhängig von der Belichtungsintensität. Die Belichtungsstärke innerhalb der Meßkammer steigt exponentiell gegenüber der angesetzten Lampenintensität an (Abb. 3-27C).

Eine Erhöhung der Lampenintensität führt zu einer asymptotischen Annäherung an einen minimalen Fluoreszenzwert, der durch Lichtsättigung des Photosystems bestimmt wird (Abb. 3-27B). Die weitere Steigerung der Belichtungsintensität bewirkt durch Schädigung der Thylakoide einen Anstieg der Fluoreszenz.

Eine vorherige Proteasebehandlung der Thylakoide (Thermolysin 0,2 mg/ml, Eis, 30 min.) (Abb. 3-27D) oder die Zugabe des Ionen/Protonentauschers Nigericin (Daten nicht gezeigt) inhibieren die Ausbildung eines Protonengradienten.

Messungen mit unterschiedlich isolierten Diatomeen-Thylakoiden zeigen, daß der Aufbau eines Protonengradienten unabhängig von dem verwendeten Aufbruchmedium ist. Wie in Abb. 3-28A zu erkennen, nimmt jedoch mit sinkendem Sorbitgehalt das Vermögen zur Erhaltung dieses Protonengradienten über die Belichtungszeit, signalisiert durch die Fluoreszenzzunahme pro Zeit, ab (3,3 % bis 14,7 % pro Minute). Die vergleichbaren Fluoreszenzlöschungen zeigen, daß trotz der unterschiedlichen Thylakoid-Isolationsmedien die Plastiden im Verlauf der Isolation vollständig aufgebrochen wurden.

Eine Stabilisierung des Protonengradienten während der Belichtung findet sich bei Thylakoiden, die in Puffer (0 mM Sorbit) isoliert und gelagert, aber zur Messung in einem höher osmolaren Medium (340 mM) aufgenommen wurden (Abb. 3-28B).

Ebenso führt ein kurzfristiger Plastidenaufschluß (2 min) in HM-Puffer mit anschließender Isolation und Messung im Thylakoid-Isolationsmedium mit 340 mM Sorbit (Abb. 3-28B, *) zu einer höheren Stabilität des Protonengradienten als bei Proben, die nur mit Puffer isoliert und gemessen wurden. Die Fluoreszenzlöschung und die Fluoreszenzzunahme pro Zeit liegen in der Größenordnung von Proben, die direkt mit 340 mM Sorbit isoliert wurden.

Die Thylakoide waren auch bei mehrfacher, hintereinander folgender Belichtung in der Lage einen ΔpH -Gradienten aufzubauen. Die erste maximale Fluoreszenzlöschung ($=\Delta\text{pH}$) konnte jedoch nicht mehr erreicht werden. Die Wartezeit zur Regeneration zwischen den Belichtungszeiten betrug 3 min (Abb. 3-28B).

Für die weiteren Untersuchungen wurde zur Sicherstellung eines vollständigen Aufbruchs der Plastiden ein 2-minütiger Aufschluß in HM-Puffer (50 mM HEPES, 5 mM MgCl_2) sowie eine Waschung bzw. Lagerung der Thylakoide in Puffer mit 340 mM Sorbit ausgewählt. Alle Thylakoide wurden erst zum Schluß in das für den Import entscheidende Medium (mit bzw. ohne stromalen Extrakt) aufgenommen.

3.5.2. Charakterisierung des Thylakoidimports von FCP

Für die Funktion der plastidären Proteine ist es wichtig, nach dem Chloroplasten-Import an den richtigen Ort innerhalb der Plastiden zu gelangen. Da die Diatomeen evolutionär weit von den höheren Pflanzen entfernt liegen, stellte sich die Frage, ob sich Unterschiede zu dem Thylakoidtransport der höheren Pflanzen erkennen lassen. Die ersten Untersuchungen des Proteintransportes in Diatomeen-Thylakoide wurden mit dem einzigen verfügbaren thylakoidalen Protein aus *Odontella sinensis*, dem FCP-Protein, durchgeführt. Zur Erweiterung der Untersuchung wurden nachfolgend Thylakoid-Proteine aus höheren Pflanzen verwendet.

Die nachfolgend aufgeführten Integrationsraten bzw. Restaktivitäten wurden durch Messung der Radioaktivität von *in-vitro*-translatiertem Protein mittels dem Fujifilm-Phosphorimager bestimmt. Sie berechnen sich nach der gelelektrophoretischen Auftrennung aus der verbleibenden Radioaktivität der betrachteten Proteine in den Wasch- bzw. Proteaseansätze geteilt durch die Aktivität einer unbehandelten Probe (=100%). Der Prozentsatz korreliert mit der Menge an integriertem bzw. importiertem Protein.

3.5.2.1. Nachweisbedingungen für die Integration des FCP-Proteins

Vergleichende Untersuchungen zu den Lichtsammelkomplex-Proteinen (LHC-Proteine) der höheren Pflanzen weisen darauf hin, daß die Fucoxanthin-Chlorophyll-a,c-bindenden Proteine (FCP) der Diatomeen in Membranen integrieren, durch das Fehlen einer Thylakoidtransportdomäne aber dabei nicht prozessiert werden (Eppard und Rhiel 1998). Um eine Aussage zur Membranintegration des FCP-Proteins zu erhalten, wurden verschiedene Waschmedien für thylakoidale Membranproteine analog den Untersuchungen von Breyton et al. (1994) für den Nachweis getestet (Abb. 3-29A). Nach Breyton et al. führt Harnstoff (6,8 M) zur stärksten Abtrennung nicht-membranintegraler Proteine sowie zusätzlich zu einer geringeren Abtrennung intrinsischer, membranständiger Proteine. Als ein etwas schonenderes Waschmedium als Harnstoff wurde KSCN (2 M) beschrieben. NaCl (2 M) sowie NaCO_3/DTT (85 mM) führen dagegen zu keinerlei Verlusten von Membranproteinen.

Wie Abbildung 3-12A zeigt, bewirken die Waschschrte mit KSCN (2M), Harnstoff (6,8 M) und NaCl (2M) nach einer Inkubation von translatiertem mFCP bzw. iFCP mit Diatomeen-Thylakoiden die stärkste Ablösung, wobei nach Behandlung mit KSCN die geringste verbleibende Radioaktivität vorlag. Die Waschung mit NaCO_3/DTT führte zur schlechtesten Entfernung von ungebundenem FCP (77 bzw. 92 %).

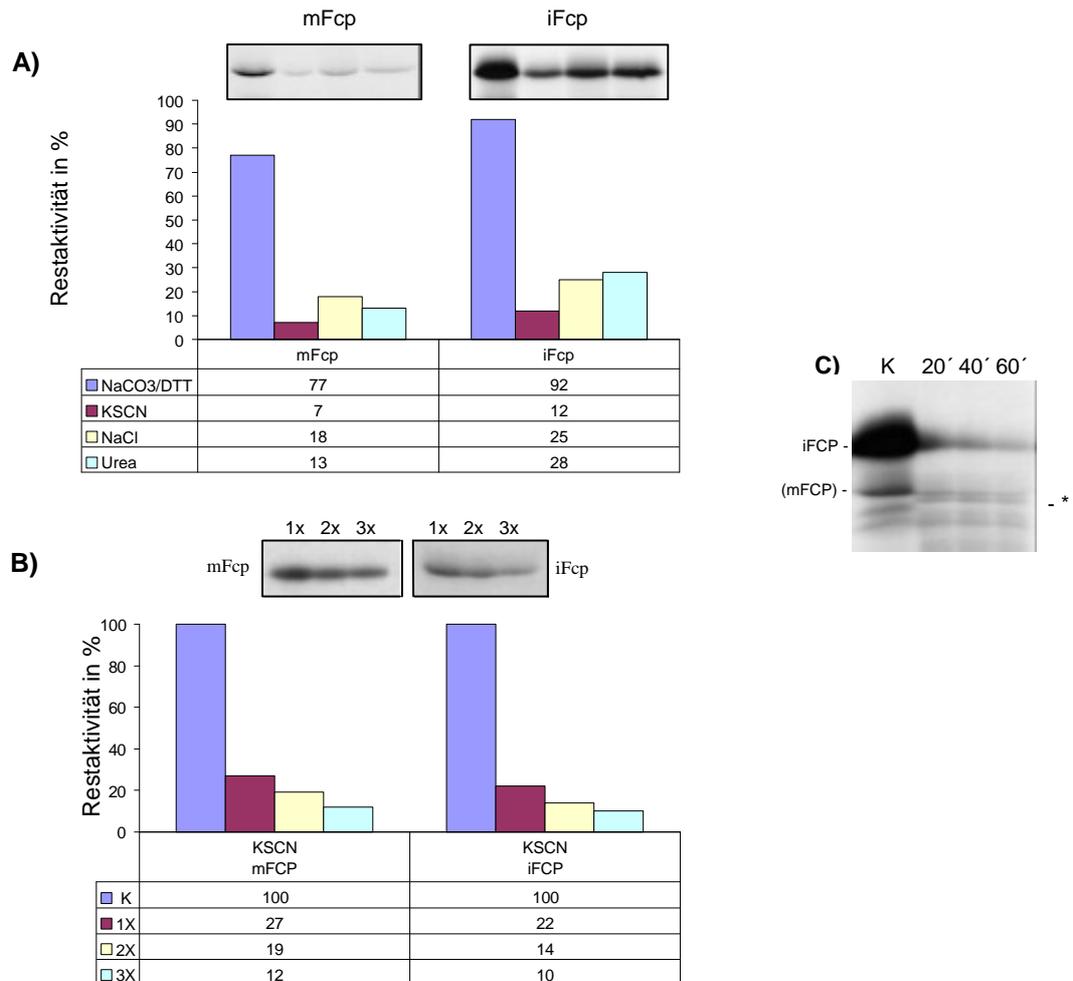


Abbildung 3 - 29 Nachweis der FCP-Integration in Thylakoide von *Coscinodiscus granii*

Untersuchung der Effizienz von Waschmedien zur Entfernung nicht-integrierter FCP-Proteine nach einem Importexperiment in *Coscinodiscus*-Thylakoide (A) und Betrachtung der Stabilität von integriertem FCP bei einmaliger bis dreimaliger Waschung (B). (C) Zeitreihe zur Stabilität der Integration von iFcp gegenüber nachträglicher Proteasebehandlung (Thermolysin 0,2 mg/ml, 2 mM CaCl₂, Eis).

(A,B) Für die Inkubation mit den Diatomeen-Thylakoiden wurde reifes FCP (mFcp) und das Importintermediat iFcp verwendet. Ferner wurden, soweit aufgeführt, die Thylakoide anschließend mit den Waschmedien: 2 M KSCN, 85 mM Na₂CO₃/DTT, 2 M NaCl, 6,8 M Harnstoff gewaschen. Den Diagrammen sind tabellarisch die verbleibenden Radioaktivitäten (in Prozent) (=Restaktivitäten) aufgeführt. Die mit dem Fujifilm Phosphorimager ausgewerteten Autoradiographien sind den Diagrammen angefügt und zeigen die radioaktiv markierten Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem SDS-PAA-Gel.

Alle Waschproben wurden während der Waschgänge zweimal stark gemischt (Vortex) und zweimal zur Vesikelbildung einem Gefrier-/Auftauzyklus unterworfen. Die nach den unterschiedlichen Waschungen verbleibenden Radioaktivitäten bestätigen die Membranintegration der FCPs.

Um sicher zu stellen, daß nach einer einmaligen Waschung alles ungebundene FCP-Protein entfernt wurde, wurden die Importansätze von iFcp und mFcp mehrfach mit KSCN (2M) gereinigt. Je ein Ansatz wurde einmal, zweimal oder dreimal den Vortex- und Gefrierzyklen unterworfen. Abb. 3-29B zeigt, daß auch nach einer dreimaligen Waschung FCP in der Membran integriert bleibt. Die mehrfachen Waschschrte führen jedoch zu einer sukzessiven Auswaschung von integriertem Protein. Waschserien mit Harnstoff (6,8 M) bestätigen dieses Ergebnis (Daten nicht gezeigt).

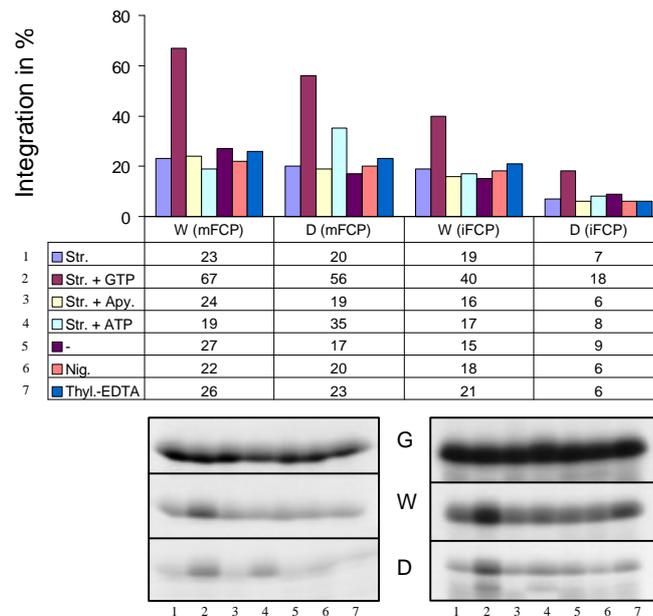


Abbildung 3 - 30 Integration von FCP in isolierte Thylakoide aus *Odontella sinensis*

Inkubation von mFCP- und iFCP-Protein mit isolierten Thylakoiden aus *Odontella* unter verschiedenen Bedingungen. Den Diagrammen sind tabellarisch die Integrationsraten (in Prozent) und die ausgewerteten Autoradiographien der radioaktiv markierten Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung in einem SDS-PAA-Gel beigelegt.

(G: Gesamtintegrationsansatz, W: Ansatz mit nachträglicher Waschung mit 2 M KSCN, D: Ansatz mit nachträglicher Proteasebehandlung (Thermolysin 0,2 mg/ml, 2 mM CaCl₂, Eis, 30 min.). Die Ansätze wurden mit stromalen Extrakt (1:1 verd.) (Str.), mit 8 mM GTP (GTP), mit 8 mM ATP (ATP), mit Zugabe von Nigericin 4 µM (Nig.), ohne jegliche Zusätze (-) und mit einer Vorbehandlung der Thylakoide und des Translationsansatzes mit 0,25 U Apyrase, 15 min., Eis oder einer Vorbehandlung der Thylakoide mit 5 mM EDTA (Thyl.-EDTA) durchgeführt.

Als weitere Kontrolle der Membranintegration von FCP-Proteinen wurden die Importansätze nach der Inkubation zur Degradation nicht-integrierter Proteine mit Proteasen behandelt. Wie in Abb. 3-29C zu erkennen ist, ist schon nach weniger als 20 Minuten der größte Teil von iFCP degradiert. Eine vollständige Degradation wird aber auch nach einer Stunde nicht erreicht. Wie in der Literatur für LHCs beschrieben, ist auch integriertes FCP teilweise für Proteasen zugänglich und bildet im weiteren stabile Degradationsprodukte.

In den weiteren Untersuchungen wurden zum Nachweis der FCP-Integration die Importansätze einerseits mit KSCN (2M) gewaschen oder andererseits mit Proteasen behandelt.

3.5.2.2. Abhängigkeiten der FCP-Integration in Diatomeen-Thylakoide

Nach Etablieren der Kontrollbedingungen für die FCP-Integration stellte sich die Frage, welcher thylakoidale Proteintransportweg bei Kieselalgen für die FCP-Integration verwendet wird. Um diese Fragestellung zu klären, wurden die Bedingungen für die bekannten Thylakoidtransportwege von höheren Pflanzen in FCP-Importansätzen getestet.

Abbildung 3-30 zeigt, daß ein Transport über den Sec-Weg für die FCP-Proteine nicht angenommen werden kann. Eine Eliminierung von restlichem ATP aus dem Translationsansatz durch Apyrase (0,25 U), einer starken ATPase mit schwächerer ADPase-Eigenschaft, oder die zusätzliche Zugabe von 8 mM ATP zum Inkubationsansatz zeigen keinerlei Effekte auf die Integration. Ebenso scheint das SecA-Protein nach Hemmung mit Natriumazid (5 mM) nicht beteiligt zu sein.

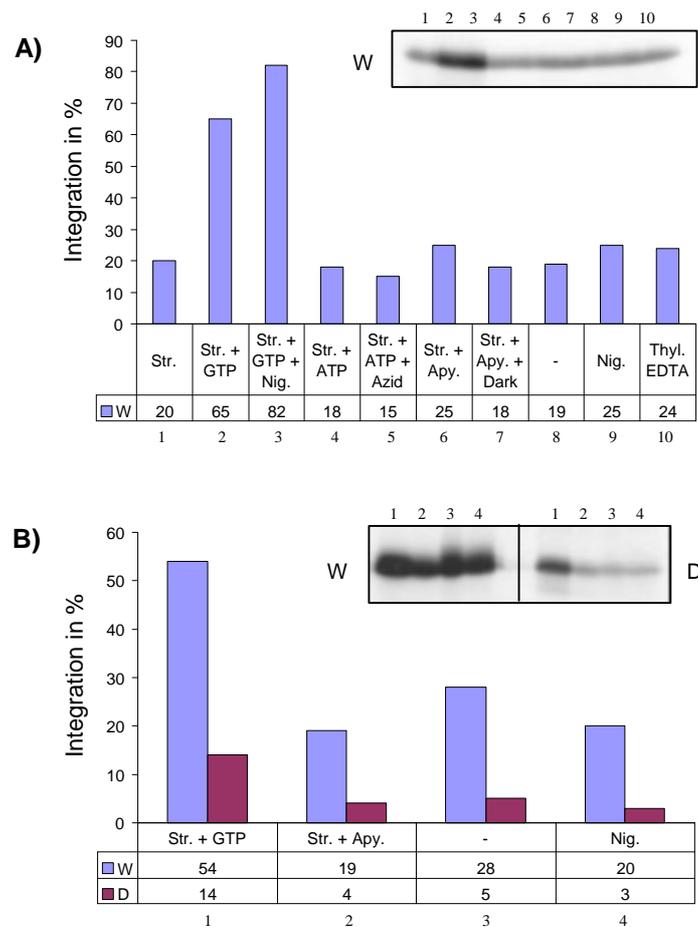


Abbildung 3 - 31 Integration von iFCP und pFCP in Thylakoide von *Coscinodiscus granii*

Import von iFCP (A) und pFCP (B) aus *Odontella* bei unterschiedlichen Bedingungen in isolierte Thylakoide von *Coscinodiscus granii*. Oberhalb des Diagrammes sind die Autoradiographien der radioaktiv markierten Proteine nach der elektrophoretischen Auftrennung im SDS-PAA-Gel und unterhalb tabellarisch die mit dem Fujifilm Phosphorimager gemessene FCP-Restaktivitäten (%) aufgeführt (W: Ansatz mit nachträglicher Waschung mit 2 M KSCN, D: Ansatz mit nachträglicher Proteasebehandlung (Thermolysin 0,2 mg/ml, Eis, 30 min.).

Die Ansätze wurden mit stromalen Extrakt (1:1 verd.) (Str.), mit 8 mM GTP (GTP), mit 8 mM ATP (ATP), mit Zugabe von Nigericin 4 μ M (Nig.) oder 5 mM Azid (Azid), ohne Zusätze oder stromalen Extrakt (-) und mit einer Vorbehandlung der Thylakoide und des Translationsansatzes mit 0,25 U Apyrase, 15 min., Eis oder einer Vorbehandlung der Thylakoide mit 5 mM EDTA (Thyl.-EDTA) durchgeführt.

Auch die Triebkraft für den Sec-unabhängigen Importweg, ein Protonengradient über die Thylakoidmembran, ist nicht entscheidend an der Integration von FCP in die Thylakoide beteiligt. Belichtung der Thylakoide während der Inkubation in Gegenwart oder unabhängig von stromalem Extrakt sowie die Verwendung des Δ pH-Transportweg-Inhibitors Nigericin (4 μ M), welcher einen schnellen Austausch von Protonen und kleinen einwertigen Kationen wie Kalium über die Membran bewirkt, zeigen keinen Effekt auf den Import.

Erst die Zugabe von GTP (8 mM) und stromalen Extrakt zu Importansätzen mit *Odontella*-Thylakoiden führt zu einer signifikanten Steigerung an integriertem mFCP oder iFCP (Abb. 3-30). Der importierte Anteil liegt nach Waschung der Thylakoide mit 2 M KSCN für mFCP bei 67% und für iFCP bei 40 % des eingesetzten Proteins. Die Werte für die Proteasekontrollen liegen bei 56 bzw. 18 %. Im Gegensatz dazu verbleiben bei allen anderen mFCP-Ansätzen nach Waschung durchschnittlich 24 % bzw. nach Proteasebehandlung 20 % der Proteine.

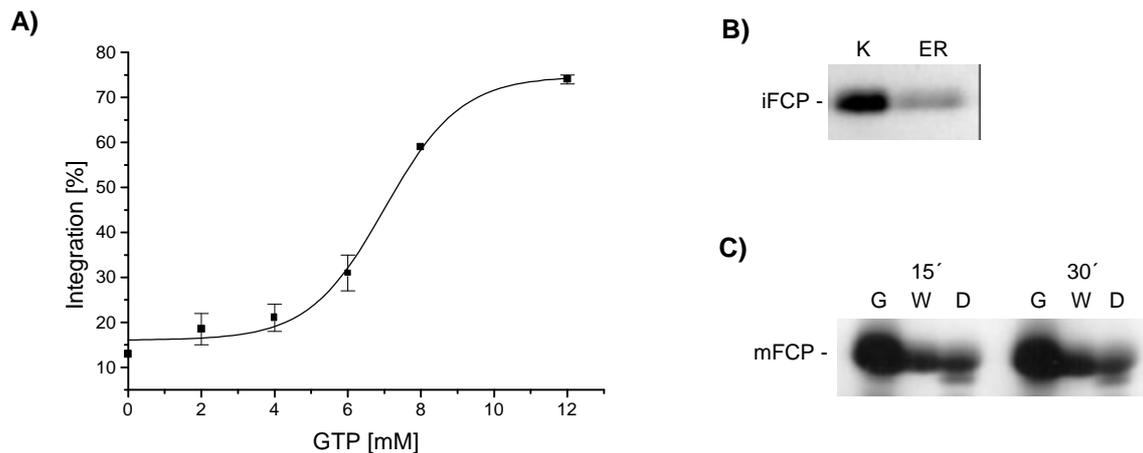


Abbildung 3 - 32 GTP-abhängige und spontane Integration von FCP

mFCP-Integrationsexperiment mit *Coscinodiscus*-Thylakoiden, stromalen Extrakt und einer variablen GTP-Konzentration (A). Integrationsansatz von iFCP mit Hundepankreasmitochondrien nach Waschung (KSCN 2M) und Isolation der ER-Vesikel (B). Integration von mFCP in proteolytisch vorbehandelte Thylakoide aus *Coscinodiscus* (Thermolysin 0,2 mg/ml, Eis, 15 bzw. 30 Minuten) (C).

(A) Die Integrationsrate wurde durch Quantifizierung von Autoradiographien von gelelektrophoretisch aufgetrennten, radioaktiv markiertem mFCP mittels dem Fujifilm Phosphorimager erhalten. (B, C) Autoradiographie von radioaktivem iFCP bzw. mFCP nach gelelektrophoretischer Auftrennung im SDS-PAA-Gel.

K: Translationsansatz zur Kontrolle, G: Gesamtimportansatz ohne Nachbehandlung, W: Importansatz mit nachträglicher Waschung mit 2 M KSCN, D: Importansatz mit nachträglicher Proteasebehandlung (Thermolysin 0,2 mg/ml, Eis, 30 min.), ER:

Die restlichen iFCP-Ansätze liegen bei 18% bzw. 7%. Dies bedeutet eine Steigerung der Membranintegration um einen Faktor von rund 2,8 für mFCP und ungefähr 2,3 für iFCP (Basis: Ansatz „nur stromaler Extrakt“).

Die gleichen Effekte lassen sich in heterologen Integrationsexperimenten mit Thylakoiden aus *Coscinodiscus granii* und *Odontella*-iFCP (Abb. 3-31A) bzw. mFCP (Daten nicht gezeigt) erkennen. Die Gegenwart von GTP und stromalem Extrakt steigern die iFCP-Integration im Ansatz um mind. 300% (Basis: Probe „nur stromaler Extrakt“).

Die Eliminierung des Protonengradienten durch Inkubation mit Nigericin in Gegenwart von GTP und stromalem Extrakt scheint zudem zu einer Verbesserung der Integration zu führen.

Die strenge Abhängigkeit des Imports von GTP in Anwesenheit von stromalem Extrakt zeigt sich bei Abb. 3-32A. Mit steigender GTP-Konzentration im Ansatz steigt die verbleibende Radioaktivität von mFCP in der Thylakoidmembran nach Waschung mit KSCN. Bei 8 mM GTP im Ansatz wird ungefähr 80 % der maximalen Importaktivität erreicht.

Die beiden Transportdomänen von pFCP haben keinen Einfluß auf die Integration in die Diatomeen-Thylakoide. Wie bereits gezeigt, wird das Transportintermediat iFCP ebenso wie mFCP integriert. Auch die Inkubation von translatiertem FCP-Vorläuferprotein (pFCP) mit den Thylakoiden von Kieselalgen (hier *Coscinodiscus granii*) führt zu einer Membranintegration (Abb. 3-31B). Die Zugabe von GTP und stromalen Extrakt bewirken eine Importsteigerung von ungefähr 280 %.

3.5.2.3. Untersuchungen zur unabhängigen Integration von FCP

Wie die Abb. 3-30 bis 3-33 zeigen, erfolgt eine Integration der verschiedenen FCP-Varianten auch ohne jegliche Zugabe von stromalen Faktoren bzw. Energielieferanten.

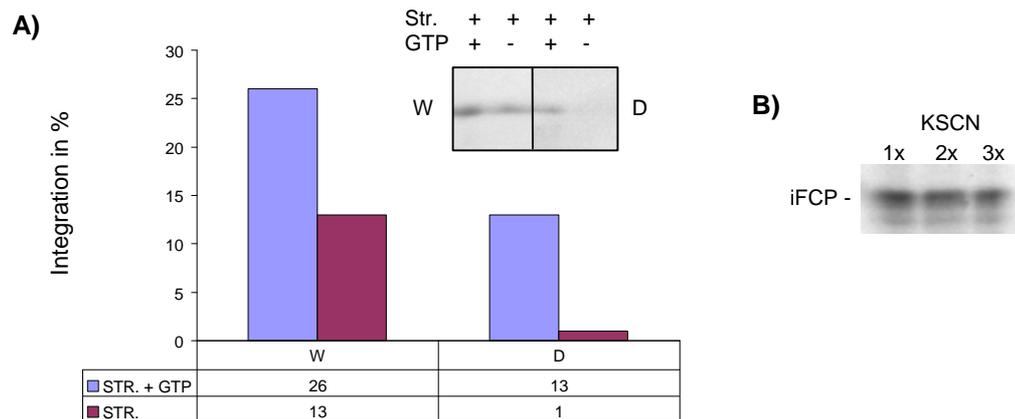


Abbildung 3 - 33 Import von intermediärem FCP-Protein aus Diatomeen in Thylakoide von Erbsen

GTP-abhängige Integration von iFCP in Thylakoide aus Erbsen in Gegenwart von Stroma (A). Untersuchungen zur Stabilität der spontanen iFCP-Integration in Erbsenthylakoide nach ein- bis dreimaliger Waschung mit 2 M KSCN (B). Str.: Stromaler Extrakt, GTP: 8 mM GTP, W: Gesamtimportansatz nach Waschung mit 2 M KSCN, D: Gesamtimportansatz nach nachträglicher Proteasebehandlung (Thermolysin 0,2 mg/ml, Eis, 30min.). Bestimmung der Integrationsmenge durch Quantifizierung der dargestellten Autoradiographien von integriertem, radioaktiv markiertem Protein nach Auftrennung im SDS-PAA-Gel im Fujifilm Phosphorimager.

Das gleiche Resultat findet man ebenfalls, wenn die Thylakoide vor dem Importexperiment mit EDTA (Abb. 3-31A) oder Proteasen (Abb. 3-32C) behandelt worden sind. Weder die Inkubation der Thylakoide mit Thermolysin noch mit Trypsin verhindern die Integration.

Daß es sich bei der spontanen Integration um einen membranunabhängigen Prozeß handelt, zeigt die Inkubation von iFCP-Proteinen (Abb. 3-32B) mit Hundepankreas-mikrosomen. Ohne einen kotranslationalen Transport zu ermöglichen, wurde der iFCP-Translationsansatz mit ER-Vesikeln inkubiert, anschließend analog den Thylakoid-Integrationsexperimenten gewaschen und das ER wieder isoliert (Kap. 2.11.3). Die Probe wurde vor der Isolation der Vesikel ca. um den Faktor 1200 mit 2 M KSCN verdünnt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung zeigte sich ein Verbleib von rund 13% der eingesetzten iFCP-Proteine (39,8 % der Kontrolle (1 µl iFCP)).

3.5.2.4. FCP-Integration in Thylakoide von höheren Pflanzen

Da FCP- und LHC-Proteine scheinbar über den SRP-Weg in die Thylakoidmembran integriert werden, liegt die Vermutung nahe, daß das Diatomeen-SRP-Transportsystem die LHC-Proteine und, vis-à-vis, das SRP-System der höheren Pflanzen das FCP-Protein erkennen und importieren kann.

Zu diesem Zweck wurde zuerst die Stabilität der Integration von iFCP-Protein in den Erbsen-Thylakoiden untersucht. Hierzu wurde iFCP-Translationsansatz mit Erbsen-Thylakoiden inkubiert und nachfolgend mit KSCN (2M) und Urea (6,8M) ein bis dreimal gewaschen (Abb. 3-33B). Auch bei einer dreimaligen Waschung verbleibt ein Teil des Diatomeen-Proteins in der Thylakoidmembran. Wie auch bei der Waschreihe mit Kieselalgen-Thylakoiden ist KSCN schonender als die Harnstoffwaschung (Daten nicht gezeigt).

Die Zugabe von GTP (8 mM) und stromalen Faktoren zum Importansatz zeigt, daß das FCP-Protein der Kieselalgen von dem SRP-System der höheren Pflanzen erkannt wird. Das iFCP-Protein integriert dabei mindestens doppelt so gut in Erbsenthylakoide wie ohne GTP-Zusatz (Abb. 3-33A).

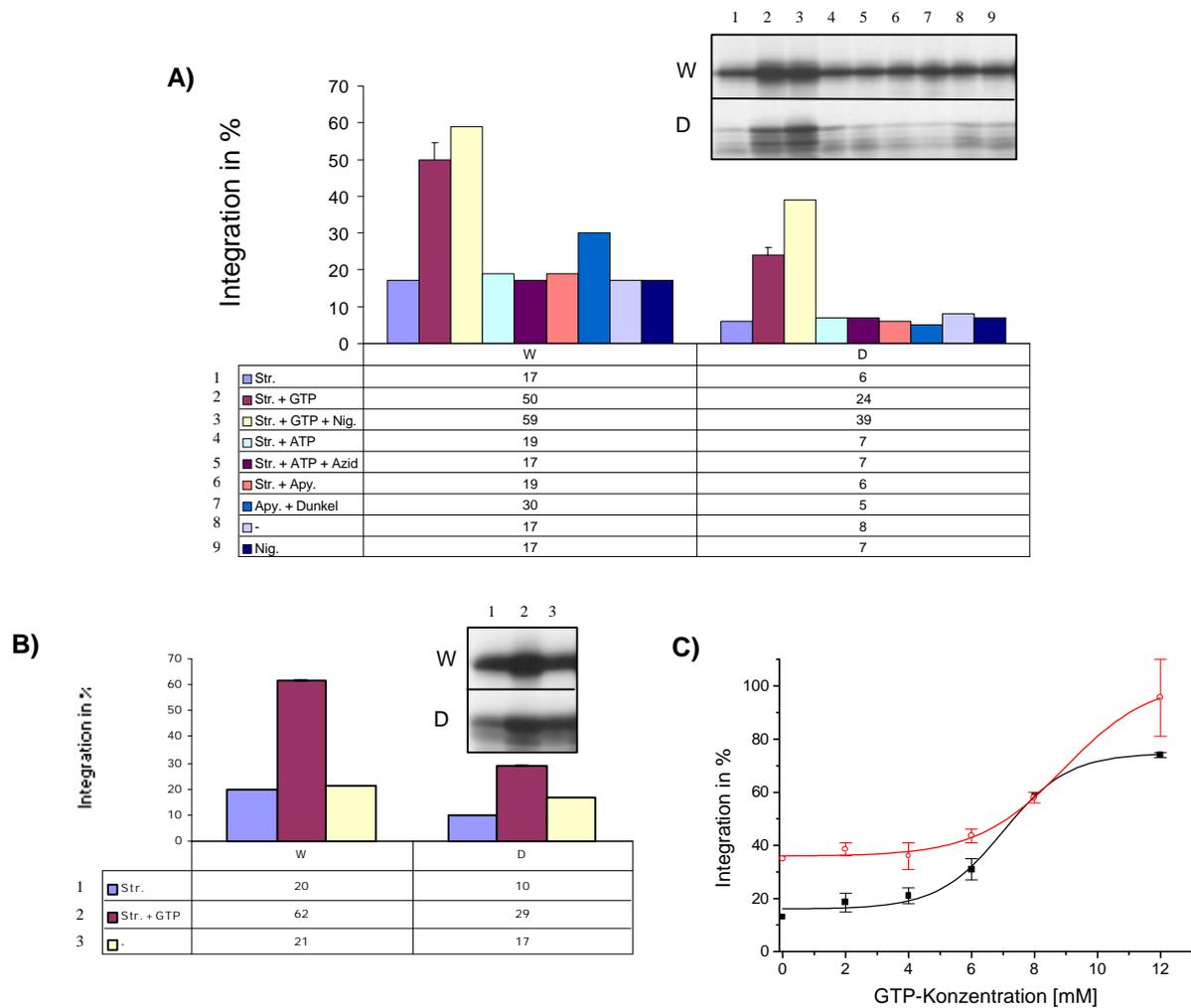


Abbildung 3 - 34 GTP-abhängige Integration von LHCs in Thylakoide aus Kieselalgen

Inkubation von LHC-Protein aus Erbse (A) bzw. LHCa1-Protein aus Arabidopsis (B) mit Thylakoiden der Kieselalge *Coscinodiscus granii* unter verschiedenen Bedingungen. Vergleich der GTP-Abhängigkeit bei der Integration von LHC Pea (○) und mFCP (■) in Gegenwart von stromalem Extrakt in Thylakoide aus *Coscinodiscus* (C). Oberhalb des Diagrammes sind die mit dem Fujifilm Phosphorimager ausgewerteten Autoradiographien der im SDS-PAA-Gel gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteine dargestellt und unterhalb tabellarisch die gemessene FCP-Integration (%) aufgeführt. W: Ansatz mit nachträglicher Waschung mit 2 M KSCN, D: Ansatz mit nachträglicher Proteasebehandlung (Thermolysin 0,2 mg/ml, Eis, 30 min.). Die Ansätze wurden mit stromalem Extrakt (1:1 verd.) (Str.), mit 8 mM GTP (GTP), mit 8 mM ATP (ATP), mit Zugabe von Nigericin 4 μ M (Nig.) oder 5 mM Azid (Azid), ohne Zusätze oder stromalem Extrakt (-) und mit einer Vorbehandlung der Thylakoide und des Translationsansatzes mit 0,25 U Apyrase, 15 min., 4°C durchgeführt.

3.5.2.5. LHC-Integration in Thylakoide von Diatomeen

Eine Integration von LHC-Proteinen ist auch in Kieselalgen-Thylakoide zu beobachten. Zur Untersuchung der evolutionär-kreuzweisen Integration wurde das LHC-Protein des PS I (LHCa1) aus *Arabidopsis thaliana* und das LHCPII aus Erbsen (PS II) mit Thylakoiden aus *Coscinodiscus granii* inkubiert und auf ihre Importabhängigkeiten untersucht.

Wie in Abb. 3-34A zu sehen, wird das Erbsen-LHC-Protein unter den gleichen Bedingungen wie auch die FCP-Proteine in die Diatomeen-Thylakoide importiert. Nur Importansätze, die GTP und stromalem Extrakt beinhalten, steigern die Insertion.

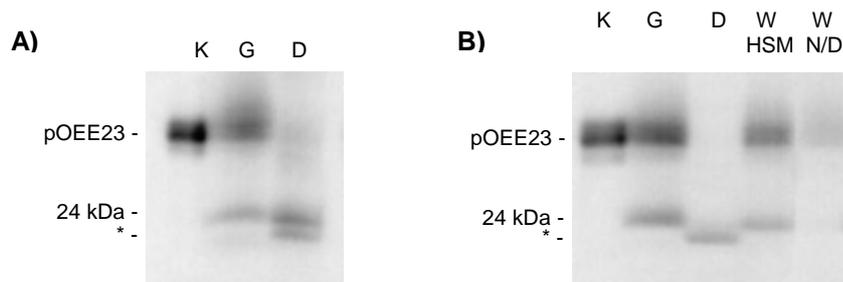


Abbildung 3 - 35 Voruntersuchung zum Import von pOEE23 aus Weizen in *Coscinodiscus*-Thylakoiden

Autoradiographie von radioaktiv markiertem OEE23 (James und Robinson 1991) nach der elektrophoretischen Auftrennung im SDS-PAA-Gel. Importexperimente mit (A) oder ohne (B) stromalen Extrakt von Weizen-pOEE23 in Thylakoide von *Coscinodiscus granii* bei Belichtung und anschließender Waschung (B) der Thylakoide mit HSM-Medium (HSM) bzw. 2x mit 85 mM Na₂CO₃/DTT (N/D) oder einer nachträglichen Proteasebehandlung (Thermolysin 0,2 mg/ml, 30min., 4°C). K: Kontrolle (verwendeter Translationsansatz), G: Gesamtimportansatz ohne Nachbehandlung, D: Gesamtansatz mit nachfolgender Proteasebehandlung, W: Ansatz nach Waschung mit HSM oder Na₂CO₃/DTT, (*): unbekanntes Degradationsprodukt nach Proteasebehandlung.

Der Protonengradient über die Thylakoidmembran scheint, wie die zusätzliche Zugabe von Nigericin zeigt, einen hemmenden Effekt auf die Integration der LHCs zu besitzen. Nach der Waschung der Thylakoide kann, ebenso wie bei der Integration von iFCP in die *Coscinodiscus*-Thylakoide (Abb. 3-31), eine Steigerung der Importrate von ca. 50 % auf 59 % beobachtet werden. Alle weiteren Proben zeigen einen Wert um 18 % nach den KSCN-Waschschritten bzw. 7% nach der Proteasezugabe.

Die Integration von LHCa1 aus *Arabidopsis* bestätigt die Integration in die Diatomeen-Thylakoide. Die Integrationseffizienz mit GTP und stromalem Extrakt steigt um den Faktor 3 verglichen mit dem Ansatz ohne GTP (Abb. 3-34B).

Vergleicht man die Abhängigkeit von Erbsen-LHC und mFCP von der GTP-Konzentration im Ansatz (Abb. 3-34C), so scheint für das LHC-Protein eine minimal stärkere Abhängigkeit zu bestehen. Der beobachtete Unterschied ist jedoch statistisch nicht gesichert.

3.5.3. Voruntersuchungen zum DpH-abhängigen Transport in die Thylakoide aus Kieselalgen

Nach der Charakterisierung der FCP-Insertion in die Thylakoidmembran wurden erste, vorläufige Experimente mit dem kernkodierten Plastiden-Protein OEE23 aus Weizen durchgeführt.

Die Inkubation von radioaktiv markiertem OEE23-Protein, welches eine Stroma- und Thylakoidtransportsequenz besitzt, mit Thylakoiden von *Coscinodiscus granii* führte zu einer Prozessierung des Proteins zu einer Größe von ca. 24 kDa. Wie die Abbildungen 3-18 A und B zeigen, erfolgt die Prozessierung zum 24 kDa-Protein (Spur G) ohne Nukleotid-Zugabe und unabhängig vom stromalen Extrakt.

Das prozessierte OEE23-Protein konnte nicht durch eine Waschung mit HSM-Puffer, aber durch eine Waschung mit Na₂CO₃/DTT (85 mM) analog den FCP-Proteinen entfernt werden. Dies deutet auf eine Lokalisation im Thylakoidlumen und somit auf einen Import hin (Abb. 3-35B).

Nach gelelektrophoretischer Auftrennung von anschließend mit Protease behandelten Proben zeigte sich unterhalb der 24 kDa-Bande eine zusätzliche Proteinbande (*, Abb. 3-35A,B). Importansätze, die stromalen Extrakt während der Inkubation besaßen, wiesen nur eine schwache zusätzliche Bande, wogegen Ansätze ohne stromalen Extrakt fast nur die neue Proteinbande erkennen ließen. Die definierte Verkürzung des importierten 24 kDa-Proteins könnte

möglicherweise auf einen unvollständigen Import in die Thylakoide hinweisen, wobei stromale Faktoren durch möglicherweise eine Entfaltung von translatiertem OEE23 einen vollständigen Import stärker unterstützen.

Weitergehende Experimente deuten an, daß der Import von pOEE23 nicht durch Inhibitoren des Sec-Weges (Azid 4 mM; Apyrase (1U, 15 min, 4°C) unterbunden wird. Untersuchungen mit Nigericin geben derzeit noch kein schlüssiges Resultat. Proteasebehandlung der Thylakoide vor der Importreaktion weisen aber auf eine Abhängigkeit von Proteinfaktoren in der Thylakoidmembran hin (Daten nicht gezeigt).

4. Diskussion

Mit der Untersuchung des Proteintransportes von kernkodierten Plastiden-Proteinen eröffnet sich eine neue Möglichkeit, die Entstehung und den Ablauf der sekundären Endocytobiose für die Diatomeen bzw. die Heterokontophyta zu verstehen. Die Kenntnis über zelluläre Vorgänge erlaubt Rückschlüsse auf mögliche konservierte Transportsysteme in den verschiedenen Algengruppen und auf adaptierte Mechanismen in den unterschiedlichen Wirten während der Endocytobiosen. Dies wiederum kann darlegen helfen, wie im Laufe der Evolution die Anpassung des ehemals autarken Endosymbionten stattgefunden hat.

In diesem Zusammenhang ist die Frage, wie es den vielen Algengruppen gelang, den scheinbaren Nachteil der zusätzlichen Barrieren, gebildet durch die größere Zahl an Hüllmembranen, um die Plastiden zu umgehen. Die ubiquitäre Verbreitung von Algen mit mehr als zwei Plastiden-Hüllmembranen in den Weltmeeren zeigt, daß die erhöhte Anzahl an Plastidenhüllen keinen limitierenden Faktor in der Evolution darstellten.

Durch funktionelle Untersuchung der verschiedenen Transportbereiche von kernkodierten Plastiden-Proteinen aus den Diatomeen *Odontella sinensis* und *Phaeodactylum tricornutum* *in vitro* und *in vivo* sollte die Frage geklärt werden, wie Proteine aus dem Cytosol an ihren Funktionsort innerhalb der Plastiden gelangen.

Die Charakterisierung des weiteren Transportweges der plastidären Proteine in die Thylakoide der Kieselalgen hinein kann zudem veranschaulichen helfen, ob der Transport der Diatomeen-Proteine ähnlich zu dem Thylakoidimport höherer Pflanzen ist. Somit könnte sich ein weiterer Hinweis auf eine ähnliche Entstehung aller Plastiden-Typen ergeben.

4.1. Transport von Plastiden-Proteinen der Diatomeen in das ER

4.1.1. ER-Import als Initiationsschritt des Proteintransportes in die Plastiden

Untersuchungen der N-terminalen Region von Transportsequenzen kernkodierter Plastiden-Proteine aus Diatomeen weisen auf funktionelle Eigenschaften eukaryotischer Signalsequenzen hin. Die Signalsequenzen plastidärer Präproteine zeigen eine große Ähnlichkeit zu denen von ER-luminalen oder sekretorischen Proteinen aus Kieselalgen wie z.B. dem BiP-Protein und den Frustulinen (Apt et al. 1995; Kröger et al. 1996).

Untersuchungen zu den allgemeinen Merkmalen der Signalsequenzen von Gunnar von Heijne zufolge zeigen nur geringe Sequenzhomologien untereinander, wobei jedoch drei Bereiche innerhalb der Sequenz unterscheidbar sind (v. Heijne 1983, 1985). Die N-terminale Region besitzt eine positive Ladung, die zentrale H-Region eine Ansammlung hydrophober Aminosäuren mit einer hohen Tendenz zur Ausbildung einer α -Helix und die in ihrer Länge recht konstante Region C (5-6 AS) am C-Terminus ist gekennzeichnet durch die Schnittstelle für die im ER vorliegende Signalpeptidase (Evans et al. 1986). Nach der v. Heijne-Regel („-3 - -1“-Regel) finden sich bei Eukaryoten an der Position -4 bzw. -5 häufig helixbrechende Aminosäuren (G, P), an Pos. -3 kleine neutrale (A, C, S, T, G) aber auch hydrophobe Aminosäurenreste (F, I, L, M, V) und an Pos. -1 fast ausschließlich nur A, S, G, C, T und Q (v. Heijne 1984).

Erste experimentelle Daten zum Transport der plastidären Präproteine wurden 1991 durch Bhaya und Grossman erhalten. Ihre Untersuchungen am pFCP-Protein aus *Phaeodactylum* zeigten den kotranslationalen Import der Präproteine in ER-Vesikel. Es konnten aber keine klaren Angaben darüber gemacht werden, ob die N-terminale Domäne oder der gesamte Bereich der Präsequenz für den Transport benötigt wird.

Die in Kapitel 3.1.2. dargestellten Untersuchungen an der γ -Untereinheit der ATPase zeigen, daß die Signalsequenz eine Größe von ungefähr 15 Aminosäuren aufweist. Dieses Ergebnis stimmt mit vorhergegangenen Importuntersuchungen an dem FCP-Protein aus *Odontella* überein (Lang 1996). Eine Bestätigung dieser Beobachtungen *in vivo* wurde durch die N-terminale Sequenzierung von isoliertem atpC1GFP-Protein aus transformierten Zellen der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* erhalten. Nach dem Transport des Fusionsproteins in das ER zeigt sich eine Prozessierung der Signalsequenz eine Aminosäure hinter der berechneten Schnittstelle (bis Pos.15) bei Position 16 (Kirk Apt, persönliche Mitteilung).

Der Nachweis einer kurzen Signalsequenzdomäne deutet darauf hin, daß die Präsequenzen von kernkodierten Plastiden-Proteinen eine mindestens zweigeteilte Struktur besitzen. Für die pFCP-Proteine liegt die nachfolgende Transportregion bei ungefähr 15 Aminosäuren, wogegen für das pPRK-Protein und die γ -Untereinheit der plastidären ATPase Regionen von 25 bzw. 40 Aminosäuren anzunehmen sind.

Das generelle Vermögen der „plastidären“ Signalsequenzen zum kotranslationalen Import in Vesikel aus Säuger-ER macht einen ausschließlichen Transport von Plastiden-Proteinen *in vivo* in das Chloroplasten-ER fragwürdig. Ein definierter Eintrittsort für Plastiden-Proteine würde die Existenz eines RNA-Transportsystems oder spezifischer Zielinformationen innerhalb der Signalsequenz bedingen. Der Vergleich von plastidären mit anderen Signalsequenzen weist jedoch auf keine unterschiedlichen Eigenschaften hin. Ein gerichteter Transport von mRNA zum CER ist dagegen eher unwahrscheinlich. Untersuchungen an Nervenzellen und bei Insekten-Oocyten haben jedoch gezeigt, daß RNA zur gesteuerten Zellentwicklung in bestimmte Regionen transportiert werden kann (Mohr 1999; Schnorrer et al. 2000).

Die durch Gibbs (1962) und Bouck (1965) in EM-Aufnahmen beobachtete Vernetzung des ER bzw. der Kernmembran der Heterokontophyten mit dem CER spricht jedoch ebenfalls gegen einen alleinigen Eintritt von Plastiden-Proteinen über das CER (Gibbs 1981). Ein Hinweis für einen beliebigen Eintritt in das ER liefern die Experimente mit GFP-Fusionsproteinen. Die Expression des GFP-Proteins mit der Signalsequenz vom ER-Protein BiP bzw. mit dem Adressierungssignal der γ -Untereinheit (atpC1GFP) zeigen beide die Lokalisation im gesamten ER (Abb. 3-12 und Abb. 3-13).

Es ist unwahrscheinlich anzunehmen, daß die Plastiden im ER/CER eine „Einbahnstraße“ für die in das ER importierten Proteine darstellen. Für den Transport von Plastiden-Proteinen in höheren Pflanzen ist bekannt, daß die Plastiden vor dem Import spezifisch Plastiden-Proteine selektieren. Das Fehlen einer Selektion würde eine Degradation von ER- bzw. sekretorischen Proteinen im Plastidenstroma bedingen (Vierstra 1993). Die stetige Kompensierung fehlgeleiteter Proteinen, würde zu einer energetischen Benachteiligung der Diatomeen gegenüber anderen Organismengruppen führen.

Es ist weiterhin zu vermuten, daß innerhalb der Diatomeen ein Mechanismus zur Unterbindung einer Sekretion von kernkodierten Plastiden-Proteinen vorliegt. Nach gängiger These werden Proteine ohne eine zusätzliche Zielinformation über den Sekretionsmechanismus aus der Zelle ausgeschleust (Harter und Wieland 1996). Das Fehlen von Retentionsmechanismen im ER bzw. im Golgi-System würde für die Diatomeen durch den stetigen Verlust an Plastiden-Proteinen ebenfalls zu einer großen energetischen Belastung führen. Ob dieser Retentionsmechanismus durch die Transitsequenz und damit durch einen Transitsequenzrezeptor bestimmt ist, ist bisher nicht untersucht worden. Vergleichende Analysen von kernkodierten Plastiden-Proteinen zeigen jedoch bisher kein weiteres gemeinsames Signal.

4.1.2. Mögliche Glykosylierung von Plastiden-Proteinen im ER

Der Import des PRK-Proteins in ER-Vesikel könnte auf eine weitere Funktion des ER der Diatomeen hinweisen - die Glykosylierung von Plastiden-Proteinen (Kap. 3.1.3.).

Die Glykosylierung von Proteinen bei ihrem kotranslationalen Import in das ER ist für Proteine des sekretorischen Weges bereits hinreichend untersucht worden (Fiedler und Simons 1995). Die Glykosylierung von Polypeptiden im ER erfolgt an Asparaginresten im Sequenzmotiv Asn-X-(Ser/Thr) durch kovalente Verknüpfung einer mehrfach verzweigten Zuckerkette (Zucker-Komplex) bestehend aus insgesamt 3 Glucose-, 9 Mannose- und 2 N-Acetyl-Glucosaminresten (N-Glykosylierung) (Lennarz 1987; Burda und Aebi 1999; Knauer und Lehle 1999). Für Pflanzen und Insekten wurden zudem noch eine zusätzliche Fucose-Abzweigung an der Basis des Zucker-Komplexes beschrieben (Staudacher et al. 1999). Die verzweigte Zuckerkette kann innerhalb des ER durch verschiedene Mannosidasen und Glukosidasen modifiziert werden (Grinna und Robbins 1987; Lipari und Herscovics 1996).

Zum Nachweis, ob es sich bei der Modifizierung der importierten PRK-Proteine um eine Glykosylierung handelt, wurden die importierten Proteine nachträglich mit der Glukosidase PNGase F behandelt. Das Enzym spaltet alle N-glykosylierten Zucker-Komplexe bis auf solche mit einem zusätzlichen Fucose-Rest an der Basis. Durch die Verwendung von ER-Vesikeln aus Säugern war eine mögliche Fucosylierung des Zucker-Komplexes nicht zu erwarten.

Die Glykosylierung der PRK an drei Positionen steht in Einklang mit Berechnungen möglicher Bindungsstellen im reifen Protein. Untersuchungen an anderen Plastiden-Proteinen stellen jedoch die PRK als das bisher einzige Diatomeenprotein dar, welches mögliche Anbindungsstellen besitzt. Weder FCP, FBA noch die γ -Untereinheit weisen ein N-X-(S/T)-Motiv auf.

Ob *in vivo* innerhalb des Diatomeen-ER eine Übertragung eines Zucker-Komplexes auf Plastiden-Proteine erfolgt, ist derzeit offen. Der Größenvergleich von in *E.coli* exprimiertem und aus den Kieselalgen isoliertem nativem PRK-Protein zeigen jedoch, daß das native PRK-Protein größer ist als das Rekombinante (pers. Mitteilung Dipl. Biol. Michls). Erste Untersuchungen mit zellulären Extrakten aus *Coscinodiscus* und der PNGase F zeigten bisher kein Ergebnis. Untersuchungen mit Fucose-unempfindlichen Glukosidasen wurden nicht durchgeführt.

Charakteristisches Merkmal aller durch eine sekundäre Endocytobiose entstandenen Algen ist der Transport von Plastiden-Proteinen über das ER. Es ist zu vermuten, daß bei der Etablierung des Proteintransportes in das ER nicht nur die Transportfunktion alleine eine Rolle gespielt hat. Zufällige Glykosylierungen von Plastiden-Proteinen in Diatomeen könnten am Anfang der Evolution zu einer veränderten Funktion oder Stabilität der Plastiden-Proteine geführt haben. Für Glykoproteine ist eine Beteiligung des Zucker-Komplexes an der Proteinfaltung gezeigt worden (Olden et al. 1982). Die Anbindung eines Zucker-Komplexes an das Plastiden-Protein könnte somit eine Störung der kompakten Proteinstrukturen bewirkt haben. Vergleichende Untersuchungen bei den aus einer primären oder sekundären Endocytobiose entstandenen Algengruppen von plastidären Enzymen sowie von regulatorischen Komplexen wie z.B. dem CP12/GAPDH/PRK-Komplex könnten vielleicht über eine Veränderung Aufschluß geben (Wedel et al. 1997).

4.2. Untersuchungen zur Transitsequenzdomäne von kernkodierten Plastiden-Proteinen der Diatomeen

4.2.1. Strukturvergleich von Diatomeen-Transitsequenzen

Analysen der zweiten Präsequenzdomäne der kernkodierten Plastiden-Proteine der Diatomeen zeigen starke Ähnlichkeiten zu plastidären Adressierungssignalen, aber auch zu Merkmalen von Mitochondrien-Transportsequenzen.

Transitsequenzen höherer Pflanzen besitzen eine N-terminale Region von ca. 10 AS, die kaum Proline, Glycine und geladene Aminosäuren beinhalten (v. Heijne et al. 1989; Keegstra et al. 1989). Es folgt ein zentraler Bereich mit positiver Nettoladung und variabler Länge, welche die größte Anhäufung von hydroxylierten Aminosäuren besitzt. Der Anteil an Serinen und Threoninen in der Transportsequenz liegt bei mehr als 20%. Der C-terminale Bereich von ca. 10 AS weist ein hohes Potential zur Ausbildung einer amphiphilen Faltblattstruktur auf und besitzt an den Pos. -2, -6 bis -10 gehäuft die Aminosäure Arginin („basischer Block“).

Am Ende der C-terminalen Region findet sich das Schnittstellenmotiv (I/V)-X-(A/C) der Transitsequenz (Gavel und v. Heijne 1990).

Circular dichroitische Messungen der Struktur der Transitsequenz von Ferredoxin (*Saline pratensis*) weisen auf eine ungeordnete Struktur in Lösung hin (Pilon et al. 1992). Erst durch Bindung an die Lipide der Plastidenmembran entsteht eine geordnete Struktur (de Kruijff 1994; Thorgeirsson et al. 1995). Die Anbindung an die Membran erfolgt hauptsächlich mit der Transitsequenz, ist sehr schnell (< 50 ms) und ist abhängig von der Lipidzusammensetzung (Pinnaduwege und Bruce 1996). Die anschließende Bindung der Transitsequenz an den TOC-Komplex wurde mit einer Dissoziationskonstante von $K_D = 5$ nM (Ferredoxin-NADP⁺-Reduktase) bestimmt und deutet auf eine sehr stabile Bindung hin (Ceccarelli et al. 1996).

Wie die Transitsequenzen der höheren Pflanzen weisen die Diatomeen-Transitsequenzen einen Anteil an hydroxylierten Aminosäuren von rund 20 % und positive Ladungen zwischen Pos. -6 und -8 („basischer Block“) auf (Kap. 3.3.2.6.). Die beschriebene Dreier-Teilung der Transportsequenz der höheren Pflanzen ist bei Diatomeen nur begrenzt zu erkennen. Ferner liegen in der Regel die Diatomeenproteine mit einer Größe der Transitsequenzen von 15 bis 25 Aminosäuren deutlich unter der Länge der Adressierungssequenzen von höheren Pflanzen (v. Heijne et al. 1991). Vergleichbare kurze Sequenzen sind auch bei anderen Chromophyten sowie bei Chlorophyten gefunden worden.

Die zur Feinregulation des Proteinimports beschriebenen Phosphorylierungsstellen der Transitpeptide von höheren Pflanzen sind innerhalb der Transitsequenzen der Diatomeen nicht zu erkennen ($((P/G)X_n(R/K)X_n(S/T)X_n(S^*/T^*))$ ($n=0-3$, * = Phosphorylierungsstelle)) (Waegemann und Soll 1996).

Ein bedeutender Unterschied zu den Transitsequenzen höherer Pflanzen findet sich in der Sekundärstruktur der Diatomeen-Sequenzen (Kap. 3.3.2.6.). Die Diatomeen-Proteine besitzen als zentrales Strukturmerkmal eine amphipathische Helix anstelle der von Gavel und v. Heijne (1990) vorhergesagten amphipatischen Faltblattstruktur (Abb. 4-1A,B). Das Helix-Motiv liegt bei der γ -Untereinheit im zentralen Bereich der Transitsequenz (Abb. 4-1A), wogegen sie bei den kleineren Kieselalgen-Transitdomänen den größten Teil einschließlich des Schnittstellenbereiches ausmacht (Abb. 4-1B).

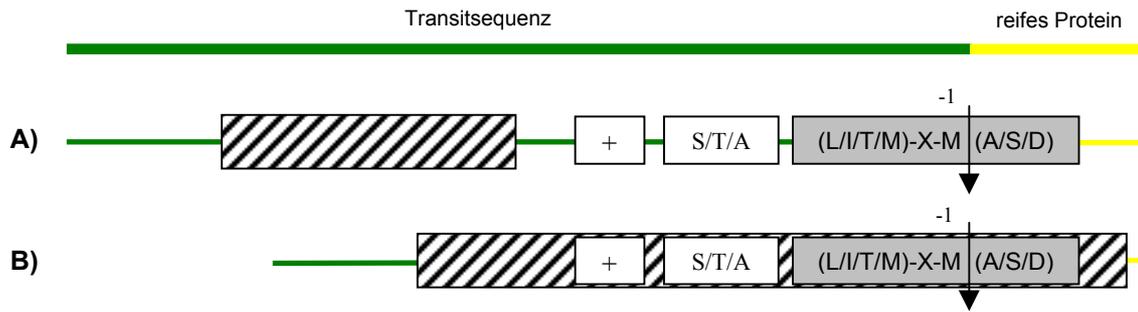


Abbildung 4 - 1 Schematische Darstellung von Transitsequenz-Eigenschaften der Plastiden-Proteine aus Kieselalgen

Illustration der allgemeinen Merkmale der Transitsequenzdomäne der γ -Untereinheit der plastidären ATPase (A) und den kürzeren Transitsequenzen von verschiedenen kernkodierten Plastiden-Proteinen (B) aus Diatomeen (siehe Kap. 3.3.2.6.). Die grüne Linie steht für die Transitsequenz der Plastiden-Proteine und die gelbe für das reife Protein. Die Signalsequenz der Plastiden-Proteine ist nicht dargestellt. Der Pfeil markiert die Prozessierungsstelle, die positiv geladene Region ist mit einem „+“, der Bereich mit kleinen, eher ungeladenen Aminosäuren (S/T/A/V) ist mit „S/T/A“ und die amphipatische Helixstruktur ist über die Straffung gekennzeichnet. Die Sequenz der Prozessierungsstellen der Transitsequenz ist grau unterlegt.

Eine helikale Domäne ist auch bei Grünalgen in der Transportsequenz der RubisCo gefunden worden (Franzen et al. 1990). Fusioniert an die Dihydrofolate-Reduktase (DFHR) führte die Chlorophyten-Transitsequenz zu einem Import in Mitochondrien (Hurt et al. 1986).

Eine amphipathische, durchgehende Helix bzw. eine Helix-Turn-Helix-Motiv ist das dominierende Strukturmerkmal der Transportsequenzen zu den Mitochondrien (v. Heijne G. et al. 1989; Sjöling und Glaser 1998). Die positive Ladung, die helikale Struktur und die strukturelle Flexibilität der Mitochondriensequenz ist dabei für die Anbindung an den TOM-Komplex entscheidend (*Translocon-at-the-outer-envelope-membrane-of-the-mitochondria*) (Schleiff et al. 1999).

Eine mitochondriale Prozessierungsstelle läßt sich nicht bei den plastidären Vorläuferproteinen der Diatomeen finden (Schnittstellenmotiv R2: (V/A/S)-R⁻¹X \downarrow ⁺¹(A/S)-(T/S) und R3: (V/A/S)-R-X⁻¹(F/Y) \downarrow ⁺¹(A/S)-(T/S)) (Schneider et al. 1998; Sjöling et al. 1998). Anstelle dessen ist bei den Diatomeen ein (S/T/A/V)-(S/T/A)-(L/I/T/M)-X⁻¹M \downarrow ⁺¹(A/S/D)-Konsensusmotiv zu beobachten.

Die evolutionäre Bedeutung für die beobachteten Unterschiede bei den Sequenzen der Diatomeen und der höheren Pflanzen ist derzeit noch unklar. Obwohl die Transitsequenzen der Diatomeen und der höherer Pflanzen größtenteils gemeinsame Eigenschaften besitzen, ist die Sekundärstruktur der Diatomeen-Transitsequenz eher von mitochondrialem Charakter.

Ob in der Entstehung der plastidären Transportsequenzen eine mitochondriale oder wie von Cavalier-Smith (2000) angedeutet eine ER-artige Sequenzen zugrundegelegen hat, ist unklar. Für die Ferrochelatase-I aus *Arabidopsis* wurde in *In-vitro*-Experimenten jedoch ein Import in Plastiden und Mitochondrien beschrieben (Chow et al. 1997; Small et al. 1998). Bei einem von den Mitochondrien-Sequenzen abgeleiteten Ursprung der Transitsequenzen wäre es denkbar, daß sich im Laufe der Zeit beide posttranslationalen Importsysteme durch Ausbildung unterschiedlicher Transportmerkmale trennten. Bei den Diatomeen führte jedoch möglicherweise die räumliche Trennung des plastidären vom mitochondrialen Transportweges durch den Einschluß der Plastiden in das ER zu einem geringeren Selektionsdruck, so daß die mitochondriale Struktur länger erhalten bleiben konnte.

Die Reduktion der Transitsequenzen von FCP bzw. FBA auf eine Länge von ungefähr 15 Aminosäuren ist eventuell ebenso auf die „Isolation“ der Plastiden im ER zurückzuführen. Der kotranslationale Transport in das ER-Lumen führt zu einer Aufkonzentrierung zu transportierender Plastiden-Proteinen. Dies und die fehlende Konkurrenz mitochondrialer Präsequenzen könnte die Reduktion der Transitdomäne auf entscheidende Sequenzeigenschaften begünstigt haben. Der unterschiedliche Zeitpunkt des Gentransfers vom Plastom oder vom Kerngenom des ersten Wirtes in das Genom des zweiten Wirtes würde ferner zur Ausprägung von kaum bis stark komprimierten Transitsequenzformen führen (Abb. 4-1).

4.2.2. *in-vitro*-Importverhalten der Diatomeen-Transitsequenzen

Wie in Kapitel 4.2.1. beschrieben ist, weist bei Diatomeen die zweite Domäne der Plastiden-Präsequenz Eigenschaften der Transitsequenzen höherer Pflanzen auf. Dies könnte auf die Beteiligung eines Transportschrittes analog dem höherer Pflanzen in der Diatomeen-Plastidenhüllmembran hinweisen (Abb. 4-2).

Um eine funktionelle Aussage über das Transportvermögen der zweiten Domäne treffen zu können, wurden die Signalsequenzen des FCP-Proteins, der PRK und der γ -Untereinheit der ATPase aus *Odontella* deletiert und die resultierenden Präproteine mit isolierten Plastiden aus höheren Pflanzen inkubiert (Kap. 3.2.1. bis 3.2.3.). Für die Intermediatkonstrukte der PRK und des FCP-Proteins konnte kein Import in die Plastiden nachgewiesen werden. Nur die Transitsequenzdomäne der γ -Untereinheit ermöglichte einen Transport in die Erbsen-Plastiden (ToMo, ToMo Δ 170-370; Abb. 3-3 A,B). Der Transport erfolgte unter den gleichen Bedingungen (Licht, ATP, Proteinfaktoren in der Plastidenmembran) wie für höhere Pflanzen beschrieben (Kap. 3.2.1.1.) (de Boer und Weisbeek 1991).

Untersuchungen bei höheren Pflanzen haben gezeigt, daß nach einem Transport über den plastidären Importkomplex die Transitsequenz durch eine stromale Transitpeptidase abgespaltet wird (Richter und Lamppa 1999). Das Diatomeen-Protein wurde jedoch nach dem Import in die Erbsen-Plastiden rund 3 kDa stärker verkürzt als erwartet. Der Transport der Deletionsmutante ToMo Δ 80-89 zeigt, daß die Verkleinerung des reifen Proteins innerhalb des Aminosäuremotivs $_{80}$ KLVA Δ AKVRR $_{89}$ stattfindet.

Innerhalb dieser Region findet sich die von Gavel und Heijne (1990) vorhergesagte Konsensus-Sequenz für Schnittstellen von höheren Pflanzen (I/V-X-A/C \downarrow) an Position 83-85 (VAA \downarrow). Berechnungen mit dem Programm ChloroP 1.0 für die γ -Untereinheit von *Phaeodactylum tricornutum* zeigten eine Transitsequenz-Schnittstelle in der analogen Region VRA \downarrow A.

Wie bei der *Odontella*- γ -Untereinheit findet sich auch bei der γ -Untereinheit der ATPase von *Chlamydomonas* eine Fehlprozessierung von ungefähr 30 AS im reifen Protein. Zusätzlich ist aber auch korrekt verkleinertes Protein zu beobachten (Yu et al. 1988). Dies führte zu der Frage, ob das Diatomeen-Protein nur an der zusätzlichen oder vielleicht zweimal durch die stromale Transitpeptidase der Erbsen geschnitten wird. Untersuchungen des Imports zu verschiedenen Zeiten deuten jedoch nur auf eine einmalige „Reifung“ an der zusätzlichen Prozessierungsstelle hin.

Die anschließenden Versuche, das Prozessierungsereignis zu Gunsten des originalen Diatomeen-Schnittstellenmotivs zu verschieben, zeigten kein Ergebnis (Abb. 4-2): Weder die Einführung einer großen Aminosäure im Konstrukt ToMoA85M (VAA \downarrow A \rightarrow VAM \downarrow A) in die neue Schnittstelle, noch der Austausch der Alanine gegen die in Transitsequenzen seltene Aminosäure Aspartat bei ToMoA84-85D (VAA \downarrow A \rightarrow VDD \downarrow A) bewirkten einen Effekt (v. Heijne et al. 1989). Im Falle von ToMoA84-85D könnte jedoch eine Verschiebung der Prozessierung um wenige Aminosäuren im reifen Protein stattgefunden haben.

		Korrekte Prozessierung
γ -UE ATPase Spinat		+
ToMo		-
ToMoIVC		-
ToMoA85M		-
ToMoA84-85D		-
TsMo		-
ToMs		+
TsMo'Ms'		-

Abbildung 4 - 2 Prozessierung verschiedener Konstrukte der γ -Untereinheit der plastidären ATPase

Tabellarische Darstellung der Prozessierung verschiedener in Erbsen-Plastiden importierter Derivate der γ -UE der plastidären ATPase aus *Odontella sinensis* und Spinat. „Korrekte“ Prozessierung (+) resultiert in einem ca. 35 kDa großen Protein und „nicht korrekte“ Spaltung (-) führt zu einem ca. 32 kDa großen Produkt.

Sequenzvergleiche der derzeit bekannten kernkodierten Plastiden-Proteine aus Chromophyten weisen fast ausschließlich ein konserviertes Methionin direkt vor dem reifen Protein an Position -1 auf (Abb. 3-19). In seltenen Fällen wie bei dem 10 kDa-Protein aus Spinat (Motiv: GGM) und dem Ferredoxin I-Protein aus *Pisum sativum* (Motiv: VAM) findet sich auch bei höheren Pflanzen ein Methionin in der Schnittstelle (v. Heijne et al. 1991). Eine Annahme war, daß möglicherweise das Methionin an Position -1 zu einer fehlerhaften Erkennung der Prozessierungsstelle der Kieselalgen führt. Die Überführung der originären Diatomeen-Schnittstelle (IVM) in das Konsensus-Motiv (IVC) der höheren Pflanzen im Proteinkonstrukt ToMo[IVC] konnte dies aber nach Importversuchen nicht bestätigen.

Es ist daher zu vermuten, daß die aus drei Proteinen bestehende stromale Transitpeptidase der höheren Pflanzen die Diatomeen-Schnittstelle durch das angrenzende reife Protein nicht korrekt erkennen kann (Oblong et al. 1992; Richter und Lamppa 1998). Die Fusion der Diatomeen-Transitsequenz an das reife Protein der γ -Untereinheit aus Spinat zeigt, daß die Diatomeen-Domäne in dieser neuen Umgebung korrekt erkannt und geschnitten wird. Im Gegensatz dazu wird jedoch die natürliche Prozessierungsstelle der Spinat- γ -Untereinheit nach der Fusion an das reife Diatomeen-Protein bzw. dessen ersten 77 Aminosäuren durch die Peptidase nicht mehr genutzt. Da die Sekundärstruktur beider reifer Proteine sehr ähnlich ist, könnte der entscheidende Unterschied in der Sequenzabfolge am N-Terminus des reifen Proteins liegen.

Der Import der γ -Untereinheit der Kieselalgen *Odontella* belegt die funktionelle Analogie der zweiten Transportdomäne mit den Transitsequenzen höherer Pflanzen. Dies wurde auch bei Untersuchungen der γ -Untereinheit vom R-Phycoerythrin der Rotalgen *Aglaothamnion neglectum* durch Apt et al. (1993) beobachtet. Die Fusion der Rotalgen-Transportsequenz an die kleine Untereinheit der Rubisco ermöglichte den Transport in Erbsen-Plastiden.

Der Import des Rotalgen- und Kieselalgen-Proteins in die Erbsen-Plastiden weist auf eine Existenz von konservierten Transportsystemen in der Plastidenhülle hin. Da die Plastiden der Kieselalgen durch eine Aufnahme einer Rotalge entstanden sind (Adachi et al. 2000), ist zudem zu vermuten, daß diese Transportapparate bei den Diatomeen in den beiden innersten Hüllmembranen vorliegen und den letzten Transportschritt in den Chloroplasten

ermöglichen. Bisher konnten aber weder bei den Rot- noch bei Kieselalgen homologe Komponenten der plastidären Proteintranslokatoren TOC und TOC charakterisiert werden. Für Cryptophyten, die wie die Kieselalgen vier Hüllmembranen besitzen, wurde die Existenz von einigen der TOC-Komponenten angedeutet (Prof. Maier, pers. Mitteilung).

4.2.3. *in-vivo*-Lokalisationsstudien in *Phaeodactylum tricornutum*

Die genetische Transformation von Pflanzen stellt ein geeignetes Mittel zur Untersuchung von zytologischen Vorgängen dar und wird in den letzten Jahren verstärkt zur biotechnologischen Nutzung von Pflanzen verwendet (Apt und Behrens 1999; Dunwell 2000). Bei höheren Pflanzen sind verschiedene Methoden von ballistischer Transformation über Elektroporation zu Transfektionen mit dem *Agrobacterium tumefaciens* bekannt (Klee et al. 1987; Boynton et al. 1988; Chowirira et al. 1995). Das erste Protokoll zur Transformation von Kieselalgen wurde 1995 von Dunahay et al. beschrieben, welches nachfolgend für die Manipulation der Lipidzusammensetzung in *Cyclotella cryptica* verwendet wurde (Dunahay 1995, 1996).

Die in dieser Arbeit vorgestellten Transformationsergebnisse beruhen auf der ballistischen Transformation der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* nach Apt et al. (1996). Dieses Protokoll wurde von Fischer et al. (1999) erstmalig zur Untersuchung der Lokalisation von zellwandbildenden Proteinen, den Frustulinen, verwendet.

Für die Untersuchung des Proteintransportes in die *Phaeodactylum*-Plastiden wurden verschiedene kodierende Bereiche von plastidären Transportsequenzen an das *gfp*-Gen fusioniert. Das „Green-fluorescent-protein“ (GFP) ist ein nach Anregung mit UV-Licht zur Fluoreszenz befähigtes Protein und ist für die Biolumineszenz in der Qualle *Aequoria victoria* verantwortlich. In den letzten Jahren hat das GFP-Protein in zellbiologischen Untersuchungen eine weite Verbreitung als Marker bekommen (Sullivan und Kay 1999; Cutler et al. 2000).

Zur Verifizierung der GFP-Transformanden wurde das Konfokale-Laser-Scanning-Mikroskop (CLSM) verwendet. Das CLSM erlaubt eine fluoreszenzmikroskopische Betrachtung von Zellen oder Geweben in Schichtebenen von > 0,15 µm (Hepler und Gunning 1998).

Die mit den Konstrukten erhaltenen Daten wurden mit Aufnahmen von *Phaeodactylum*-Transformanden verglichen, die nur das GFP, GFP mit der Signalsequenz des ER-Proteins BiP und das GFP mit der vollständigen Plastidentransportsequenz von Diatomeen-Proteinen (FCP, γ -UE, PRK) exprimierten.

Wie die Fluoreszenzaufnahmen in Abb. 3-11 und 3-12 zeigen, führt die Expression von GFP ohne Transportsequenz zu einer unspezifischen GFP-Lokalisation im Cytoplasma, wobei eine große Ansammlung von GFP in der Kernregion vorliegt. Die gleiche diffuse Verteilung zeigt sich auch in GFP-Transformanden von Tabakblättern (Boevink et al. 1999).

Ebenso wie bei Tabak-Epidermalzellen und *Arabidopsis*-Wurzelzellen ist in der Diatomee eine ER-Lokalisation von GFP mit einer Signalsequenz (BiPGFP bzw. BiPGFP-DDEL) durch scharfe Linien bzw. Strukturen innerhalb der Zelle erkennbar (Abb. 3-11, 3-12) (Hepler und Gunning 1998; Boevink et al. 1999). Durch N-terminale Ansequenzierung des BiPGFP-Proteins, welches zuvor aus transformierten *Phaeodactylum*-Zellen isoliert wurde, konnte eine Prozessierung der Signalsequenz gezeigt werden (Kap. 3.3.2.1.). Eine weitere Bestätigung findet dieser Phänotyp in den Untersuchungen zur ER-Lokalisation von atpC1GFP (siehe Kap. 4.2.4.).

Die Lokalisation von GFP, welches in die Plastiden transportiert wurde, ist über die Deckungsgleichheit der GFP-Fluoreszenz mit der Autofluoreszenz des Chlorophylls gut erkennbar. Alle verwendeten vollständigen Präsequenzen kernkodierter Plastiden-Proteine aus Kieselalgen - der γ -Untereinheit der ATPase und das FCP-Protein aus

Phaeodactylum tricornutum sowie die PRK aus *Odontella sinensis* - ermöglichten eine Translokation des GFP-Proteins in die Plastiden.

Die Voruntersuchungen für die Transformationen mit den verkürzten Transportsequenzen belegen, daß die Verwendung von GFP als Marker für Lokalisationsstudien in Diatomeen möglich ist. Ferner weisen die Aufnahmen darauf hin, daß sich die drei Zellbereiche Cytoplasma, ER und Plastid klar voneinander abgegrenzt erkennen lassen und die verwendeten Transportsequenzen entsprechend ihrem Typus transportiert werden.

4.2.4. *in-vivo*-Transport von deletierten Diatomeen-Präsequenzen in *Phaeodactylum*

Zur Untersuchung der Frage, ob bestimmte Bereiche innerhalb der Transitsequenz von Plastiden-Proteinen essentiell für den Import in die Diatomeen-Chloroplasten sind, wurden unterschiedliche GFP-Fusionsproteine der γ -Untereinheit der ATPase, des FCP-Proteins aus *Phaeodactylum tricornutum* sowie der PRK aus *Odontella sinensis* hergestellt.

Von der γ -Untereinheit wurde die Transitsequenz vom C-terminalen Ende her stufenweise verkürzt. Alle Fusionsproteine mit mindestens den ersten 23 Aminosäuren der Transitsequenz wurden in die Plastiden importiert (Kap. 3.3.2.2.). Die Verkürzung der Transitsequenz auf 15 Aminosäuren - der Länge der FCP-Transitsequenz - ermöglichte keinen Import mehr in die Plastiden (atpC1GFP). Durch die atpC-Signalsequenz war nur eine Akkumulation des GFPs innerhalb des ERs zu beobachten. Bestätigt wird der kotranslationale Transport in das ER durch die Ansequenzierung von isoliertem atpC1GFP-Protein und der Isolation von GFP-haltigen ER-Vesikeln aus den *Phaeodactylum*-Transformanden.

Die unterhalb der Länge der FCP-Transitsequenz verkürzte PRK-Transitsequenz ermöglicht im Gegensatz zu t-atpC1GFP in *Phaeodactylum* zu einer klaren Lokalisation in den Plastiden (Kap. 3.3.2.4.). Wie für das originale PRK-Protein berechnet, zeigen die vollständige bzw. verkürzte PRK-Präsequenz fusioniert an das GFP eine ausgeprägte amphipatische Helix.

Die N- bzw. C-terminale Halbierung der FCP-Transitsequenzen auf jeweils acht Aminosäuren führt in beiden Fällen zu einer fast vollständigen Unterbindung des Plastidenimports (Kap. 3.3.2.3.). Bei der Akkumulation um die Plastiden könnte es sich jedoch möglicherweise um eine Lokalisation in einer Region handeln, die während des Plastidenimports dem ER nachfolgt, aber noch vor dem Eintritt in das Stroma durchquert werden muß. Ob es sich hierbei um den periplastidären Raum handelt, ist nicht zu erkennen.

Der Import der atpCGFP-Fusionsproteine in die Plastiden weist auf eine große Flexibilität des Transportsystems in der Erkennung von möglichen Transitsequenzen hin (Abb. 3-13). Selbst größere Deletionen der Transitsequenz ermöglichen immer noch einen Transport der Präproteine in die Plastiden. Dies konnte auch in Transformationsexperimenten mit der γ -Untereinheit der ATPase bei *Chlamydomonas* beobachtet werden. Trotz einer Deletion von fast zwei Drittel der Transportsequenz wurde die γ -Untereinheit in die Plastiden transportiert (Kindle und Lawrence 1997).

Der Transport von atpC3GFP mit den ersten 23 Aminosäuren der Transitsequenz, aber nicht von atpC1GFP mit den ersten 15 Aminosäuren der Transitsequenz, in die Plastiden könnte auf ein elementares Signal im zentralen Bereich der Transitsequenz (Pos. 30 bis 38 der Präsequenz) hinweisen. Ein vergleichbarer Aminosäurebereich ist jedoch in der FCP- oder PRK-Transportsequenz nicht zu erkennen.

Konstrukt	Sequenzlänge	S/T Gehalt (%)	Ladung	Schnittstelle	Lokalisation
AtpC1GFP	15	40	+1	-	Plastide
AtpC2GFP	4	50	0	-	ER
AtpC3GFP	23	30	+1	-	Plastide
AtpC4GFP	29	31	0	-	Plastide
* AtpC5GFP	38	29	+3	+	Plastide
AtpC1GFP-DDEL	15	40	+1	-	ER
AtpC2GFP-DDEL	4	50	0	-	ER
AtpC3GFP-DDEL	23	30	+1	-	Plastide
AtpC4GFP-DDEL	29	31	0	-	Plastide
* FcpGFP	15	25	+1	+	Plastide
Fcp2GFP	8	13	0	-	ER
Fcp3GFP	8	38	+1	+	ER
* Prk1GFP	25	16	+1	+	Plastide
Prk2GFP	12	17	0	+	Plastide

Abbildung 4 - 3 Darstellung der Transformationsergebnisse bei Kieselalgen-Transportsequenzen

Tabellarische Aufführung der verbleibenden Länge der Transitsequenz, des Gehalts an Serinen und Threoninen (S/T-Gehalt), der Gesamtladung der Transitsequenz und das Vorhandensein (+) der natürlichen Diatomeen-Prozessierungsstelle. Zusätzlich ist die Lokalisation des GFPs nach der Transformation für jedes Konstrukt aufgeführt. Konstrukte, die die vollständige Transitsequenz enthalten, sind mit einem Stern markiert.

In den Untersuchungen von Kindle und Lawrence (1997) wurde der analoge Bereich zudem in der Transportsequenz der γ -Untereinheit der ATPase von *Chlamydomonas* deletiert und das Protein dennoch in die entsprechenden Plastiden transportiert.

Weder die Gesamtladung der Transportsequenz noch der Gehalt an hydroxylierten Aminosäuren scheinen für einen Import in die Plastiden eine Rolle zu spielen. Alle verwendeten Deletionsfragmente der Transportsequenzen wiesen einen Gehalt an hydroxylierten Aminosäuren von mindestens 29 % auf und bis auf das atpC4GFP-Protein eine positive Gesamtladung (Abb. 4-3). AtpC4GFP besaß keine Nettoladung, wurde aber dennoch in den Plastid importiert. Ein Einfluß der Prozessierungsstelle ist ebenfalls nicht beobachtet worden (Abb. 4-3).

Chemische Verknüpfungsexperimente („Cross-Linking“) von Rensink et al. (2000) zwischen modifizierten Transitsequenzen von Ferredoxin (*Silene pratensis*) und den Komponenten der Proteintranslokatoren in der Plastidenmembran weisen auf eine wichtige Rolle des N-terminalen Bereiches der Transitsequenz hin. Den Untersuchungen zur Folge ist das erste Viertel der Ferredoxin-Transportsequenz an der Bindung an TOC-Komponenten und mindestens das zweite Viertel der Sequenz an der Translokation über den TOC-Komplex beteiligt. Ein Einfluß der N-terminalen Region auf den *in-vivo*-Import zeigte sich überdies auch bei dem

Plastocyanin-Protein aus *Chlamydomonas* (Kindle 1998). Bezogen auf den Transport der atpCGFP-Proteine in die Diatomeen-Plastiden, könnte die Region zwischen Pos. 30 bis 38 im Präprotein (= zweites Viertel) an dem Transport über den TOC-Komplex einen Anteil haben. Für den Transport der PRK ist jedoch die erste Hälfte der Transportsequenz nicht notwendig. Die N-terminal halbierte PRK-Transitsequenz führt zu einer GFP-Akkumulation in den Plastiden.

Die FCP-Proteine besitzen die derzeit kleinsten Adressierungssignale für die Diatomeen-Plastiden. Jegliche Verkürzung der Transitsequenz bewirkte eine Reduzierung der Importkompetenz. Dies könnte für die Möglichkeit sprechen, daß die Transportinformationen sehr komprimiert in der Transitsequenz vorliegen und somit jegliche Deletion zu einer Störung des Imports führen. Daß die Länge der FCP-Transitsequenz nicht die eigentliche Grenze für den Plastidenimport in *Phaeodactylum* darstellt, zeigt das Prk2GFP-Fusionsprotein mit einer verbleibenden Transitsequenz-Größe von 12 Aminosäuren. Auch die γ -Untereinheit der ATPase von *Chlamydomonas* wird mit noch 12 verbleibenden Aminosäuren *in vivo* in *Chlamydomonas*-Plastiden transloziert (Kindle und Lawrence 1998). Weitere Beispiele finden sich auch bei Untersuchungen mit thylakoidalen Proteinen, wobei hier Seiteneffekte von der Thylakoidtransferdomäne nicht ausgeschlossen werden können (Lawrence und Kindle 1997).

Das Fusionsprotein atpC2GFP stellt eine Ausnahme in der Betrachtung dar. Obwohl es nur die ersten vier Aminosäuren der Transitsequenz besitzt, zeigen die Fluoreszenzaufnahmen eine Plastiden-Lokalisation. Daß extrem kurze Transportsequenzen zu einem posttranslationalen Transport führen können, zeigt sich beim Proteintransport in Hydrogenosomen. Die Transportsequenzen weisen eine Größe von 5 bis 14 Aminosäuren auf. Für das Ferredoxin aus den Hydrogenosomen von *Trichomonas vaginalis* konnte *in vitro* ein Transport mit den acht Aminosäuren der Transitsequenz gezeigt werden (Bradley et al. 1997).

Wahrscheinlicher ist jedoch, daß durch die Aminosäureumgebung an der Fusionsstelle eine für den Import in die Plastiden erfolgreiche kurze Diatomeen-Transitsequenz entstanden ist. Berechnungen der Sekundärstruktur zeigen für das atpC2GFP-Fusionsprotein eine amphipatische Helix direkt am N-Terminus (Kap. 3.7.5. und 6.) des Proteins, wie sie auch bei FCP oder PRK gefunden worden ist. Daß die N-terminale Region des GFP-Proteins nicht alleine zu dem Plastiden-Import geführt hat, zeigt die Lokalisation des BiPGFP-Protein im ER.

Analysen der atpCGFP-Fusionsproteine zu ihrer Prozessierung in den transformierten Zellen könnten möglicherweise auf eine Beteiligung des GFP-Proteins als Transitsequenzergänzung hinweisen (Abb. 3-15B). atpC2GFP-Protein zeigt nach seinem Import in die Plastiden eine Reifung nahe am N-Terminus des GFP-Proteins. Die Gesamtlänge der angedeuteten Transitsequenz liegt bei acht Aminosäuren. Da jedoch bis auf das atpC5GFP-Protein alle Fusionsproteine keine Prozessierungsstelle besaßen, ist die Länge einer möglicherweise beteiligten GFP-Sequenz vorsichtig zu bewerten. Untersuchungen von Ostrem et al. zeigten (1989), daß der Import und die Prozessierung in Plastiden zwei unabhängige Prozesse sind. Die von ihnen durchgeführte Deletion des C-Terminus der SSU-Rubisco-Transitsequenz resultierte in vier verschiedenen „Prozessierungsprodukten“ nach dem Import in die Plastiden. Auch die *in-vitro*-Untersuchungen der *Odontella*- γ -Untereinheit zeigen, daß es sich beim Import und bei der Prozessierung um getrennte Funktionen handelt (Kap. 4.2.2.). Obwohl die Diatomeen-Transitsequenz alleine den Import in die Erbsen-Plastiden ermöglichen kann, erfolgt die Prozessierung rund 30 Aminosäuren weiter in Richtung C-Terminus im reifen Protein.

Bei allen dargestellten Untersuchungen der GFP-Fusionsproteine bleibt die Effizienz des Plastidenimports durch die Deletionen in den Transitsequenzen unberücksichtigt. Deletionen an der Transitsequenz von Plastocyanin aus

Chlamydomonas zeigen *in vivo* eine Senkung der Importaktivität (Kindle 1998). Die Verwendung von GFP erschwert jedoch die Bestimmung der Importraten. Die große Proteinstabilität von GFP in eukaryotischen Zellen mit mehr als 24 Stunden erlaubt durch die resultierende Akkumulation nur unbefriedigend die Unterscheidung der verschiedenen Importeffizienzen (Flach et al. 1994; Hampton et al 1996; Clontech-Produktinformation).

4.2.5. Vergleich von *in-vitro*- und *in-vivo*-Transportuntersuchungen

Untersuchungen bei *Chlamydomonas* (Lawrence und Kindle 1997) und bei *Arabidopsis* (Rensink et al. 1998) zeigen einen deutlichen Unterschied zwischen *in-vivo*- und *in-vitro*-Untersuchungen. Deletionen in der Transitsequenz, die bei der Inkubation mit Plastiden *in vitro* einen Import verhindern, zeigen *in vivo* eine Akkumulation im Plastid. Gedeutet wurden diese unterschiedlichen Ergebnisse mit einer generell niedrigeren Importeffizienz der isolierten Plastiden *in vitro*, die die unterschiedlichen Eignungen der modifizierten Transportsequenzen stärker zu tragen kommen läßt (Rensink et al. 1998).

Um einen Vergleich der Transformationsergebnisse zu den *in-vitro*-Importdaten ziehen zu können, wurden atpCGFP-Fusionsproteine ohne Signalsequenz (iatpC1GFP, atpC3GFP bis atpC5GFP) mit isolierten Erbsen-Plastiden inkubiert (Kap. 3.3.2.2.). Alle Fusionsproteine, die mindestens die ersten 23 Aminosäuren der Transitsequenz (iatpC3 bis iatpC5GFP) besitzen, wurden in die Plastiden importiert, wohingegen iatpC1GFP mit seiner 15 Aminosäuren langen Transitsequenz nicht in die Erbsen-Plastiden transportiert werden konnte. Dies stimmt mit den Untersuchungsergebnissen aus den *in-vivo*-Experimenten überein. Die Prozessierung der atpCGFP-Proteine, die sich *in vivo* zeigte, konnte *in vitro* nicht beobachtet werden.

Die *in-vitro*-Importergebnisse lassen des weiteren auf einen unvollständigen Transport der atpCGFP-Proteine durch die Plastidenhüllmembran schließen. Nach Ormö et al. (1996) und Yang et al. (1996) wurde für das GFP-Protein eine dichte β -Faltblattstruktur bestimmt. Die resultierende Stabilität erlaubt dem Protein eine Fluoreszenz zwischen pH 5,5 und 12, in 8 M Harnstoff sowie in 1 % SDS-Lösung (Bokman und Ward 1981; Clontech-Produktinformation). Obwohl die Plastidenmembran eine starke Fähigkeit zur Entfaltung von Proteinen besitzt (Endo et al. 1994), könnte möglicherweise die stabile Proteinstruktur des GFP nur zu einem teilweisen Import in die Plastiden geführt haben. Die anschließende Proteasebehandlung der *in-vitro*-Importansätze führt dann, wie beobachtet, zu einer Degradierung der außerhalb der Plastiden liegenden Proteinbereiche und der Verkleinerung des Proteins.

Die CLSM-Aufnahmen der transformierten *Phaeodactylum*-Zellen zeigen dagegen keinerlei Hinweis auf einen unvollständigen Membrandurchtritt der Fusionsproteine. Es ist anzunehmen, daß verschiedene Chaperone die Konformation des GFP-Proteins im ungefalteten Zustand halten (Agashe und Hartl 2000). Ein unvollständiger Import in die Plastiden entsprechend den *in-vitro*-Daten würde bei der konstitutiven Expression der GFP-Proteine in den *Phaeodactylum*-Zellen zu einer Blockade der Translokatoren in der Plastidenmembran und letztlich zum Absterben des Organismus führen. Trotz der weiten Verbreitung von GFP als *in-vivo*-Transportmarker wurde eine Blockade von Proteintranslokatoren durch das GFP-Protein jedoch bisher nicht beschrieben (Gerdes und Rudolf 1999).

Die *in vivo* wie auch die *in vitro* gewonnenen Ergebnisse deuten an, daß die ersten 23 Aminosäuren der Transitsequenz für den Import entscheidend sind. Die ersten neun Aminosäuren scheinen jedoch *in vitro* nicht notwendig zu sein. Die Deletion der Aminosäuren (ToMo Δ 9YM) resultiert ohne erkennbaren Effizienzverlust in einem Transport in Erbsen-Plastiden (Abb. 3-3). Zusammengefaßt lassen diese Daten darauf schließen, daß nicht die

gesamte erste Hälfte, sondern lediglich das zweite Viertel der Transitsequenz eine wichtige Rolle für den Transport der γ -Untereinheit spielt. Diese Region bildet innerhalb der γ -UE-Transitsequenz den Anfangsbereich der helikalen, amphipatischen Struktur. Wie aber schon angeführt, wird dies durch die N-terminale Deletion der PRK-Transitsequenz in *in-vivo*-Experimenten nicht unterstützt. Ob dies als Zeichen für verschiedene Transportsequenz-Klassen zu bewerten ist, wie es die Lage der helikalen Domäne in der Diatomeen-Transportsequenz andeuten könnte (Abb. 4-1), ist jedoch aufgrund der wenigen bekannten Transportsequenzen unsicher. Spekulativ ist die weitere Überlegung, daß die Sekundärstruktur des verkürzten PRK-Proteins (amphipatische Helixstruktur) eine Deletion des N-Terminus der Transitsequenz funktionell ausgleichen könnte.

Untersuchungen der N-terminalen Hälfte der Transitsequenzen zeigen in der Literatur ein uneinheitliches Bild. Tendenziell scheint aber der N-terminale Bereich eine notwendige Transportfunktion zu besitzen.

Deletionen im Plastocyanin-Protein aus *Chlamydomonas* führen *in vitro* zu einem Import in die homologen Plastiden, wogegen *in vivo* dieser Bereich essentiell erscheint (Lawrence und Kindle 1997). Untersuchungen an Plastocyanin von höheren Pflanzen durch Hageman et al. (1990) zeigen dagegen *in vitro* die Abhängigkeit der N-terminalen Region für den Import.

Nach Pilon et al. (1995) wird die N-terminale Region der Ferredoxin-Transitsequenz als ein entscheidender Faktor für die Lipid-Anbindung an die äußere Plastidenhülle gesehen. Im weiteren liegt nach Rensink et al. (2000) eine Beteiligung an der TOC-Anbindung vor. Untersuchungen zu Bindeaffinitäten von Transitsequenz-Fragmenten der kleinen Untereinheit der Rubisco können die Affinität des N-terminalen Bereiches zur Membran jedoch nicht bestätigen (van 't Hof et al. 1991). Ivey et al. (2000) schlägt für die N-terminale Region der SSU von Rubisco eine Funktion als Bindebereich für die plastidären Hsp70-Chaperone vor, die möglicherweise als ATP-abhängige Motoren das Präprotein in das Stroma ziehen.

Weitere Untersuchungen an den Bereichen der Transitsequenz sind notwendig, um ein klares Bild über die Domänen der variablen Transportsequenzen zu erhalten. Es stellt sich aber die Frage, inwieweit die Ergebnisse bei den höheren Pflanzen für die in das CER translozierten Transportsequenzen überhaupt übertragbar sind, da hier möglicherweise veränderte Lipid- und Transportbedingungen vorliegen (siehe Kap. 4.5.).

4.2.6. ER-Retention und Chloroplastenimport

Lösliche Proteine, die nach ihrem Import das ER nicht verlassen sollen, weisen C-terminal in Säugern oder Pilzen ein HDEL- oder KDEL-Peptidmotiv auf. Da davon auszugehen war, daß die Fusionsproteine der Plastiden-Transportsequenz mit dem GFP sekretiert werden, wurden die atpCGFP-Konstrukte zusätzlich mit dem Retentionssignal (DDEL) des ER-Chaperons BiP aus der Kieselalge *Phaeodactylum* versehen (Apt et al. 1995) (Abb. 3-14). Das BiP-Protein ist an der Faltung und Erkennung nicht korrekt gefalteter Proteine beteiligt (Leborgne-Castel et al. 1999). Die Retention der Fusionsproteine sollte zu einer verstärkten Fluoreszenz von ER-lokalisierten Konstrukten führen, da die natürliche Sekretion der GFP-Proteine unterbunden wird (Gomord und Faye 1996). Die Akkumulation von plastidär lokalisierten Fusionsproteinen vor ihrem Weitertransport in das ER sollte zudem für die Proteine einen identischen, wenn nicht sogar stärkeren Import bewirken.

Der Vergleich der Transformanten mit oder ohne BiP-Retentionssignal am Fusionsprotein zeigte jedoch keine offensichtliche Steigerung der GFP-Fluoreszenz (Abb. 3-12). Beide BiPGFP-Konstrukte wiesen eine intensive Fluoreszenz im ER auf. Dies könnte auf eine sehr hohe Expression zurückzuführen sein. Eine möglicherweise „natürliche“ Retention des GFP-Proteins im ER der Kieselalgen ist eher unwahrscheinlich.

Transformationsexperimente bei der Apicomplexa *Plasmodium* zeigten eine Sekretion von GFP fusioniert an eine Signalsequenz (Waller et al. 2000). Bei Hefen wurde jedoch ein unerwarteter Transport eines zu sekretierenden GFP-Konstruktes in die Vakuole beschrieben (Kunze et al. 1999).

Alle verwendeten γ -UE-Transportsequenzbereiche führten unabhängig von Retentionssignal, bis auf die von den atpC2GFP-Konstrukten, zu der gleichen Lokalisation von GFP in den *Phaeodactylum*-Zellen. Entgegen der Erwartung zeigte das Fusionsprotein mit der kürzesten Transitsequenz (atpC2GFP-DDEL) anstelle eines Plastidenimports eine Lokalisation im ER. Der nicht beobachtete Plastidentransport deutet auf eine Konkurrenz des DDEL-abhängigen Retentionssystems mit dem Plastidenimportsystems. Zudem kann angenommen werden, daß beide Systeme direkt, im selben räumlichen Kompartiment mit dem Plastidenimport- bzw. Retentionssignal Wechselwirken können. Wäre das Retentionssystem vor dem Plastidenimportsystem in einem getrennten Kompartiment, so würden letztlich alle Proteine über das Retentionssignal zurückgehalten (der umgekehrte Fall - Plastidenimport vor ER-Retention – ist zytologisch nicht erklärbar).

Für die Retention von Proteinen im ER wurden bisher zwei generelle Mechanismen beschrieben (Teasdale und Jackson 1996). Einerseits werden Proteine nach ihrer Sekretion aus dem ER in den Golgi-Apparat aktiv wieder zurücktransportiert, andererseits verbleiben Proteine direkt im ER (Füllekrug et al. 1998). Das BiP-Protein wird über den retrograden Transport vom Golgi-Apparat zum ER zurückgesandt (Kühn et al. 1997). Der notwendige Rezeptor (ERD2) für die Selektion der BiP-Proteine aus den zu sekretierenden Proteinen liegt größtenteils im cis-Golgi-Netzwerk vor (Lewis et al. 1990; Hardwick et al. 1990). Falls für das atpC2GFP-DDEL-Protein eine vergleichbare Retention wie für das BiP-Protein vorliegt, so würde dies auf einen retrograden Vesikeltransport innerhalb der vier Hüllmembranen der Plastiden deuten, wobei der Rezeptor in der zweitinnersten Membran liegen würde. Vesikuläre Strukturen sind innerhalb des periplastidären Raum von verschiedenen Heterokontophyta gefunden worden (Crawford 1973, Gibbs 1979).

4.3. *in-vivo*-Transport von Präsequenzen aus anderen Pflanzengruppen in *Phaeodactylum*

Der Transport von Diatomeen- und Rotalgen-Transitsequenzen in die Plastiden von höheren Pflanzen deutet möglicherweise auf einen gemeinsamen Ursprung der Transportsysteme in der Plastidenhüllmembran hin. Durch die Verwendung von Transportsequenzen aus verschiedenen Algen- und Pflanzenlinien für die Transformation von *Phaeodactylum* sollte untersucht werden, ob sich die *in vitro* beobachteten Gemeinsamkeiten *in vivo* bestätigen lassen (Abb. 3-17, 3-18).

Daher wurde zunächst die Transitsequenz der γ -Untereinheit der Spinat-ATPase mit bzw. ohne Signalsequenz an das GFP fusioniert (T γ spiGFP). Die Expression des Konstruktes ohne eine Signalsequenz in den Diatomeen mit ihren vier Hüllmembran-Plastiden führte zu keinem Import in die Plastiden. Nach der Fusion einer Signalsequenzdomäne an die Spinat-Transitsequenz konnte jedoch ebenfalls kein Transport in die Diatomeen-Plastiden nachgewiesen werden (SatpCT γ spiGFP). Im Gegensatz dazu deutet die Fusion der Transitsequenz des Plastocyanins aus Spinat an eine Signalsequenz aus Rindern wiederum einen Plastidenimport an (SppLTpcGFP).

Die gesamte Transportsequenz des PCP-Proteins aus dem Dinoflagellaten *Symbiodinium spec.* (Norris und Miller 1994), welche sowohl aus einer Signal- als auch aus einer möglichen Transitsequenz besteht, führte *in vivo* zu einer eindeutigen Lokalisation in den Diatomeen-Plastiden (STpcpGFP). Bei der ebenfalls beobachteten Lokalisation von

GFP in der Peripherie des Plastiden könnte es sich um eine Akkumulation zwischen der Plastidenhülle und der Gürtellamelle handeln.

Die Diatomeen-Zellen, transformiert mit Genbereichen der Transportsequenz der kleinen Untereinheit der Rubisco aus *Euglena gracilis*, zeigen nach Expression der Konstrukte eine geringe Erkennung der Transportsignale der Euglenophyten in den Kieselalgen. Die vollständige SSU-Transportsequenz (SSU1GFP) und das um die Hälfte der Transitsequenz verkürzte SSU3GFP-Fusionsprotein weisen beide neben einer cytoplasmatischen auch eine ER-Lokalisation auf. Die möglicherweise plastidäre GFP-Lokalisation bei den SSU1GFP-Transformanden ist bei der niedrigen Expressionsrate nicht sicher zu vermuten.

Obwohl nicht in allen Fällen ein Transport in den Chloroplasten der Diatomeen beobachtet werden konnte, unterstützen die *in-vivo*-Untersuchungen die These eines ursprünglichen, gemeinsamen Proteintransportsystems bei den verschiedenen Organismen. Die Transitsequenz aus der höheren Pflanze (Plastocyanin) und dem Dinoflagellaten besitzen trotz geringer Sequenzhomologie gemeinsame Merkmale, die zusammen mit den Diatomeen-Transportsequenzen zu einem Plastidenimport führen können.

Der heterologe Import in die Kieselalgen-Plastiden und auch der durch eine Signalsequenz von Rindern und Euglenophyten vermittelte GFP-Transport in das Diatomeen-ER belegt zudem die Konservierung des ER-Importapparats bei den verschiedenen Gruppen.

Im Detail bewirkt scheinbar nicht jede Transitsequenz-artige Proteinsequenz einen Transport in die Diatomeen-Plastiden. Es ist nicht auszuschließen, daß durch den niedrigen Konservierungsgrad der Transitsequenzen sich die Polypeptide von anderen Organismengruppen verschiedenartig in den Diatomeen verhalten (v. Heijne 1989). Dies könnte zu dem unterschiedlichen Ergebnis mit der Transportsequenz von Plastocyanin und der der γ -Untereinheit der ATPase aus Spinat geführt haben.

Der, wenn überhaupt, geringe Plastidenimport bei den Euglenophyten ist möglicherweise in der relativ langen Transportsequenzen dieser Organismen begründet. Transportsequenzen von Euglenophyten besitzen eine Länge bis zu rund 150 Aminosäuren, wobei der größte Anteil auf die Transitsequenz entfällt (Sulli et al. 1995).

Untersuchungen von Schwartzbach et al. (1998) haben gezeigt, daß der Transport über das ER zum Golgi-Apparat und dann vermutlich vesikulär zu den Plastiden führt. Eine wichtige Funktion für den Transport wurde hierbei dem C-Terminus der Transitsequenz zugeordnet. Dieser führt durch eine hydrophobe Domäne zu einer Verankerung der Transitsequenz in der ER-Membran (Sulli et al. 1999). Es ist nicht auszuschließen, daß dieser Membrananker eine Störung des weiteren Transportes bewirken kann. Die Deletion des Ankers steigert die Importrate in das ER und führt aber wie bei der Transitsequenz aus der γ -Untereinheit aus Spinat zu einer Akkumulation in einer Post-ER-Region, die nahe dem Plastiden liegt.

Der Transport der Dinoflagellaten-Präsequenz in die Diatomeen-Plastiden ist von Interesse, da für den Plastidenimport in den Dinoflagellaten ein Proteintransport über den Golgi-Apparat analog der Euglenophyten vorhergesagt wird (Schwartzbach et al. 1998). Dinoflagellaten weisen wie die Chromophyten eine zweigeteilte Präsequenz auf, wobei die erste Domäne einer eukaryotischen Signalsequenz ähnelt (Norris et al. 1994; Sharples et al. 1996). Die Dinoflagellaten-Signalsequenz ermöglicht den kotranslationalen Transport in ER-Vesikel (Lang 1996). Die zweite Domäne zeigt dagegen nur geringe Ähnlichkeiten zu Transitsequenzen der höheren Pflanzen. Der Import in die Diatomeen-Plastiden deutet erstmalig funktionell für diese Region eine Aufgabe als Transitsequenz an. Die Expression der Dinoflagellaten-Transportsequenz in *Phaeodactylum* läßt zudem keinen Transport in das Golgi-System erkennen.

Der Transport der Dinoflagellaten-Präsequenz könnte auf den von Sarah Gibbs (1981) vorgeschlagenen vesikulären Transportprozeß innerhalb der vier Hüllmembranen der Diatomeen-Plastiden hinweisen. Andererseits könnte die Dinoflagellaten-Transitsequenz durch einen Proteintranslokator der inneren CER-Membran erkannt worden sein (Cavalier-Smith 1999).

4.4. Voruntersuchungen zum möglichen vesikulären Transport im periplastidären Raum der Diatomeen-Plastiden

Elektronenmikroskopische Aufnahmen weisen für die Heterokontophyten auf vesikuläre Strukturen innerhalb der Plastidenhülle hin (Bouck et al. 1965). Über die Funktion dieser Vesikel kann derzeit keine gesicherte Aussage getroffen werden. Es wurde vorgeschlagen, daß sie an einem Metabolitentransport sowie an der Regulation der periplastidären Membranen beteiligt (Cavalier-Smith 1999) oder in einem vesikulären Proteintransport involviert sind (Gibbs 1981).

In beiden Fällen sind für die Bildung, Regulation und Stabilisierung der Vesikel Proteine zwischen den periplastidären Hüllmembranen notwendig (Martinez und Goud 1998). Um den Ort ihrer Funktion zu erreichen, müssen diese Proteine mit einer Signalsequenz zuerst den sekretorischen Weg in das ER beschreiten, um anschließend vermittelt durch ein derzeit unbekanntes Signal vom CER in den Intermembranraum der zweiten und dritten Plastidenhüllmembran zu gelangen.

Der Transport von Proteinen in Vesikel ist bei Säugern und Hefen schon weitreichend untersucht worden (Gerdes und Rudolf 1999). Bei Pflanzen und im besonderen bei Algen ist dagegen sehr wenig bekannt (Fabry et al. 1992; Fabry et al. 1995). Um Hinweise auf Proteine des vesikulären Proteintransportes in der Plastidenmembran zu erhalten, wurde nach der kodierenden Sequenz von kleinen GTPasen in der cDNA-Bibliothek aus *Odontella sinensis* gesucht (Kap. 3.4.). Das Ziel war es, GTPase-Gene zu finden, die zusätzlich einen kodierenden Bereich für eine Signalsequenz besitzen, da alle derzeit beschriebenen GTPasen des vesikulären Transportes cytosolisch vorliegen .

Die kleinen GTPasen des vesikulären Transportes – die ARF- bzw. die RAB-Proteine (=YPT-Proteine) – gehören zusammen wie die RAN-, Rho- oder RAS-Proteine in die *RAS*-Superfamilie. Für die RAB- bzw. ARF-Proteine werden eine Beteiligung an allen regulatorischen Vorgängen der Vesikelbildung und Fusion vorgeschlagen (Martinez und Goud, 1998; Ragnini-Wilson A. 1999). Es konnte gezeigt werden, daß sie an der Aktivierung und Stabilisierung von SNARE-Komplexen („soluble-NSF-attachment-protein-receptors“) beteiligt sind (Johannes et al. 1996). RAB- bzw. ARF-Proteine durchlaufen vermittelt über einen Membrananker einen membrangebundenen und einen löslichen Zustand (Novick und Zerial, 1997).

Aus der Kieselalge *Odontella sinensis* wurden drei PCR-Fragmente von kleinen GTPasen isoliert: die ARF1-GTPase ist am COPI-Proteintransportweg (Golgi- zum ER-System) (Higo et al. 1993; Dascher et al. 1994), das YPT1-Protein am COPII-Weg (ER zu Golgi-Apparat) (Palme et al. 1992; Barlowe et al. 1998) und das RAB5-Protein in der Endosomenfusion des phagotrophen Weges beteiligt (Chavier et al. 1990; Bucci et al. 1992).

Vom ARF1- und YPT1-Gen aus *Odontella* konnte das hintere Gen-Ende mit dem kodierenden Bereich für ca. 70 % des Proteins isoliert werden. Vom RAB5-Gen wurde dagegen ein Genbereich für den N-terminalen Teil des Proteins (31 %) gefunden. Die Translation des sehr kurzen 5'-untranslatierten Bereiches von RAB5 zeigt keinerlei Transportsequenz und deutet somit auf eine cytoplasmatische Variante hin. Alle Genfragmente zeigen innerhalb ihrer Länge die typischen funktionellen GTP-bindenden und regulatorischen Domänen der GTPasen (Sprang 1997;

Lazar et al. 1997). Die Regionen G1, G3 und G4 sind an der Bindung der Phosphate im GTP- bzw. an der Erkennung des Guanin-Ringes beteiligt und G5 wirkt stabilisierend auf die GTP-Erkennungsstelle. Die Region G2 stellt die Bindedomäne für Effektor-Komplexe dar (Shirataki et al. 1993; Horiuchi et al. 1997). Das ARF1-Fragment weist außerdem die Erkennungs- und die Bindestelle für das GTPase-aktivierende Protein (GAP) auf (Goldberg 1999). Das YPT1-Fragment zeigt zusätzlich zu der GAP-Effektorregion das typische carboxyterminale Doppel-Cystein-Motiv auf, an welches der Membrananker gebunden wird.

Nach der Isolation der gesamten Gensequenz aus der cDNA-Bibliothek von *Odontella sinensis* wurde eine phylogenetische Betrachtung der drei GTPasen durchgeführt (Kilian 1999). Das YPT1-Gen gruppiert mit dem Oomyceten *Phytophthora infestans* außerhalb der Pflanzengruppe. Dies steht im Einklang mit der Vermutung, daß eine Oomycete als zweiter Wirt an der sekundären Endocytobiose beteiligt war (Van de Peer und De Wachter 1997). Phylogenetische Vergleiche mit dem RAB5-Protein zeigen eine Gruppierung mit verschiedenen höheren Pflanzen, was auf eine GTPase aus dem eukaryotischen Endosymbionten (vermutlich eine Rotalge) hindeuten könnte. Für ARF1 kann keine klare Aussage zum Ursprung getroffen werden. ARF1 gruppiert weit entfernt von Pflanzen und Pilzen mit Parasiten (*Plasmodium*) und Protisten (*Giardia*).

In weitergehenden Experimenten konnte nur mit Primern gegen YPT1-artige GTPasen ein Genfragment gewonnen werden, welches im 5'-Bereich eine Sequenzerweiterung aufweist. Der Prä-Bereich kodiert für 27 Aminosäuren, die nach Berechnungen eine eukaryotische Signalsequenz von 15 Aminosäuren für einen Transport in das ER darstellen. Die Prozessierung der vermuteten Signalsequenz deutet auf eine zweite Transportdomäne vor dem reifen Protein (₁₆QRHASKGYKEQTN₂₇) hin, die durch einen hohen Anteil geladener Aminosäuren gekennzeichnet ist. Diese Region weist keinerlei Ähnlichkeiten zu bekannten Transportsequenzen auf.

Die YPT1-GTPasen sind bei Säugern und Hefen an der Fusion von ER-Vesikeln mit der cis-Golgi-Zisterne im COPII-Proteintransportweg beteiligt. Die Entdeckung eines YPT1-artigen Fragmentes mit einer mutmaßlichen Signalsequenz könnte ein Hinweis auf einen möglichen COPII-Proteintransportweg innerhalb des periplastidären Raumes sein. Dies deutet im weiteren darauf hin, daß die zweitäußerste Membran der Diatomeen-Plastiden (innere CER-Membran) Funktionen des ER übernommen hat. Für die zweitinnerste Plastidenmembran würde dies Charakteristika einer Golgi-artigen Membran vermuten lassen, wo das YPT1 seine Funktion bei der Vesikelfusion ausüben könnte. Entsprechend eines ER-zu-Golgi-Transportes wäre zudem ein Rücktransport der Vesikel über den COPI-Transportweg anzunehmen (Dupree und Sherrier 1998; Nickel und Brügger 1999). Entsprechend den Ergebnissen zu der ER-Retention der verschiedenen GFP-DDEL-Varianten würde der Rezeptor für das Retentionssignal des BiP-Proteins in der zweitinnersten Membran liegen (Gormord et al. 1999).

Nur durch vollständige Isolation des YPT1-artigen Genes aus der cDNA-Bibliothek und die Untersuchung des Proteintransportes kann eine eindeutige Aussage über Lokalisation der GTPase geben werden.

4.5. Endocytobiosen und Proteintransport in die Plastiden

Die Aufnahme eines photoautotrophen Organismus bei der primären oder sekundären Endocytobiose bedeutete eine große Umstellung der zellulären Bedingungen für den späteren Endosymbionten und für den Wirt. Im Laufe der Zeit wurde die autarke Funktion des aufgenommenen Organismus immer mehr zu Gunsten einer Endosymbiose reduziert. Gekoppelt war diese Entwicklung durch einen Transfer von Genen aus dem Endosymbionten-Genom in den Kern des Wirtes, welcher nach Verlust der Gene im Endosymbionten-Genom zu einer genetischen Abhängigkeit des Endosymbionten vom Wirtsgenom führte.

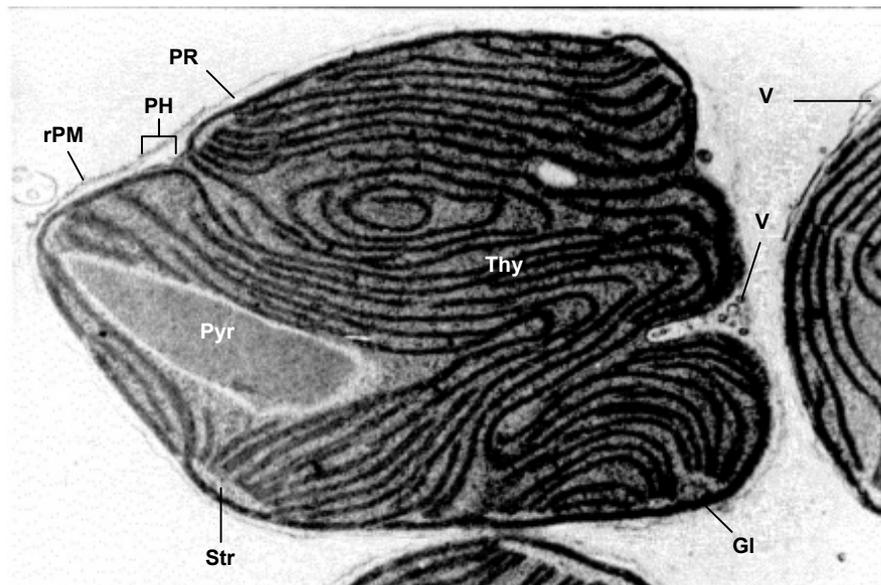


Abbildung 4 - 4 Elektronenmikroskopische Aufnahme von isolierten Plastiden aus *Odontella sinensis*

Die elektronenmikroskopische Aufnahme zeigt die verschiedenen Hüllmembran-Zusammensetzungen nach der Isolation der Plastiden nach Wittpoth et al. 1998. Im Bild markiert ist der Pyrenoid (Pyr), die Gürtellamelle (Gl), die Thylakoide und das Stroma (Str). In der Plastidenhülle (PH) ist der periplastidäre Raum (PR) und die periplastidären Vesikel (V) zu beobachten. Die Isolation der Plastiden führt zum Zerreißen der CER/ER-Verbindungen und resultiert in einer heterogenen Anzahl an Hüllmembranen um den Plastid. Die Ribosomen-besetzte äußere Hüllmembran (rPM) ist jedoch teilweise vorhanden. (Aufnahme erstellt von Prof. Kowallik, Universität Düsseldorf)

In diesem Kontext kann vermutet werden, daß zuerst die im Wirt exprimierten Endosymbionten-Proteine in den Endosymbionten zurücktransportiert wurden, bevor die entsprechenden Gene ihre Funktion im Symbionten-Genom verloren.

Auch für den Wirt führte der Einbau von Endosymbionten-Genen in das Genom zu einer Veränderung. Phylogenetische Untersuchungen an Enzymen der Glykolyse weisen für einige Proteine auf einen möglichen Ursprung aus dem Endosymbionten hin (Martin et al. 1993).

Der Ursprung der Plastidenhüllen und die Entwicklung der Proteinimportmechanismen in den Chloroplasten höherer Pflanzen ist derzeit ein Gebiet von großem Interesse. Einer der Hypothesen bei der Etablierung der primären Endocytobiose ist die phagotrophe Aufnahme des Cyanobakterien-Vorläuferorganismus durch einen Eukaryoten (Calvier-Smith 2000). Ob die phagotrophe Membran während der Evolution aufgelöst wurde oder ob es zu einer Fusion mit der äußeren Hüllmembran des Cyanobakterien-Vorläufers gekommen ist, ist derzeit unklar. Untersuchungen belegen jedoch in der äußeren Hüllmembran Lipide (Joyard et al. 1991) und Proteine eukaryotischen wie prokaryotischen Ursprungs (Reumann und Keegstra 1999). Eines der Proteine mit einem wahrscheinlich cyanobakteriellem Ursprung ist der Proteintranslokator Toc75 (Bölter et al. 1998). Untersuchungen deuten für das analoge Protein aus *Synechocystis spec. SPP6803* (SynToc75) eine Exportfunktion für Proteine aus dem Cyanobakterium an. In der Plastidenmembran besitzt der Translokator dagegen eine Importfunktion. Ein einfacheres Erklärungsmodell für die Umorientierung der Funktion ist bei dem Import kernkodierter plastidärer Proteine zu finden. Mehrere Komponenten des äußeren Transportkomplexes sind während der Evolution in den Kern transferiert worden (Toc75, Toc86, Toc34).

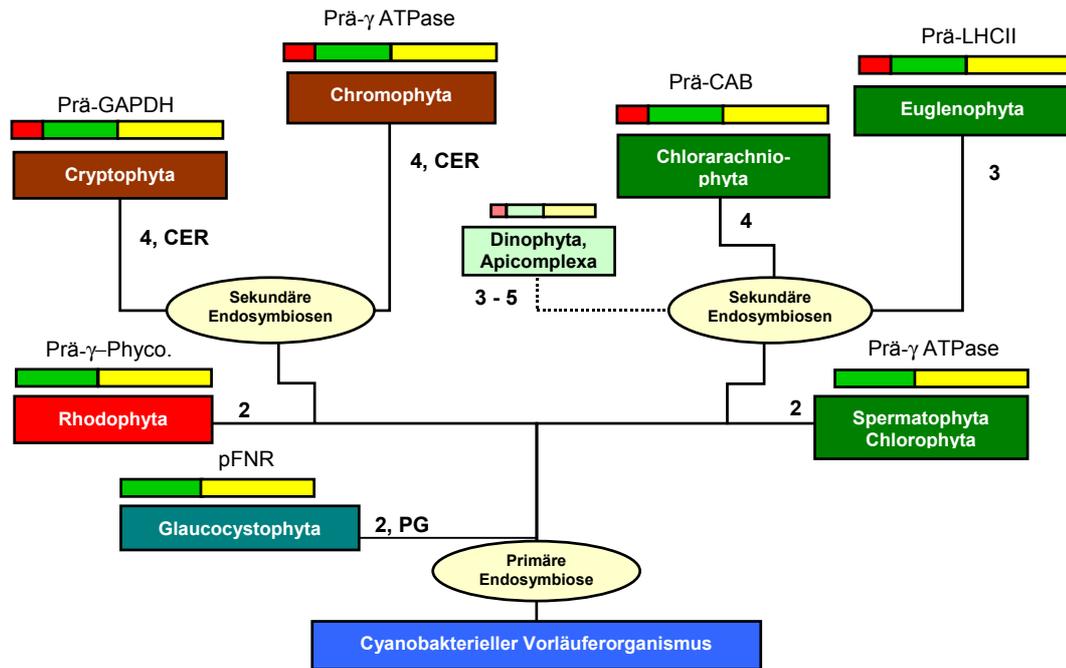


Abbildung 4 - 5 Transportsequenzen kernkodierter Plastiden-Proteine in Zusammenhang zu den Algen-Entwicklungslinien

Schematische Darstellung verschiedener Pflanzenlinien mit zusätzlicher Darstellung eines repräsentativen, kernkodierten plastidären Präproteins. Der vereinfachte Stammbaum beruht auf Martin et al. (1998), Douglas (1998) sowie Delwiche und Palmer (1997). Kernkodierte Plastiden-Proteine sind schematisch oberhalb des Namen des Pflanzen/Algenstammes angegeben: Ein rotes Rechteck steht für eine Signalsequenz und ein grünes für eine Transitsequenz. Ein gelbes Rechteck stellt das reife Protein dar. Die Zahlenangaben neben den Namen der verschiedenen Pflanzen/Algenlinien stehen für die Anzahl der Plastidenhüllmembranen. (CER) : Chloroplasten-ER, (PG): Peptidoglycanwand zwischen den Plastidenhüllen.

Prä- γ ATPase aus *Odontella sinensis* (Chromophyta) und *Spinacia oleracea* (höhere Pflanze) bzw. *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta), LHC-Proteine aus *Euglena gracilis* (Euglenophyta), präCAB aus *Chlorarachnion spec.* (Chlorarachniophyta) und pFNR aus *Cyanophora paradoxa* (Glaucocystophyta). Dinoflagellaten und Apicomplexa sind aufgrund ungesicherter Daten zur Evolution bzw. durch große Heterogenität nur angedeutet. Als Beispiele für plastidäre Präproteine kann für Dinoflagellaten das PCP aus *Symbiodinium spec.* und für die Apicomplexa das ACP-Protein aus *Toxoplasma gondii* angesehen werden.

Es ist vorstellbar, daß einige der Translokator-Komponenten genauso wie die Proteine der äußeren Plastidenmembran OEP7, 14, 16, 24 cytosolisch exprimiert und anschließend in die Membran integriert sind (Heins et al. 1998; Cavalier-Smith 2000). Erst nachträglich haben die meisten Komponenten spezifische Transportsignale erhalten (Lübeck et al. 1997). Bei gleichbleibender Integrationsorientierung der Plastiden-Proteine ist das Protein und somit die Funktion aus Sicht der „Plastide“ umgekehrt.

Bei den Plastiden mit zwei Hüllmembranen verläuft der Proteinimport posttranslational. Die Untersuchungen zum Transport der γ -Untereinheit aus *Odontella* in Erbsen-Plastiden *in vitro* und die der Dinoflagellaten- bzw. der höheren Pflanzen-Transportsequenz *in vivo* (Kap. 3.2. bzw. 3.3.2.). sprechen zusammen mit den Untersuchungen an plastidären Rotalgen- und Grünalgen-Proteinen für eine Verwandtschaft der Transportapparate (Yu et al. 1988; Apt et al. 1993). Entsprechend der vermuteten Evolution der Diatomeen-Plastiden aus den Rotalgen sind die konservierten Translokatoren in den beiden innersten Membranen der Diatomeen-Chloroplasten zu vermuten.

Erklärbar ist die Verwandtschaft der Transportsysteme der Plastiden über den möglichen Gentransfer bei der Etablierung der sekundären Endocytobiose. Neben einem direkten Gentransfer vom Plastidengenom in das neue Wirtsgenom, fand voraussichtlich auch einer vom ersten in das zweite Wirtsgenom statt. Der Transfer von

kernkodierten Plastidengen aus dem ersten Wirtsgenom könnte zu einer Beibehaltung des plastidären Importweges geführt haben, da diese schon mit einem funktionierenden Transportsystem verknüpft waren. Eine schnellere Entwicklung eines Rücktransportsystemes könnte durch die von Häuber et al. (1994) vorgeschlagenen Endocytobiose eines photoautotrophen Eukaryoten durch eine andere Alge ermöglicht worden sein. Hierbei könnte auf schon vorhandene plastidäre Gene im zweiten Wirt zurückgegriffen werden.

Bei der sekundären Endocytobiose sind durch die Aufnahme eines photoautotrophen Eukaryoten durch eine eukaryotische Wirtszelle zuerst „Plastiden“ mit vermutlich vier Hüllmembranen entstanden (Cavalier-Smith 1999). Die beiden innersten Membranen gehören zur eigentlichen Plastide des Endocytobionten, die zweit äußerste Membran entspricht der Plasmalemma-Membran des ersten Wirtsorganismus und die äußerste Membran der phagotropen Membran des zweiten Wirtes. Die bei allen Plastiden mit mehr als zwei Hüllmembranen beobachtete Signalsequenz der kernkodierten Plastiden-Proteine läßt vermuten (Abb. 4-5), daß die Plastiden-Proteinen zuerst über den sekretorischen Weg vom ER zum Golgi und dann in Vesikel verpackt zur phagotropen Membran transportiert worden sind. Dieser Transportweg wird derzeit für die Chlorarachniophyten- und Apicomplexa-Präproteine angenommen (Bodyl 1997, Cavalier-Smith 1999).

Für die Euglenophyten ist ein vergleichbarer Transportweg zur Plastide schon hinreichend untersucht worden (Schwartzbach et al. 1998). Innerhalb der Plastidenhülle liegt jedoch möglicherweise durch den postulierten Verlust der Plasmalemma-Membran des ersten Wirtes ein andersartiger Transport vor (Cavalier-Smith 1999).

Für die Chromophyten, zu denen auch die Diatomeen gehören, ist jedoch durch eine Verschmelzung der phagotropen Membran mit dem ER der Transport über das Golgi-System unnötig (Gibbs 1981; Cavalier-Smith 1999). Der Import der γ -Untereinheit der plastidären ATPase und des PRK-Proteins in ER-Vesikel belegt, daß der erste Transportschritt für den Eintritt in die Diatomeen-Plastiden über das endoplasmatische Reticulum erfolgt (Kap. 3.1.).

Für die Annahme, daß der Proteintransport in die komplexen Plastiden direkt nach der sekundären Endocytobiose erst einmal über das ER und Golgi-System zu den Plastiden erfolgte (Cavalier Smith 1999), ist eine Sortierung der Plastiden-Proteine im Golgi-Apparat in Vesikel zu postulieren. Ein Hinweis hierfür kann in dem Proteintransport von Plastiden-Proteine der Apicomplexa gesehen werden. Plastiden-Proteine der Apicomplexa besitzen wie die der Diatomeen eine N-terminale Signalsequenz und werden nach einem ER-Import über den Golgi-Apparat zum Apicoplast transportiert (Waller et al. 2000). Untersuchungen mit Hilfe des GFP-Proteins zeigen die Abhängigkeit des Plastidenimports von der Transitsequenzdomäne (Waller et al. 2000). Ohne den Transitsequenzbereich in der Präsequenz wird das GFP-Protein sekretiert. Dieser Sortiermechanismus könnte bei den Diatomeen nach der Verschmelzung des ER mit der phagotropen Membran zu einem Rücktransportsystem von Plastiden-Proteinen zu dem CER umgewandelt worden sein. Eine Beteiligung eines Homologs des Transitsequenz-Rezeptors (TOC159) an der Sortierung ist vorstellbar (Abb. 4-6). Als Hinweis für eine „Golgi \rightarrow ER“-Retention kann eventuell die starke GFP-Akkumulation von atpC1GFP mit oder ohne dem ER-Retentionssignal DDEL gesehen werden.

Durch welchen Mechanismus die Plastiden-Proteine nach ihrem Eintritt in das ER über die ehemalige Plasmalemma-Membran des ersten Wirtes transportiert werden, ist derzeit ungewiß. Es werden derzeit zwei Modelle diskutiert. Nach Cavalier-Smith (1999) erfolgt ein direkter Transport über die zweite Membran durch einen Translokator in den periplastidären Raum und anschließend einer entsprechend den höheren Pflanzen über den TOC/TOC-Translokator in die Plastiden (Abb. 4-7A). Sarah Gibbs (1979) postulierte dagegen eine vesikuläre Translokation durch den periplastidären Raum (Abb. 4-7B).

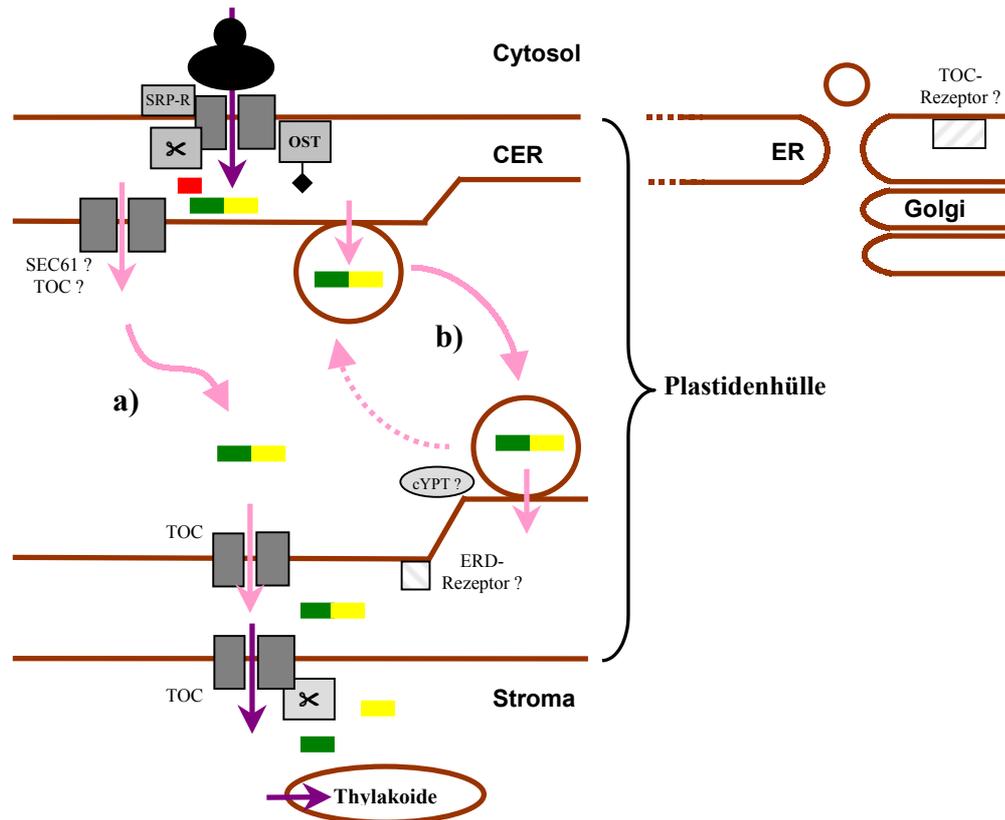


Abbildung 4 - 6 Proteintransport in der Plastidenhülle von Kieselalgen

Schematische Darstellung der möglichen Transportwege von kernkodierten Plastiden-Proteine über das CER (ER) in den Plastid bzw. Thylakoid. Direkter Transport über die ehemalige Plasmalemma-Membran des ersten Wirtes für Proteine des Intermembranraumes bzw. Plastiden-Proteine, die anschließend über den TOC/TOC-Komplex in das Stroma transportiert werden (a). Andererseits könnten die Plastiden-Proteine in Vesikel verpackt werden, die anschließend mit der nächsten Membran fusionieren (b). Die Proteine könnten dann anschließend über den TOC-Komplex alleine transportiert werden. Innerhalb der Plastiden erfolgt der Weitertransport möglicherweise analog den bekannten Transportwegen.

Pfeile in violett bezeichnen experimentell gesicherte Transportwege und Pfeile in rosa mögliche Wege. Schematisch ist die Signalsequenz rot, grün die Transitsequenz und gelb das reife Protein dargestellt. (⌘) stellen entscheidende Proteasen dar (Signalpeptidase, stromale Transitpeptidase), (OST) bezeichnet die Oligosaccharyltransferase zur Glykosylierung von ER-Proteinen, (SRP-R) den SRP-Rezeptor des kotranslationalen Importapparates und (ERD) den (K/H/D)DEL-Rezeptor des ER-Retentionssystems.

Um die Plasmalemma-Membran direkt zu durchqueren, könnte als möglicher Translokator das für den Export von glykosylierten und missgefalteten Proteinen aus dem ER-Lumen zuständige Transportsystem adaptiert worden sein (Hiller et al. 1996; Römisch et al. 1997; Ivessa et al. 1999). An dem Export aus dem ER wird eine Beteiligung des Sec-Membrankomplexes (sec61) vermutet (Römisch 1999).

Ebenfalls könnte das Transitsequenz-Transportsystem (TOC) hierbei beteiligt sein (Abb. 4-6). Alle Komponenten des Plastidenimportapparates sind bei höheren Pflanzen im Kern kodiert (Keegstra und Fröhlich 1999). Um zu den inneren Plastidenhüllmembranen der Diatomeen zu gelangen, mußten die Proteine in das die Plastiden umhüllende ER transloziert werden. Es ist durchaus denkbar, daß hierbei die Komponenten des Translokators zusätzlich in die innere CER-Membran integriert sind.

EM-Aufnahmen zeigten schon in den sechziger und siebziger Jahren die Existenz von vesikulären Strukturen in der Membran verschiedener heterokontophytischer Algen (z.B. Bouck 1965, Crawford 1973). Die These einer Beteiligung der periplastidären Vesikel an einem Proteintransport wurde durch Untersuchungen der

Proteinbiosynthese bei der Heterokontophyta *Ochromonas danica* aufgeworfen (Gibbs 1979). Die Inkubation der Algen mit Chloramphenicol oder Spectinomycin, zwei Inhibitoren der bakteriellen Proteinbiosynthese, bewirkt eine starke Akkumulation von Vesikeln im periplastidären Raum (Smith-Johannssen und Gibbs 1972; Smith-Johannssen et al. 1980). Dagegen führt die Hemmung der cytoplasmatischen Proteinbiosynthese und somit auch der Synthese von kernkodierten Plastiden-Proteinen mit Cycloheximid zu einer Verringerung der periplastidären Vesikel (Gibbs 1979).

Das in Kapitel 4.4. beschriebene Ypt1-artige Genfragment mit dem möglicherweise kodierenden Bereich für eine Signalsequenz deutet eventuell auf einen vesikulären Mechanismus, der eine analoge Funktion zu dem Proteintransport nach dem COPII-Mechanismus (ER→Golgi) besitzt. Auch die teilweise Hemmung des Plastidenimports von plastidären Proteinen durch das ER-Retentionssignal BiP (Kap. 4.2.6.) spricht aufgrund des Mechanismus der BiP-Protein-Retention für eine Beteiligung eines vesikulären Proteintransportweges (Abb 4-6 Weg b). Der für den Rücktransport notwendige Vesikelfluß von der zweitinnersten Plastidenhüllmembran zur inneren CER-Membran, könnte zudem dafür sorgen, den Membranhaushalt der beiden inneren Membranen der Plastiden im Gleichgewicht zu halten oder Metabolite des Chloroplasten zum ER zu transportieren (Bouck 1965).

Der vesikuläre Proteintransportweg schließt einen Translokator in der Membran nicht aus. Jedoch anstelle Plastiden-Proteinen den Eintritt in den periplastidären Raum zu ermöglichen, dient dieser dazu, Proteinkomponenten für den Vesikelauf- bzw. -abbau zu translozieren.

Cavalier-Smith schlug für den Transport über die beiden inneren Plastidenmembranen einen Transport über die beiden bei höheren Pflanzen bekannten TOC/TOC-Translokator Komplexe vor (Abb. 4-6 Weg a) (Cavalier-Smith 2000). Der Transport der Diatomeen- γ -Untereinheit der plastidären ATPase in die Plastiden aus höheren Pflanzen könnte hierfür sprechen (Kap. 3.2.). Dieses Ergebnis schließt jedoch einen vesikulären Transport bei den Diatomeen nicht aus. Untersuchungen an Mitochondrien haben die Existenz zweier unabhängig voneinander agierender Transportsysteme gezeigt (Segui-Real et al. 1993). Auch für die Chloroplasten-Translokatoren konnte dies an osmotisch gestreßten Plastiden durch Scott und Theg (1996) nachgewiesen werden (Abb. 4-7). Nach der Sekretion der Proteine aus den Vesikeln in den Intermembranraum der beiden innersten Hüllmembranen würde im Anschluß nur ein Transport über den TOC-Komplex in die Plastiden stattfinden.

Es ist zu anzunehmen, daß der beobachtete Vesikelfluß zwischen den beiden inneren Membranen der Plastidenhülle zu einer Angleichung der Lipidzusammensetzungen der Membranen geführt hat. Dies könnte wiederum auf die Bindeeigenschaft der Transitsequenz an die Membran einen Einfluß haben. Ob dies einer der Gründe für das unterschiedliche Aussehen der Transitsequenzen der Diatomeen ist oder die schon erwähnte Trennung zwischen mitochondrialen und plastidären Sequenzen (Kap. 4.2.1.), ist ungewiß.

Aufgrund der gewonnenen Ergebnisse und der derzeitigen Literatur kann nicht zwischen den beiden vorgestellten Modellen (Abb. 4-6 a und b) sicher unterschieden werden. Es muß sich jedoch gefragt werden, warum die ehemalige Plasmalemma-Membran der Diatomeen nicht ebenfalls, wie für die Dinoflagellaten und Euglenophyten vermutet, aufgelöst wurde, wenn sie über einen Translokator bzw. Pore direkt durchschritten werden konnte.

Eine alleinige Funktion der beobachteten Vesikel zum Metabolit- und Ionen transport (Cavalier-Smith 2000) ist zudem nur schwer ersichtlich, da nicht auszuschließen ist, daß hierbei Proteine in die Vesikel zufällig verpackt werden.

Für weitergehenden Untersuchungen können die Transformanden mit verkürzter FCP-Transitsequenz von Bedeutung sein (Kap. 3.3.2.3.). Im Gegensatz zu der eindeutigen ER-Lokalisation des GFPs in den atpC1GFP-Transformanden, zeigt sich eine Akkumulation des GFPs in einem Kompartiment direkt assoziiert am Plastid. Ob es sich hierbei vielleicht um eine Ansammlung im periplastidären Raum (direkte Translokation) oder im Membranraum zwischen der ersten oder zweiten Plastidenmembran (Vesikeltransport) handelt, können nur immunoelektronenmikroskopische Untersuchungen klären.

4.6. Intraplastidärer Proteintransport der Diatomeen

Für das Verständnis des Proteintransports von kernkodierten Plastiden-Proteinen in den Kieselalgen ist auch die intraplastidäre Verteilung importierter Proteine von Interesse (Robinson et al. 2000). Bei höheren Pflanzen sind verschiedene Transportwege beobachtet worden. Lumenale Proteine werden über den Sec- und über den Δ pH-Weg transportiert. Für thylakoidale Membranproteine wurde die direkte Integration und ein SRP-abhängiger Weg beschrieben. Untersuchungen zum Thylakoidtransport bei den Algen fehlen größtenteils. Vor allem für Algen, die aus einer sekundären Endocytobiose entstanden sind, ist nichts über die möglichen Unterschiede oder Gemeinsamkeiten des thylakoidalen Proteintransportes bekannt.

4.6.1. Das Diatomeen-Thylakoidimportsystem

Die bisher einzigen verfügbaren Untersuchungen an Algen zum Import in die Thylakoide wurden bei den Chlorophyten gewonnen. Rufenacht und Boschetti etablierten 1997 ein *in-vitro*-Thylakoidimportsystem aus *Chlamydomonas*. Mit diesem System wurden in Gegenwart von 5 mM ATP und stromalem Extrakt homologe Proteine des Sec- bzw. Δ pH-Weges in die Thylakoide importiert. Durch die fehlende Analyse der Importbedingungen konnten jedoch keine Aussagen über den genauen Mechanismus getroffen werden.

Bei Diatomeen sind nur wenige Methoden für die Isolation von Thylakoidmembranen bekannt. Von Martinson et al. (1998) wurde zum Beispiel eine Methode zur Isolation von Thylakoiden aus *Cylindrotheca fusiformis* beschrieben. Die mit 2 M Sorbit isolierten Thylakoidmembranen zeigten einen Elektronentransport und waren zur Sauerstoffentwicklung befähigt. Untersuchungen zum Proteintransport wurden mit diesen Membranen nicht durchgeführt.

Das in dieser Arbeit vorgestellte Verfahren zur Isolation von Thylakoiden stellt eine einfache und schonende Methodik für die großen einzelligen Diatomeen *Odontella sinensis* und *Coscinodiscus granii* dar. An die Isolationsmethode mußte die Bedingung geknüpft werden, einen transmembranen Protonengradienten aufbauen zu können. Dieser stellt die Triebkraft für den sec-unabhängigen Proteintransportweg (Δ pH-Weg) in das Thylakoidlumen der höheren Pflanzen dar (Mould und Robinson 1991). Die Thylakoide aus *Coscinodiscus* zeigten nach der Isolation einen Elektronentransport (Hill-Reaktion) und wie für die Untersuchungen gefordert, eine reversible Ausbildung eines Δ pH-Gradienten bei Belichtung.

4.6.2. Integration von FCP in die Thylakoidmembran

Die Lichtsammelkomplexe der Photosysteme in den Diatomeen werden durch die FCP-Proteine gebildet. Sie binden Chlorophyll a und c sowie das Carotinoid Fucoxanthin. Nach Green und Durnford (1996) besitzen die FCP-Proteine eine vergleichbare Struktur wie die LHC-Proteine der höheren Pflanzen. Diese Analogie könnte ebenfalls für die FCP-Proteine auf einen vergleichbaren Proteintransport in die Thylakoidmembranen hindeuten.

Zur begrifflichen Klärung wird im weiteren der Begriff „LHC“ für die LHC-Proteinen der höheren Pflanzen verwendet und nicht als Sammelbegriff für die Protein-Familie aller Lichtsammelproteine.

LHC-Proteine der höheren Pflanzen werden nach Untersuchungen von Li et al. (1995) mit einem zu Prokaryoten und Eukaryoten verwandten Transportweg in die Thylakoidmembran der Plastiden integriert. Es konnte ein am LHC-Transport beteiligtes Protein isoliert werden, welches Homologien zum 54-kDa-Protein des Signalerkennungspartikels (SRP) des kotranslationalen Transportes zeigte (cpSRP54) (Li et al. 1995) Untersuchungen von Hoffman und Franklin (1994) wiesen zudem eine GTP-Abhängigkeit für den LHC-Import nach.

Obwohl zunächst von einer Beteiligung einer RNA-Komponente im plastidären SRP ausgegangen wurde, belegen neuere Untersuchungen bei höheren Pflanzen eine Beteiligung eines 43 kDa-Protein-Dimeres (cpSRP43) im plastidären SRP-Weg anstelle der RNA (Schuenemann et al. 1998). Rekonstitutionsexperimente mit dem cpSRP54, dem cpSRP43 und dem cpSRP-Rezeptor (cpFtsY) führten unter GTP-Zugabe zu einem Transport von LHC-Proteinen in die Thylakoidmembran (Kogata et al. 1999; Tu et al. 1999).

4.6.2.1. SRP-abhängige und unabhängige FCP-Integration

Nach Strukturanalysen der FCP-Proteine findet sich innerhalb der Präsequenzen ähnlich wie in LHC-Proteinen höherer Pflanzen kein Adressierungssignal für die Thylakoide. Die Transformation von *Phaeodactylum tricorutum* mit dem FCPGFP-Konstrukt zeigt demgemäß eine Lokalisation des Fusionsproteins im Stroma. Dies weist ebenso wie für die LHC-Proteine höherer Pflanzen auf eine Thylakoidtransferdomäne innerhalb des reifen Proteins hin. Untersuchungen zum LHC-Import belegen, daß die Präsequenzen der LHC-Proteine nur für den Import in die Plastiden zuständig sind und zudem austauschbar mit anderen Transitsequenzen sein können (Cline 1988; Lamppa et al. 1988).

Da die FCP-Proteine keine prozessierbare Thylakoidtransferdomäne besitzen, ist die Erkennung der Integration nicht mit einer Aktivität der thylakoidalen Transitpeptidase gekoppelt (Halpin et al. 1989; Wallace et al. 1990; Kroth-Pancic 1995) Ein Nachweis der Integration durch Veränderung des Laufverhaltens im SDS-Proteingel war deswegen nicht möglich. Zur Überprüfung, ob Proteine in die Membran integriert worden sind, werden in der Literatur verschiedene chaotrope Salze und pH-Bedingungen zur Waschung der Membranen beschrieben. Wiese et al. (1999) verwendete eine NaOH-Lösung zur Betrachtung der Lokalisation von Hexokinase I in der äußeren Plastidenhülle, wohingegen ein $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{DTT}$ -Waschmedium zur Bestimmung der HCF136-Lokalisation im Thylakoidlumen genutzt wurde (Meurer et al. 1998).

Eine Untersuchung zur Effizienz von Waschmedien wurde von Breyton et al. (1994) für verschiedene Plastiden-Proteine durchgeführt. Die beste Ablösung unspezifischer Proteine von Membranen wurde mit Harnstoff (6,8 M) und KSCN (2M) erreicht. Diese beiden Medien erlaubten auch die Bestimmung der Membranintegration von YCF32 aus *Arabidopsis* (Mant und Robinson 1998).

Die Waschung von Thylakoiden aus *Coscinodiscus* mit $\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{DTT}$ (85 mM), NaCl (2 M), KSCN (2M) und Harnstoff (6,8M) nach einer Inkubation mit mFCP- oder iFCP-Protein zeigte nur bei den letzteren drei Medien eine brauchbare Entfernung von ungebundenen Proteinen (Kap. 3.5.1.). Dreimalige KSCN-Waschungen der Thylakoidmembranen zeigen nach der Inkubation zudem die Stabilität der Integration von FCP-Proteinen (Abb. 3-29). Für die weiteren Untersuchungen wurde deswegen KSCN (2M) als Waschmedium für den Importnachweis verwendet. Parallel dazu wurden zur Kontrolle des Imports Proteasebehandlungen durchgeführt.

Obwohl frühere Untersuchungen für den LHC-Import neben dem stromalen Extrakt den Bedarf von ATP andeuten (Cline 1988; Cline et al. 1992), gilt heute eine Abhängigkeit von GTP beim Import von LHC-Proteinen der höheren Pflanzen als gesichert (Hoffman und Franklin 1994). Eine Abhängigkeit von ATP für die Integration der FCP- oder LHC-Proteine in die Diatomeen-Thylakoide konnte nicht bestätigt werden. Statt dessen zeigte sich bei der Inkubation der FCP-Proteine mit Thylakoiden aus *Odontella* unter den Importbedingungen für den sec-, Δ pH- und SRP-Weg nur eine Steigerung des Imports nach Zugabe von GTP und stromalen Faktoren (Kap. 3.5.2.). Das gleiche Verhalten findet sich auch in Importexperimenten mit heterologen Thylakoidvesikeln aus der Kieselalge *Coscinodiscus granii*. Die Aktivierung betrug bei *Odontella* bzw. *Coscinodiscus* durchschnittlich das zwei- bis dreifache der beobachteten GTP-unabhängigen Integrationsrate. Eine Konzentrationsreihe in Gegenwart von stromalen Extrakt belegt die strenge Abhängigkeit des FCP-Imports von GTP (Abb. 3-32). Die maximale Integrationsrate für das FCP-Protein wurde nach Zugabe von ungefähr 10 mM GTP erreicht.

Die Abhängigkeit von GTP und stromalen Faktoren deutet für die FCP-Proteine auf einen vergleichbaren Transport über den SRP-Transportweg wie für höhere Pflanzen hin.

Die FCP-Integration in die Thylakoidmembran erfolgt auch ohne eine vorherige Bindung von Carotinoiden oder Chlorophyllen. Dies deutet, wie für höhere Pflanzen beschrieben (Kohorn und Auchincloss 1991), auf einen nicht-gekoppelten Prozeß von Import und funktionellem Zusammenbau des Lichtsammelproteins hin. Weiterhin ist der Import analog zu dem der höheren Pflanzen unabhängig von der Prozessierung der Transitsequenz (Yalovsky et al. 1992). Weder das Diatomeen-FCP mit Stroma-Adressierungssignal (iFCP) noch die Vollängenvariante (pFCP) zeigen ein unterschiedliches Integrationsverhalten zu der reifen Form (mFCP).

Obwohl die Waschungen der Thylakoide nicht importierte FCP-Proteine ablösen konnten, zeigte sich in den Importexperimenten eine durchschnittliche verbleibende FCP-Proteinmenge von rund 10 % auch ohne alle Zusätze. Eine Mitwirkung von Membranproteinen bei der FCP-Integration konnte durch eine vorherige Protease- oder EDTA-Behandlung der Thylakoide nicht beobachtet werden (Abb. 3-31, 3-32). Zudem scheint die Tendenz zur GTP-unabhängigen Integration nicht an die Art der Membran gebunden zu sein. Die Inkubation von iFCP-Protein mit Erbsen-Thylakoiden ohne weitere Zusätze (Abb. 3-33) zeigt ebenso eine Integration wie die Inkubation des Proteins mit ER-Membranen (Abb. 3-32B).

Dieses Verhalten der FCP-Proteine kann über eine spontane Integration analog dem CF₀-II-Protein erklärt werden (Michl et al. 1994). Proteine wie CF₀II und PSII-W werden ohne jegliche weitere Faktoren vermutlich ähnlich dem M13-Hüllprotein über eine aus zwei Membranhelices gebildete „Loop“-Struktur integriert (Kuhn et al. 1995; Robinson et al. 1996; Kim et al. 1998; Thompson et al. 1998). Studien mit verschiedenen Histidin- oder GFP-verknüpften LHC-Proteinen deuten ebenfalls eine Beteiligung einer „Loop“-Struktur (Membranhelix 1 und 2) für die Integration von LHCII-Proteinen an (Kosemund et al. 2000). Kim et al. konnte zudem eine spontane Integration eines Schwachlicht-induzierten Proteins (ELIP) aus *Arabidopsis* und dem psbS-Protein zeigen (Kim et al. 1998). Beide Proteinklassen werden als mögliche evolutionäre Vorläufer der LHC-Proteine diskutiert (Green und Kühlenbrandt 1995).

4.6.2.2. Heterologe Integration von FCP und LHC

Der GTP-abhängige Import von FCP in die Diatomeen-Thylakoide legt die Vermutung nahe, daß FCP- und LHC-Proteine die gleichen Transportwege zur Membranintegration benutzen. Eine kreuzweise Inkubation von LHC mit Diatomeen-Thylakoiden und von FCP mit Erbsen-Thylakoiden war daher naheliegend.

Importexperimente mit dem FCP-Protein und Erbsen-Thylakoiden bestätigen eine kreuzweise Integration. Bei Zugabe von 8 mM GTP und stromalem Extrakt wurde eine doppelte Integrationsrate von FCP im Vergleich zu Ansätzen ohne GTP beobachtet (Abb. 3-33A). Zudem zeigt es auch bei den Thylakoiden der höheren Pflanzen die Tendenz zur unspezifischen Integration. Eine mehrfache Waschung mit KSCN (2M) löste nicht alles spontan integriertes FCP-Protein aus der Membran (Abb. 3-33B).

Für die Untersuchung der LHC-Integration in Thylakoide aus *Coscinodiscus granii* wurden zwei verschiedene LHC-Proteine verwendet, das LHCa1-Protein aus dem Photosystem I von *Arabidopsis* und das LHC-Protein der Erbsen aus dem Photosystem II. Beide Proteine integrieren in Gegenwart von GTP und Stroma in die Diatomeen-Thylakoide (Abb. 3-34).

Die GTP-Menge für eine maximale Integration des Erbsen-LHCs in die Diatomeen-Thylakoide liegt nach einer Konzentrationsreihe in der gleichen Größenordnung wie beim FCP. Dies weist auf ungefähr vergleichbare GTP-Bedingungen für den LHC- wie für den FCP/cpSRP_{Diatomee}-Komplex hin.

Der Import der LHC-Proteine aus dem Photosystem I und II in die Diatomeen-Thylakoide demonstriert, daß das Diatomeen-SRP-System nicht zwischen den beiden LHC-Klassen unterscheidet. Dies ist von besonderem Interesse, da für Diatomeen bisher nicht zwischen verschiedenen FCPs für die Photosysteme unterschieden wird. Eine abweichende FCP-Form ist aber bei der Charakterisierung von sechs FCP-Genen aus der Kieselalge *Cyclotella cryptica* beobachtet worden. Die Aminosäuresequenz dieses FCP-Proteins zeigte Ähnlichkeiten zu denen aus höheren Pflanzen (Eppard und Rhiel 1998).

Die Integration der verschiedenen FCP- bzw. LHC-Proteine in die Thylakoide aus verschiedenen Organismen unter den vergleichbaren Bedingungen weist auf eine hohe Ähnlichkeit der Systeme hin, die für die Integration der Proteine in die Thylakoidmembran verantwortlich sind. Dies wiederum spricht für einen gemeinsamen Ursprung der Plastiden von Diatomeen und höherer Pflanzen.

4.6.2.3. Untersuchungen zum Bindebereich der cpSRP in FCP-Proteinen

Der Import von LHC- und FCP-Proteinen in die Thylakoide der anderen Algen- bzw. Pflanzengruppe ergibt die Frage, ob beide Lichtsammelkomplexe die gleichen Erkennungsstellen für die plastidären SRPs besitzen.

1992 konnte Auchincloss et al. durch eine Vielzahl von Deletionen zeigen, daß für die Integration der LHC die dritte Helix des Proteins notwendig ist. Gelverzögerungsexperimente durch DeLille et al. (2000) deuteten kürzlich auf eine 18 Aminosäure lange SRP-Erkennungsregion, an die das cpSRP43-Protein bindet (Tu et al. 2000). Die Erkennungsdomäne liegt nach Strukturvorhersagen im späteren stromalen Bereich zwischen der Membrandomäne II und III des LHC-Proteins (~ Pos. 155).

Wie die Abbildung 4-7 darstellt, ist die Erkennungsregion bei *Odontella* und in den meisten FCP-Proteinen der Chromophyten nicht zu finden. Nur das FCP-Protein von *Isochrysis galbana* (Chrysophyceae) und das FCP6 von *Cyclotella cryptica* (Diatomee) weisen Homologien zu den Spermatophyten- und Chlorophytensequenzen auf und zeigen das beschriebene Erkennungsmotiv.

Innerhalb der experimentell bestimmten Binderegion zeichnen sich jedoch sechs Aminosäuren (₋₁₅₅FDPLGL) ab, die homolog zu Sequenzen aus anderen Organismen sind (Abb. 4-7). Hierbei könnte es sich möglicherweise um das entscheidende Motiv für die Bindung des cpSRP43 handeln. Dieses kurze Aminosäuremotiv findet sich leicht abgewandelt bei allen FCPs vor der Membrandomäne I (~ Pos. 50).

	- Pos. 50 	- Pos. 140
osFCPa	... FDPLGM...	... MK-----DVTGEGEFPDGRNGALDFG---WDTFD-E...
scFCPa	... FDPLGL...	... MK-----DVTGDNEFVGDGRNGALDFG---WDTFD-E...
ccFCP2	... FDPLGL...	... MK-----DVTGEGEFPDGRNGALDFG---WDTFD-E...
ptFCPa	... WDPLGL...	... MK-----DITG-GEFVGDFRNNYLDFG---WDTFS-E...
mpFCPa	... WDPLGL...	... MK-----NV--EGSFPDFTLGGNPPFGA-SWDAMS-E...
lsFCP	... WDPLGL...	... MK-----NV--EGSFPDFTLGGNPPFAS-SWDAMS-A...
gsFCP	... FDPLGL...	... MQ-----QV--EGSTPGDMNRFGE--NS-TWASWD-E...
ccFCP6	... FDPLGF...	... AQIGWVDPADASYDQPGLLRDNYYPGDIG FDPLGL KPEDPE...
igFCP	... FDPAGF...	... IQKGWAKVNPETGKADSALREGYEPD LDPLGL APSDP...
crLHC	... WDPLSL...	... VSLGWATPTGTGFNN---LKDEYDLGNLY FDPLGL KPEDP...
leLHCb1	... WDTAGL...	... IAGG-----PLGEVVDPLYPGG- SFDPLGL -AEDPE...
		* * * * *
Erkennungsregion		VDPLYPGG-SFDPLGL-ADD

Abbildung 4 - 7 Vergleich der möglichen Bindedomäne für cpSRP bei FCP- und LHC-Proteinen

Aminosäurevergleich der Aminosäurebereiche vor der Membrandomäne I und III von FCP und LHC-Proteinen nach Eppard und Rhiel (1998). Die als "Erkennungsregion" bezeichnete Aminosäuresequenz stellt ein Teil der cpSRP-Anbindungstelle dar (DeLille et al. 2000). os: *Odontella sinensis*, sc: *Skeletonema costatum*, cc: *Cyclotella cryptica*, pt: *Phaeodactylum tricorutum* (Diatomeen); mp: *Macrocystis pyrifera*, ls: *Laminaria saccharina* (Phaeophyceae); gs: *Giraudyopsis stellifer*, ig: *Isochrysis galbana* (Chrysophyceae); cr: *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta); le: *Lycopericon esculatum* (Spermatophyta)

Es ist jedoch noch nicht geklärt, ob das cpSRP43 an diese Stelle bei den FCP-Proteinen bindet und somit den beobachteten Transport in die Diatomeen-Thylakoide ermöglicht.

4.6.2.4. Evolutionäre Bedeutung der FCP- und LHC-Integrationen in Diatomeen-Thylakoide

Wie bisher erläutert, zeigt der Transport von LHC- und FCP-Protein deutliche Ähnlichkeiten auf und weist für die Diatomeen auf die Existenz eines SRP-abhängigen Transportweges hin. Die Existenz eines konservierten Transportsystems und die ähnliche Struktur der LHC- und FCP-Proteine (Durnford et al. 1996) stehen im Kontext zur postulierten monophyletischen Entwicklung der Plastiden aus einem cyanobakteriellen Vorläuferorganismus (Delwiche und Palmer 1997).

Cyanobakterien besitzen Chlorophyll a und Phycobilisomen (Larkum et al. 1994). Trotz vollständiger Sequenzierung des Genoms von *Synechocystis spec. SPP6803* konnte bisher kein LHC-artiges Protein gefunden werden. Statt dessen wurde in Cyanobakterien und in *Arabidopsis* ein Starklicht-induziertes Protein (HLIP) mit einer einzelnen Membrandomäne gefunden (Dolganov et al. 1995; Jansson et al. 2000). Dolganov et al. (1994) sowie Green und Kühnbrandt (1995) schlugen vor, daß die eukaryotischen LHC möglicherweise durch Duplikation und Fusion aus den cyanobakteriellen HLIPs entstanden sein könnten. Als eine der Zwischenformen für die LHC-Entwicklung wurde das LHC-verwandte psbS-Protein angesehen, welches vier Membrandomänen besitzt (Wedel et al. 1992). Weitere Zwischenstufen zu der LHC-Entwicklung sind vielleicht kürzlich mit ELIP-Proteinen aus *Arabidopsis* gefunden worden, die zwei und drei membrandurchspannenden Helices besitzen (Heddad und Adamska 2000).

Über den Zeitpunkt der Entstehung der LHC- bzw. der FCP-Proteine kann derzeit nur spekuliert werden. Bisher konnte in Glaucocystophyten kein LHC-artiges Protein beschrieben werden. Ein sicherer Beleg für eine gemeinsame Entwicklung findet sich in der Ähnlichkeit der LHCI-Proteine aus den Rotalgenplastiden, den Vorläufern der Chromophyten-Plastiden, zu den Chlorophyll-a/b- und -a/c-Proteinen (Tan et al. 1997). Dies deutet auf eine

Entstehung der LHC/FCP-Proteine noch vor der Trennung der Rotalgen- von der Grünalgen/höheren Pflanzen-Linie (Durnford 1999).

Die Abspaltung der FCPs, aber auch der PCP-Proteine der Dinoflagellaten, erfolgte nach phylogenetischen Untersuchungen von Durnford et al. (1996) noch vor der Trennung der LHCI- und LHCII-Proteine bei den höheren Pflanzen.

Untersuchungen zum Transport von ELIPs deuten auf eine Änderung des Importverhaltens bei der Entstehung der LHC-Proteine hin. Kim et al. (1999) konnten demonstrieren, daß das ELIP2-Protein spontan in die Thylakoidmembran integriert. Dieses Protein besitzt wie die LHC oder FCP-Proteine drei Membranhelices, wobei dessen erste und dritte Helix hohe Homologien zueinander aufweisen. Ein Import über einen „Loop“-Mechanismus wird vermutet (Kim et al. 1999). Es gibt bisher nur wenige weitere Integrationsstudien zu möglichen Vorläufern der LHC/FCP-Proteine. Untersuchungen zu den HLIP-Proteinen fehlen zwar bisher, jedoch zeigen Untersuchungen an Proteinen (PSII-W, PSII-X) mit ebenfalls einer Membranhelix eine Integration ohne jegliche Beteiligung von Proteintranslokatoren (Thompsen et al. 1998). Nur für das psbS-Protein wurde eine spontane Integration vorgeschlagen (Kim et al. 1999). Die LHC bzw. FCP-Proteine verwenden jedoch den SRP-Transportweg. Dieser stellt in Bakterien ein Transportsystem für hydrophobe Proteine der inneren Membran dar (Ulbrandt et al. 1997). Eventuell wurde in der Entwicklung der LHC eine bessere oder eine regelbare Integration notwendig, so daß ein anderer Transportweg adaptiert wurde. Die Tendenz der FCP-Proteine zur spontanen Integration könnte jedoch ein Hinweis für den ehemaligen Transport der LHC/FCP-Vorläufer sein.

4.6.3. Heterologer Import von OEE23 aus Weizen in Diatomeen-Thylakoide

Lumenale Proteine der Thylakoide werden bei höheren Pflanzen über den Sec-Weg und den Sec-unabhängigen (Δ pH) Weg transloziert. Proteine beider Gruppen besitzen eine zusätzliche prozessierbare Thylakoidtransferdomäne in der Präsequenz, die Ähnlichkeiten zu Signalsequenzen aufweist (Henry et al. 1997). Der Sec-Weg entspricht dem bakteriellen Exportmechanismus für Proteine und zeigt Analogien zu Proteinen des kotranslationalen Transportapparates aus dem ER (High und Stirling 1993; Kalies und Hartmann 1998). Der Δ pH-Transportweg, früher als Neuentwicklung der Plastiden beschrieben, wird heute ebenfalls als ein prokaryotischer Weg angesehen. Die Verwandtschaft von Komponenten des Δ pH-Weges wie das hcf106-Protein zu bakteriellen TAT-Proteinen belegen einen cyanobakteriellen Ursprung (Sargent et al. 1998; Settles und Martienssen 1998). In Bakterien und auch in Plastiden dient der Δ pH-Weg dazu, hochgefaltene Proteine über die Membran zu transportieren (Hynds et al. 1998; Bogsch et al. 1998).

Zur Untersuchung eines Δ pH-abhängigen-Weges in den Diatomeen-Plastiden wurden erste Experimente mit dem OEE23-Protein aus Weizen und isolierten Thylakoiden aus *Coscinodiscus granii* durchgeführt. Bei Belichtung zeigte sich unabhängig von weiteren Zusätzen ein Import von OEE23 in die Diatomeen-Thylakoide. Das OEE23-Protein wird von der im Thylakoidlumen liegenden Signalpeptidase der Diatomeen erkannt und prozessiert (Wallace et al. 1990). Weiterhin zeigen Aufreinigungen der Importansätze mit Na_2CO_3 /DTT (85 mM) oder HSM-Medium, daß die Proteine nicht stabil in der Membran integriert vorliegen. Dies bestätigt die Lokalisation der Proteine im Lumen der Thylakoide (Wollman et al. 1999).

Im Gegensatz zu Untersuchungen bei den höheren Pflanzen führt die nachträgliche Proteasebehandlung der Thylakoide nach einem Importexperiment zu einer geringen Verkleinerung von importiertem OEE23. Ein teilweise unvollständiger Transport in die Thylakoide könnte hierfür der Grund sein. Dieser Effekt wird minimiert durch die

Zugabe von stromalen Faktoren während der Inkubation. Der Δ pH-Weg erlaubt im Gegensatz zum Sec-Mechanismus teilweise oder fehlerhaft gefaltene Proteine in die Thylakoide zu importieren (Hynds et al. 1998). Es ist jedoch unter Umständen möglich, daß die Diatomeen eine unterschiedliche Eignung zum Transport von ungefalteten Proteinen besitzen. Der vollständigere Transport von OEE23-Protein bei Zugabe von Stroma-Extrakt könnte auf eine mögliche Assistenz z.B. von Chaperonen für einen optimalen Import hindeuten.

Untersuchungen an Thylakoid-Proteinen höherer Pflanzen haben gezeigt, daß zur Unterscheidung des Sec- und Δ pH-Transportweges innerhalb der ähnlichen Thylakoidtransferdomänen Diskriminatoren eingebaut sind. Der Protonengradient-abhängige Import von OEE23 aus Weizen deutet darauf hin, daß die Signale für einen Δ pH-Weg auch in Diatomeen gelten. Eine Bestätigung erhält diese Vermutung durch ein kürzlich erhaltenes Fragment von OEE23. Das *Odontella*-OEE23 weist eine 23 Aminosäure lange thylakoidale Transferdomäne auf. Es besitzt das bei höheren Pflanzen gefundene typische Doppel-Arginin-Motiv am Anfang der hydrophoben Domäne (Chaddock et al. 1995) direkt gefolgt von dem beschriebenen Motiv AAL (Brink et al. 1998). Am Ende der hydrophoben Domäne findet sich ebenfalls die Aminosäure Lysin als Sec-Vermeidungsmotiv (Pos. – 7) (Henry et al. 1997). Die Schnittstelle ANA↓ entspricht typischen Signalsequenzen-Prozessierungssignalen (v. Heijne 1985). Daß in den Diatomeen auch der sec-Transportweg existiert, zeigt sich durch die Isolierung eines weiteren Genfragmentes für das OE33-Protein.

Diese beiden Fragmente aus *Odontella sinensis* belegen erstmals die Existenz einer dreigeteilten Präsequenz für lumenale Thylakoid-Proteine bei Kieselalgen.

Zusammengefaßt deuten der Transport von OEE23 aus Weizen, die Integration von FCP-Protein sowie die Thylakoidtransferdomäne vom Sec-abhängigen OEE33-Protein auf die Existenz eines Δ pH-, SRP- und Sec-Weges entsprechend den höheren Pflanzen hin. Die Existenz der konservierten Translokationssysteme unterstützt die derzeitige These der Entwicklung der Plastiden aus einem cyanobakteriellen Vorläufer-Organismus. Im Verlauf der Evolution scheinen sich aber Nuancen für den Transport von einigen Thylakoid-Proteinen entwickelt zu haben. Der für den Transport der kernkodierte Plastiden-Proteine größte Unterschied liegt jedoch bei den Diatomeen in der Durchquerung der vier plastidären Hüllmembranen. Hier zeichnet sich jedoch eine kombinatorische Verwendung ursprünglicher Transportsysteme während der sekundären Endocytobiose ab.

5. Zusammenfassung

Chloroplasten aus Diatomeen unterscheiden sich von denen höherer Pflanzen durch den Besitz von vier Hüllmembranen, wobei die äußerste Membran mit Ribosomen besetzt ist. N-terminale Präsequenzen von kernkodierten Plastiden-Proteinen aus Diatomeen weisen eine mindestens zweigeteilte Struktur auf. Die erste Region besitzt Merkmale von eukaryotischen Signalsequenzen und die zweite Domäne Eigenschaften von Transitsequenzen.

Die vorliegende Arbeit beschreibt die Charakterisierung dieser Transportsequenzen von kernkodierten Plastiden-Proteinen durch *in-vitro*- und *in-vivo*-Untersuchungen.

Die Signalsequenz der γ -Untereinheit der plastidären ATPase und der Phosphoribulokinase aus der Kieselalge *Odontella sinensis* ermöglicht einen kotranslationalen Transport der Proteine in ER-Vesikel. Die Phosphoribulokinase wird dabei an drei Stellen glykosyliert.

Die Transitsequenz-Domäne der γ -Untereinheit der plastidären ATPase ist alleine in der Lage Proteine in isolierte Chloroplasten höherer Pflanzen zu leiten. Die Diatomeen-Sequenz ersetzt funktionell die Transitsequenz der γ -Untereinheit der plastidären ATPase aus Spinat und kann korrekt prozessiert werden.

Durch genetische Transformation der Kieselalge *Phaeodactylum tricornutum* wurde der intrazelluläre Proteintransport in die Plastiden *in vivo* näher charakterisiert. Stufenweise verkürzte Präsequenzen verschiedener plastidärer Präproteine aus Kieselalgen wurden an das Markerprotein GFP fusioniert und fluoreszenzmikroskopisch analysiert. Untersuchungen zu der Transitsequenzdomäne der γ -Untereinheit der ATPase deuten auf eine wichtige Funktion des zweiten Viertels der Transitsequenz für den Import. Die Reduzierung der Transitdomäne der Phosphoribulokinase auf 12 Aminosäuren ermöglichte noch einen Transport in die Diatomeen-Plastiden.

Weiterhin wurden Sequenzen von Plastiden-Proteinen anderer Algen- bzw. Pflanzengruppen *in vivo* in Kieselalgen untersucht. So konnte gezeigt werden, daß die Präsequenz der Dinoflagellaten den Import in die Diatomeen-Plastiden ermöglicht. Dies und die *in-vitro*-Untersuchungen deuten auf universelle Transportsysteme bei den verschiedenen Algengruppen hin.

Das Sichten einer cDNA-Bank von *Odontella sinensis* führte zur Identifizierung von drei kleinen GTPasen (ARF1, RAB5, YPT1), die möglicherweise an einem vesikulären Transportvorgang innerhalb der komplexen Plastidenhüllmembran der Diatomeen beteiligt sein könnten.

Die Charakterisierung des Proteintransportes innerhalb der Diatomeen-Chloroplasten in einem etablierten thylakoidalen *in-vitro*-Importsystem für Kieselalgen zeigte, daß das FCP-Protein, welches das Diatomeen-Homolog der LHC-Proteine höherer Pflanzen darstellt, in Thylakoidmembranen unter ähnlichen Bedingungen wie bei höheren Pflanzen integriert (SRP-Weg). Der hohe Grad an Konservierung des LHC- und FCP-Transports zeigt sich in der Integration von LHC-Proteinen in die Diatomeen-Thylakoide genauso wie in der Insertion von FCP in Thylakoide aus höheren Pflanzen. Zusätzlich konnte eine Tendenz des FCP-Proteins zur spontanen Integration beobachtet werden. Diese Ergebnisse werden im Zusammenhang der gemeinsamen Entwicklung von LHC/FCP-Proteinen mit den spontan integrierenden Vorläuferproteinen, den ELIPs, diskutiert.

Erste Hinweise für eine Existenz eines Δ pH-abhängigen Thylakoidimport in den Kieselalgen konnten mit dem Weizen-Protein OEE23 experimentell gewonnen werden.

6. Anhang

6.1. Literaturverzeichnis

- Agashe V.R., Hartl F.U. *Semin. Cell. Dev. Biol.* (2000) 11 (1) :15 – 25
- Adachi J., Waddell P.J., Martin W., Hasegawa M. *J. of Mol. Evol.* (2000) 50 (4) : 348 - 358
- Apt K.E., Kroth-Pancic P.G., Grossman A.R. *Mol. Gen. Genet.* (1996) 252 : 572 - 579
- Apt K.E., Behrens P.W. *J. Phycol.* (1999) 35 : 215 - 226
- Apt K.E., Clendennen S.K., Powers D.A., Grossman A.R. *Mol. Gen. Genet.* (1995) 246 (4) : 455 - 464
- Apt K.E., Hoffmann N.E., Grossmann A.R. *J. of Biol. Chem.* (1993) Vol. 268 No. 22 : 16208 - 16215
- Apt K.E., Sukenik A., Grossman A.R. *Plant Physiol* (1995) 109 : 339
- Auchincloss A.H., Alexander A., Kohorn B.D. *J. of Biol. Chem.* (1992) Vol. 267 : 10439 - 10446
- Barik S. *Methods in Molecular Biology*, (1997) Vol. 67 - „PCR Cloning Protocolls“, Kapitel 17, Humana Press ©
- Barlowe C. *Biochimica et Biophysica Acta* (1998) 1404 : 67 - 76
- Bartlett S.G., Grossman A.R., Chua N.H. *“Methods in Chloroplast Mol. Biol.”* (1982), Edelman et al., Elsevier Biomedical Press
- Bauerle C., Keegstra K. *J. of Biol. Chem.* (1991) Vol. 266 No. 9 : 5876 - 5883
- Berkaloff C.J. *Microsc.* (1963) 2 : 213 - 227
- Bernstein H.D., Poritz M.A., Strub K., Hoben P.J., Brenner S., Walter P. *Nature* (1989) 340 : 482 - 486
- Bhaya D., Grossman A.R. *Mol. Gen. Genet.* (1991), 229 : 400-404
- Bhaya D., Grossman A.R. *Nucleic Acids Res.* 21 (19) : 4458 - 4466 (1993)
- Bidle K.D., Azam F. *Nature* (1999) Vol. 397 : 508 - 512
- Birnboim H.C., Doly J. *Nucleic Acid Res.* (1979) 7 : 1513 - 1523
- Blobel G., Sabatini D.D. *Biomembranes* (1971) Vol. 2 : 193 - 195
- Bodyl A. *Bot. Acta* (1997) 110 : 395 – 400
- Boevink P., Martin B., Oparka K., Santa Cruz S., Hawes C. *Planta* (1999) 208 : 392 - 400
- Bogsch E.G., Brink S., Robinson C. *EMBO J.* (1997) 16 (13) : 3851 - 3859
- Bogsch E.G., Sargent F., Stanley N.R., Berks B., Robinson C., Palmer T. *J. of Biol. Chem.* (1998) Vol. 273, No. 29 : 18003 - 18006
- Bokman S.H., Ward W.W. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (1981) 101 :1372 - 1380
- Bölter B., May T., Sol J. *FEBS Letters* (1998) 441 : 59 - 62
- Bölter B., Soll J., Schulz A., Hinnah S., Wagner R. *Proc. Natl. Akad. Sci. USA* (1998) Vol. 95 : 15831 - 15836
- Borowitzka M., Chiappino M.L., Volcani B.E. *J. Phycology* (1977), 13 : 162 – 174
- Borowitzka M.A., Volcani B.E. *J. of Phycology* (1978) 14 : 10 - 21
- Bouck G.B. *J. Cell Biol.* (1965) 26 : 523 - 537
- Boynton J.E., Gillham E.H., Harris J.P., Hosler A.M. *Science* (1988) 240 : 1534 - 1537
- Bradley P.J., Lahti C.J., Plümper E., Johnson P.J. *EMBO J.* (1997) Vol. 16, No. 12 : 3484 - 3493
- Brink S., Bogsch E.G., Edwards W.R., Hynds P.J., Robinson C. *FEBS Letters* (1998) 434 : 425 - 430
- Brownlee C. „Microelectrode Techniques“ (1987) The Plymouth Workshop Handbook, Verleger: The Compny of Biologists Limited, Cambridge
- Bucci C., Parton R.G., Mather I.H., Stunnenberg H., Simons K., Hoflack B., Zerial M. *Cell* (1992) 70 : 715 - 728

- Burda P., Aebi M. *Biochimica et Biophysica Acta* (1999) 1426 : 239 - 257.
- Caliebe A. Grimm R., Kaiser G., Lübeck J., Soll J. Heins L. *EMBO J.* (1997) 16 : 7342 - 7350
- Cavalier-Smith T. *J. Eukaryot. Microbiol.* (1999) 46 (4) : 347 - 366
- Cavalier-Smith T. *Trends in Plant Science* (2000) Vol. 5, No. 4 : 174 - 182
- Ceccarelli E.A., Krapp A.R., Serra E., Carrilo N. *Eur. J. of Biochem.* (1996) 238 : 192 - 197
- Chaal B.K., Mould R.M., Barbrook A.C., Gray J.C., Howe C.J. *J. of Biol. Chem.* (1998) Vol. 273, No. 2 : 689 - 692
- Chaddock A.M., Mant A., Karnachov I., Brink S., Hermann R.G., Klösgen R.B., Robinson C. *EMBO J.* (1995) 14 : 2715 - 2722
- Chan R.L., Keller M., Canaday J., Weil J.H., Imbault P. *EMBO J.* (1990) Vol. 9, No. 2 : 333 - 338
- Chavier P., Parton R.G., Hauri H.P., Simons K., Zerial M. *Cell* (1990) Vol. 62 : 317 - 329
- Chow K.S., Singh P.D., Roper J., Smith A.G. *J. of Biol. Chem.* (1997) Vol. 272, No. 44 : 27565 - 27571
- Chowrira G.M., Akella V., Lurquin P.F. *Molecular Biotechnology* (1995) Vol. 3 : 17 - 23
- Chua N.H., Schmidt G.W. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1978) Vol. 75, No. 12 : 6110 - 6114
- Cline K., Henry R., Li C., Yuan J. *EMBO J.* (1993) Vol. 12 No. 11 : 4105 - 4114
- Cline K. *Plant Physiol.* (1988) 86 : 1120 - 1126
- Cline K., Ettinger W.F., Theg S.M. *J. of Biol. Chem.* (1992) Vol. 267, No.4 : 2688 - 2696
- Clontech-Produktinformation „Living Colors User Manual“ (1997) No. PT2040-1
- Cohen Y., Yalovsky S., Nechushtai R (1995) *Biochimica et Biophysica Acta* 1241 : 1 - 30
- Cosson P., Letourneur F. *Current Opinion of Cell Biology* (1997) 9 : 484 - 487
- Crawford R.M. *J. Phycol.* (1973) 9 : 50 - 61
- Cutler S.R., Ehrhardt D.W., Griffiths J.S., Somerville C.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) Vol. 97, No. 7 : 3718 - 3723
- Dascher C., Balch W.E. *J. of Biol. Chem.* (1994) Vol. 269, No. 2 : 1437 - 1448
- De Boer A.D., Weisbeek P.J. *Biochimica et Biophysica Acta* (1991) 1071 : 221 - 253
- de Kruijff B. *FEBS Letters* (1994) 346 : 78 - 82
- DeLille J., Peterson E.C., Johnson T., Moore M., Kight A., Henry R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) Vol. 97, No 4 : 1926 - 1931
- Delwiche C.F., Palmer J.D. *Pl. Syst. Evol. Suppl.* (1997) 11 : 53 - 86
- den Blaauwen T., Driessen A.J.M. *Arch. Microbiol.* (1996) 165 : 1 - 8
- Descomps S. *C.R. Acad. Sci. Paris* (1963) 257 : 727 - 741
- Deshaias R.J., Sanders S.L., Feldheim D.A., Schekman R. *Nature* (1991) 349 : 806 - 808
- Dolganov N.A., Bhaya D., Grossmann A.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1995) 92 (2) : 636 - 640
- Douglas S.E. *Current Opinion in Genetics & Development* (1998) 8 : 655 - 661
- Douglas S.E., Murphy C.A., Spencer D.F., Gray M.W. *Nature* (1991) Vol. 350 : 148 - 151
- Drum R.W. *J. Cell Biol.* (1963), Vol. 18, 429 -
- Dunahay T.G., Jarvis E.E., Dais S.S., Roessler P.G. *Applied Biochemistry and Biotechnology* (1996) Vol. 57/58 : 223 - 231
- Dunahay T.G., Jarvis E.E., Roessler P.G. *J. Phycol.* (1995) 31 . 1004 - 1012
- Dunwell J.M. *J. of Experimental Botany* (2000) 51 (special issue) : 487 - 496.
- Dupree P., Sherrier D.J. *Biochimica et Biophysica Acta* (1998) 1404 : 259 - 270

- Durnford D.G., Aebersold R., Green B.R. *Mol. Gen. Genet.* (1996) 253 (3) : 377 - 386
- Durnford D.G., Deane J.A., Tan S., McFadden G.I., Green .B.R. *J. Mol. Evol.* (1999) 48 : 59 - 68
- Edwardson J.M. *Current Biology* (1998) 8 : R390 - R393
- Endo T., Kawakami M., Goto A., America T., Weisbeek P., Nakai M. *Eur. J. of Biochem.* (1994) (225) : 403 - 409
- Eppard M., Rhiel E. *Mol. Gen. Genet.* (1998) 260 : 335 - 345
- Evans E.A., Gilmore R., Blobel G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986) 83 : 581 - 585
- Fabry S., Naß N., Huber H., Palme K., Jaenicke L., Schmitt R. *Gene* (1992) 118 : 153 - 162
- Fabry S., Steigerwald R., Bernklau C., Dietmaier W., Schmitt R. *Mol. Gen. Genet.* (1995) 247 : 265 - 274
- Faulstich D., Auerbach S., Orci L., Ravazzola M., Wegehingel S., Lottspeich F., Stenbeck G., Harter C.,
Wieland F.T., Tschochner H. *J. of Cell Biol.* (1996) Vol. 135, No. 1 : 53 - 61
- Fiedler K., Simons K. *Cell* (1995) 81 : 309 - 312
- Fincher V., McCaffrey M., Cline K. *FEBS Letters* (1998) 423 : 66 - 70
- Fischer H., Robl I., Sumper M., Kröger N. *J. Phycol.* (1999) 35 : 113 - 120
- Flach J., Bossie M., Vogel J., Corbett A., Jinks T., Willins D.A., Silver P.A. *Mol. Cell. Biol.* (1994) 14 : 8399 - 8407
- Flachmann R., Michalowski C.B., Loffelhardt W., Bohnert H.J. *J. of Biol. Chem.* (1993) Vol. 268 : 7514 - 7519
- Flügge U.I., Hinz. G. *Eur. J. Biochem.* (1986) 160 : 563 - 570
- Franzen L., Rochaix J.D. von Heijne G. *FEBS Letters* (1990) 260, 165-168
- Franzen L.G., Rochaix j.D. v.Heijne G. *FEBS Letters* (1990) 260 : 165 - 168
- Fraunholz M.J., Moerschel E., Maier U.G. *Mol. Gen. Genet.* (1998) 260 : 207 - 211
- Füllekrug J., Nillson T. *Biochimica et Biophysica Acta* (1998) 1404 : 77 - 84
- Gavel Y., v.Heijne G. *FEBS Letters* (1990) Vol. 261, No. 2 : 455 - 458
- Gerdes H.H., Rudolf R. *Protoplasma* (1999) 209 : (1 - 2) : 1 - 8
- Gibbs J. *Cell Biol.* (1979) 35 : 253 - 266
- Gibbs S.P. *International Review of Cytology* (1981), Vol. 72, 49 - 99
- Gibbs S.P. *J. Cell Biol.* (1962) 14 : 433 - 444
- Gibbs S.P. *J. Cell Sci.* (1979), Vol. 35, 253 - 266
- Giddings T.H., Wasmann C., Stachelin L.A. *Plant Physiol.* (1983) 71 : 409 - 419
- Gilson P.R., McFadden G.I. *BioEssays* (1996) Vol. 19, No. 2 : 167 - 173
- Goldberg J. *Cell* (1999) 96 : 893 - 902
- Goldberg J. *Cell* (1999) 96 : 893 - 902
- Gomord V., Faye L. *Plant Physiol. Biochem.* (1996) 34 (2) : 165 - 181
- Gormord V., Wee E., Faye L. *Biochimie* (1999) 81 : 607 - 618
- Gray M.W. *Trends in Genetics* (1989) Vol. 5., No. 9 : 294 - 299
- Green B.R., Durnford D.G. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* (1996) 47 : 685 - 714
- Green B.R., Kühlbrandt W. *Photosynthesis Research* (1995) 44 : 139 - 148
- Grinna L.S., Robbins P.W. *J. of Biol. Chem.* (1987) 254 : 8814 - 8819
- Grzesiek S., Dencher N.A. *Biochimica et Biophysica Acta* (1988) 938 (3) : 411 - 424
- Gunther S., Herold J., Patzelt D. *Int J Legal Med* (1995) 108 (3) : 154 - 6
- Hageman J., Baecke C., Ebskamp M., Pilon R., Smeeckens S., Weisbeek P. *The Plant Cell* (1990) Vol. 2 : 479 - 494
- Halpin C., Elderfield PD, James HE, Zimmermann R, Dunbar B, Robinson C *EMBO J.* (1989) 8 : 3917 - 3921

- Hamman B.D., Hendershot L.M., Johnson A.E. *Cell* (1998) 92 : 747 - 758
- Hampton R.Y., Koning A., Wright R., Rine J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1996) 93 : 828 - 833
- Hardwick K.G., Lewis M.J., Semenza J., Dean N., Pelham H.R. *The EMBO J.* (1990) 9 (3) : 623 - 630
- Harter C., Wieland F. *Biochimica et Biophysica Acta* (1996) 1286 : 75 - 93
- Häuber M.M., Müller S.B., Speth V., Maier U.G. *Bot. Acta* (1994) 107 : 383 - 386
- Heddad M., Adanska I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (2000) Vol. 97, No. 7 : 3741 - 3746
- Heins L., Collinson I., Soll J. *Trends in Plant Science* (1998) Vol. 3, No. 2 : 56 - 61
- Heldt H.W., Sauer F. *Biochimica et Biophysica Acta* (1971) 234 (1) : 83 - 91
- Henry R., Carrigan M., McCaffrey M., Ma X., Cline K. *J. of Cell Biology* (1997) Vol. 136, No. 4 : 823 - 832
- Hepler P.K., Gunning B.E.S. *Protoplasma* (1998) 201 : 121 - 157 (Fig. 14)
- Herazdovsky B.F., Busch G.R., Emr S.D. *EMBO J.* (1994) 13 : 1297 - 1309
- Heukeshoven J., Dernick R. "Färbemethode für Elektrophorese-Gele" (1986), Information von Pharmacia
No.RE-034
- Hibberd D.J., Norris R.E., *J. Phycol.* (1984) 20 : 310 - 330
- High S., Stirling C.J. *Trends in Cell Biol.* (1993) 3 : 335 - 339
- Higo H., Kishimoto N., Saito A., Higo K.I. *Plant Science* (1993) 100 : 41 - 49
- Hiller M.H., Finger A., Schweiger M., Wolf D.H. *Science* (1996) Vol. 273 : 1725 - 1728
- Hinnah S.C., Hill K., Wagner R., Schlicher T., Soll J. *EMBO J.* (1997) Vol. 16, No. 24 : 7351 - 7360
- Hirsch S., Muckel E., Heemeyer F., von Heijne G., Soll J. *Science* (1994) 266 : 1989 - 1992
- Hobe S., Prytulla S., Kühlenbrandt W., Paulsen H. *EMBO J.* (1994) Vol. 13, No. 15 : 3423 - 3429
- Hoffmann N.E., Franklin A.E. *Plant Physiol.* (1994) 105 : 295 - 304
- Horiuchi H., Lippé R., McBride H.M., Rubino M., Woodman P., Stenmark H., Rybin V., Wilm M., Asham K.,
Mann M., Zerial M. *Cell* (1997) 90 : 1149 - 1159
- Hulford A., Hazell L., Mould R.M., Robinson C. *J. of Biol. Chem.* (1994) Vol. 269, No. 5 : 3251 - 3256
- Hurt E.C., Soltanifar N., Goldschmidt-Clermont M., Rochaix J.D., Schatz G. *EMBO J.* (1986) Vol. 5, No. 6 :
1343 - 1350
- Hynds P.J., Robinson D., Robinson C. *J. of Biol. Chem.* (1998) Vol. 273 No. 52 : 34868 - 34874
- Ivessa N.E., Kitzmüller C., de Virgilio M. *Protoplasma* (1999) 207 : 16 - 23.
- Ivey R.A., Subramanian C., Bruce B.D. *Plant Physiol.* (2000) Vol. 122 : 1289 - 1299
- Jakowitsch J., Neumann-Spallert, Ma Yan, Steiner J., Schenk H.E.A., Bohnert H.J., Löffelhardt W. *FEBS Letters*
(1996) 381 : 153 - 155
- James H.E., Robinson C. *Plant Mol. Biol.* (1991) 17 (1) : 179-182
- Jansson S., Andersson J., Kim S.J., Jackowski G. *Plant Mol. Biol.* (2000) 42 : 345 - 351
- Jeffrey S.W., Humphrey G.F. *Biochem. Physiol. Pflanz.* (1975) 167 : 191 - 204
- Johannes L., Doussau F., Clabecq A., Henry J.P., Darchen F., Poulain B. *J. Cell Sci.* (1996) 109 : 2875 - 2884
- Johnson A.E. „Proteintranslocation and Folding“, Kongreß, Freiburg 22.-24.7.99, pers. Mitteilung
- Joyard J., Block M., Douce R. *Eur. J. Biochem.* (1991) 199 : 489 - 509
- Kaiser C., Ferro-Novick S. *Current Opinion of Cell Biology* (1997) 10 : 477 - 482
- Kalies K.U., Hartmann E. *Eur. J. Biochem.* (1998) 254 : 1 - 5

- 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., Tabata S.
DNA Res. (1996) 3 : 109 - 136
- Keegstra K., Bruce B., Hurley M., Li H., Perry S (1995) *Physiologia Plantarum* 93 : 157 - 162
- Keegstra K., Froehlich J.E. *Current Opinion in Plant Biology* (1999), 2 : 471-476
- Keegstra K., Olsen L.J., Theg S.M. (1989) *Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol.* 40 : 471 - 501
- Keenan R.J., Freyman D.M., Walter P., Stroud R.M. *Cell* (1998) 94 : 181 - 191
- Kessler F., Blobel G., Patel H., Schnell D.J. *Science* (1994) 266 (5187) : 1035 - 1039
- Kilian O. Diplomarbeit (1999) Heinrich-Heine Universität
- Kim S.J., Jansson S., Hoffman N.E., Robinson C., Mant A. *J. of Biol. Chem.* (1999) Vol. 274, No. 8 : 4715 - 4721
- Kim S.J., Robinson C., Mant A. *FEBS Letters* (1998) 424 : 105 - 108
- Kim S.J., Robinson C., Mant A. *J. of Biol. Chem.* (1998) Vol. 273, No. 30 : 18979 - 18983
- Kim S.J., Robinson D., Robinson C. *FEBS Letters* (1996) 390 : 175 - 178
- Kindle K.L. *Plant Mol. Biol.* (1998) 38 : 365 - 377
- Kindle K.L., Lawrence S.D. *Plant Physiol.* (1998) 116 : 1179 - 1190
- Kirchhausen T., Bonifacino J.S., Riezman H. *Current Opinion of Cell Biology* (1997) 9 : 488 - 495
- Klee H., Horsch R., Rogers S. *Ann. Rev. Plant Physiol.* (1987) 38 : 467 - 486
- Knauer R., Lehle L. *Biochimica et Biophysica Acta* (1999) 1426 : 259 - 273
- Ko K., Cashmore A.R. *EMBO J.* (1989) 8 (11) : 3187 - 94
- Kogata N., Nishio K., Hirohashi T., Kikuchi S., Nakai M. *FEBS Letters* (1999) 329 : 329 - 333
- Köhler S., Delwiche C.F., Denny P.W., Tilney L.G., Webster P., Wilson R.J.M., Palmer J.d., Roos D.S.
Science (1997) 275 : 1485 - 1489
- Kohorn B.D., Auchincloss A.H. *J. of Biol. Chem.* (1991) Vol. 266, No. 18 12048 - 12052
- Korunic, Z. *J. of Stored Products Research* (1998) 34 (2-3) : 87 - 97
- Kosemund K., Geiger I., Paulsen H. *Eur. J. of Biochem.* (2000) 267 : 1138 - 1145
- Kouranov A., Chen X., Fuks B., Schnell D.J. *J. Cell Biol.* (1998) 143 : 991 - 1002
- Kozak M. *Microbial. Reviews* (1983), Vol. 47, 1 - 45
- Kröger N., Bergsdorf C., Sumper M. *Eur. J. Biochem.* (1996) 239 : 259 - 264
- Kroger N., Deutzmann R., Sumper M. *Science* (1999) 286 (5442) : 1129 - 1132
- Kröger N., Lehmann G., Rachel R., Sumper M. *Eur. J. Biochem.* (1997) 250 : 99 - 105
- Kroth P., Strotmann H. *Physiol. Plantarum* (1999) 107 : 136 - 141
- Kroth-Pancic P.G. *Plant Mol. Biol.* (1995) 27 : 825 - 828
- Kuehn M.J., Schekman R. *Current Opinion of Cell Biology* (1997) 9 : 477 - 483
- Kuhn A. *FEMS Microbiol. Rev.* (1995) 17 : 185 - 190
- Kuhn A., Kiefer D., Köhne C., Zhu H.Y., Tschantz W.R. Dalbey R.E. *Eur. J. Biochem.* (1994) 226 : 891 - 897
- Kühn M.J., Scheckman R. *Current Opinion in Cell Biology* (1997) 9 : 477 - 483
- Kunze I., Hensel G., Adler K., Bernard J., Neubohn B., Nilsson C., Stoltenburg R., Kohlwein S.D., Kunze G.
Biochimica et Biophysica Acta (1999) 1410 : 287 - 298
- Laemmli U.K. *Nature* (1970) 227 : 680 - 685

- Lamppa G.K. *J. of Biol. Chem.* (1988) 263 : 14996 - 14999
- Lamppa G.K., *J. of Biol. Chem.* (1988) Vol. 263 : 114996 - 14999
- Lang M. (1996) Diplomarbeit, Heinrich-Heine Universität
- Larkum A.W., Scaramuzzi C., Cox G.C., Hiller R.G. Turner A.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) 91 : 679 - 683
- Lawrence S.D., Kindle K.L. *J. of Biol. Chem.* (1997) Vol. 272, No. 33 : 20357 - 20363
- Lazar T., Götte M., Gallwitz D. *Trends in Biochemistry Science s* (1997) 22 : 468 - 472
- Leborgne-Castel N., Jelitto-Van-Dooren E.P., Crofts A.J., Denecke J. *Plant-Cell* (1999) 11 (3) 459 - 470.
- Lemieux C., Otis C., Turmel M. *Nature* (2000) 403 (6770) : 649 - 652
- Lennarz W.J. *Biochemistry* (1987) 26 : 7205
- Lewis M.J., Sweet D.J., Pelham H.R. *Cell* (1990) 61 (7) :1359 - 1363
- Li X., Henry R., Yuan J., Cline K., Hoffman N.E. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* (1995) Vol. 92 : 3789 - 3793
- Liaud M.F., Brandt U., Scherzinger M., Cerff R. *J. Mol. Evol.* (1997) 44 (Suppl 1) : 28 - 37
- Liaud M.F., Lichtle C., AptK., Martin W., Cerff R. *Mol. Biol. Evol.* (2000) 17 (2) 213 - 223
- Lipari F., Herscovics A. *J. of Biol. Chem.* (1996) 271 : 27615 - 27620
- Lübeck J., Heins L., Soll J. *Physiologia Plantarum* (1997) 100 : 53 - 64
- Madueno F., Bradshaw S.A., Gray J.C. *J. of Biol. Chem.* (1994) Vol. 269 No 26 : 17458 - 17463
- Madueno F., Napier J.A., Cejudo F.J., Gray J.C. *Plant Mol. Biol.* (1992) Vol. 20 : 289 - 299
- Maley, F et al. 1989 *Anal. Biochem.* 180, p. 195 - 204
- Mant A., Robinson C. *FEBS Letters* (1998) 423 : 183 - 188
- Margulis L. und Schwartz K.V. Spektrum-Verlag (1989) „Die fünf Reiche der Organismen“
- Martin W., Brinkmann H., Savonna C., Cerff R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) 8692 - 8696
- Martin W., Stoebbe B., Goremykin V., Hansmann S., Hasegawa M., Kowallik K.V. *Nature* (1998) Vol. 393 : 162 – 165
- Martinez O., Goud B. *Biochimica et Biophysica Acta* (1998) 1404 : 101 - 112
- Mason J.G. and Whitfeld P.R *Plant Mol. Biol.* (1990) 14 (6) : 1007 - 1018
- Matrinson T.A., Ikeuchi M., Plumley F.G. *Biochimica et Biophysica Acta* (1998) 1409 (2) : 72 - 86
- McFadden G.I. *J. Eukaryot. Mikrobiol.* (1999) Vol. 46, No. 4 : 339 - 346
- McFadden G.I., Gilson P.R., Hofmann C.J.B., Adcock G.J., Maier U.G. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1994) Vol. 91 : 3690 - 3694
- Meadows J.W., Robinson C. (1991) *Plant Mol. Biol.* 17 : 1241 - 1243
- Mereschkovsky C. *Biol. Zbl.* (1905) 25 : 593 - 604
- Meurer J., Plücken H., Kowallik K.V., Westhoff P. *EMBO J.* (1998) Vol. 17, No. 18 : 5266 - 5297
- Michalak M., Corbett E.F., Mesaeli N., Nakamura K., Opas M *Biochem J* (1999) 344 (2) :281 - 92
- Michl D., Karnauchoff I., Berghöfer J., Herrmann R.G., Klösgen R.B. *The Plant J.* (1999) 17 (1) 31 - 40
- Michl D., Robinson C., Shackleton J.B., Herrmann R.G., Klösgen R.B. *EMBO J.* (1994) Vol. 13, No. 6 : 1310 - 1317
- Mohr E. *Progress In Neurobiology* (1999) 57 (5) : 507 - 525
- Moore I., Schell J., Palme K. *Trends in Biochemistry Science s (TIBS)* (1995) 20 : 10 - 12
- Morin X.K. Soll J. *Planta* (1997) 201 : 119 - 127
- Mothes W., Prehn S., Rapoport T.A. *EMBO J.* (1994) 13 : 3973 - 3982

- Mould R.M., Robinson C. *J. of Biol. Chem.* (1991) Vol. 266, No. 19 : 12189- 12193
- Muckel E., Soll J. *J. of Biol. Chem.* (1996) Vol. 271, No. 39 : 23846 - 23852
- Muller M., Martin W. *BioEssays* (1999) 21 : 377 - 381
- Neupert W. *Annu. Rev. Biochem.* (1997) 36 : 863 - 917
- Nickel W., Brügger B. *Protoplasma* (1999) 207 : 115 - 124
- Norris B.J., Miller D.J *Plant Mol. Biol.* (1994), Vol. 24, 673 - 677
- Novick P., Zerial M. *Current Opinium in Cell Biology* (1997) 9 : 496 - 504
- Nuoffer C, Balch W.E. *Annu. Rev. Biochem.* 1994, 63 : 949 - 990
- Oblong J.E., Lamppa G.K. *EMBO J.* (1992) 11 : 4401 - 4409
- Olden K., Parent J.B., White S.L. *Biochimica et Biophysica Acta* (1982) 650 : 209 - 232
- Olsen L.J., Theg S.M., Seman B.R., Keegstra K. *J. of Biol. Chem.* (1989) 264 : 6724 - 6729
- Ormö M., Cubitt A.B., Kallio K., Gross L.A., Tsien R.Y., Remington S.J. *Science* (1996) 273 . 1392 - 1395
- Ostrem J.A., Ramage R.T., Bohnert H.J., Wasmann C.C. *J. of Biol. Chem.* (1989) Vol. 264, No. 7 : 3662 - 3665
- Pain D, Blobel G (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 3288 - 3292
- Pain D., Kanwar Y.S., Blobel G. *Nature* (1988) Vol. 331 : 232 - 236
- Palade G. *Science* (1975) Vol. 189 : 347 - 357
- Palme K., Diefenthal T., Vingron M., Sander C., Schell J. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) Vol. 89 : 787 - 791
- Pancic P.G., Strotmann *HFEBs Letters* . (1993), Vol. 320 No.1 : 61 - 66
- Pierce J.C. *Methods in Molecular Biology* (1997) Vol. 67 - „PCR Cloning Protocolls“, Kapitel 15, Humana Press ©
- Pilon M., Rietveld A.G., Weisbeek P.J., de Kruijff B. *J. of Biol. Chem.* (1992) Vol. 267, No. 28 : 19907 - 19913
- Pilon M., Wienk H., Sips W., Deswaaf M., Talboom I., van't Hof R., Dekortekool G., Demel R., Weisbeek P.J., de Kruijff B. *J. of Biol. Chem.* (1995) 270 : 3882 - 3893
- Pinnaduwege P., Bruce B.D. *J. of Biol. Chem.* (1996) Vol. 271, No. 51 : 32907 - 32915
- Pont-Kingdon G. *Methods in Molecular Biology* (1997) Vol. 67 - „PCR Cloning Protocolls“, Kapitel 16, Humana Press ©
- Ragnini-Wilson A. *Protoplasma* (1999) 209 (1 - 2) : 19 - 27
- Rapoport T.A., Matlack K.E.S., Plath K., Misselwitz B., Staeck O. *Biol. Chem.* (1999) Vol. 380 : 1143 - 1150
- Reith M. *Annu. Rev. of Plant Physiol. Plant Mol.* (1995) 46 : 549 - 575
- Reith M., Munholland J. *Plant Mol. Biol. Reporter* (1995) 13 : 338 - 340
- Rensink W.A., Schnell D.J., Weisbeek P.J. *J. of Biol. Chem.* (2000) Vol. 275, No. 14 : 10265 - 10271
- Rensink W.E., Pilon M., Weisbeek P. *Plant Physiol.* (1998) 118 : 691-699
- Reumann S., Keegstra K. *Trends in Plant Science* (1999) Vol. 4, No. 8 : 302 - 307
- Richter S., Lamppa G.K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) Vol. 95 : 7463 - 7468
- Richter S., Lamppa G.K. *J. of Cell Biol.* (1999) 147 (1) : 33 - 43
- Robinson C., Cai D., Hulford A., Brock I.W., Michl D., Hazell L., Schmidt I., Herrmann R.G., Klösgen R.B. *EMBO J.* (1994) Vol. 13, No. 2 : 279 - 285
- Robinson C., Hynds P.J., Robinson D., Mant A. *Plant Mol. Biol.* (1998) 38 : 209 - 221
- Robinson C., Woolhead C., Edwards W. *J. of Experimental Botany* (2000) Vol. 51 : 369 - 374
- Robinson D., Karnachov I., Herrmann R.G., Klösgen R.B., Robinson C. *Plant J.* (1996) 10 (1) 149 - 155
- Römisch K. *J. of Cell Science* (1999) 112 (23) : 4185 - 4191

- Römisch K.J., Ali B.R.S. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) Vol. 94: 6730 - 6734
- Roth M.G., Sternweis P.C. *Current Opinion in Cell Biology* (1997) 9 : 519 - 526
- Rother C., Jansen T., Tyagi A., Tittgen J., Herrmann R.G. *Curr. Genet.* (1986) 11 (3) : 171 - 176
- Rothman J.E. *Nature* (1994) 372 : 55 - 63
- Rüfenacht A., Boschetti A. *Biochemical and Biophysical Research Communications* (1997) 237 : 532 - 536
- Sargent F., Bogsch E.G., Stanley N.R., Wexler M., Robinson C., Berks B.C., Palmer T. *EMBO J.* (1998) Vol. 17, No. 13 : 3640 - 3650
- Schimper A.F.W. *Bot. Zeitung* (1883) 41 : 105 - 114
- Schleiff E., Heard T.S., Weiner H. *FEBS Letters* (1999) 461: 9 - 12
- Schlicher T., Soll J. *FEBS Letters* (1996) 379 : 302 - 304
- Schneider G., Sjöling S., Wallin E., Wrede P., Glaser E., v. Heijne G. *Proteins* (1998) 30 : 49 - 60
- Schnell D.J. Kessler F., Blobel G. *Science* (1994) 266 : 1007 - 1012
- Schnell D.J., Blobel G., Keegstra K., Kessler F., Ko K., Soll J. *Trends in Cell Biology* (1997) Vol. 7 : 303 - 304
- Schnorrer F., Bohmann K., Nüsslein-Volhard C. *Nat. Cell Biol.* (2000) 2 (4) : 185 - 190
- Schuenemann D., Amin P., Hartmann E., Hoffman N.E. *J. of Biol. Chem.* (1999) Vol. 274, No. 17 : 12177 - 12182
- Schuenemann D., Gupta S., Persello-Cartieux F., Klimyuk V.L., Jones J.D.G., Nussaume L., Hoffman N.E. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998) Vol. 95 : 10312 - 10316
- Schwartzbach S.D., Osafune T., Löffelhardt W. *Plant Mol. Biol.* (1998) 38 : 247 - 263
- Scott S.V., Theg S.M. *J. of Cell Biol.* (1996) Vol. 132, No. 1&2 : 63 - 75
- Segui Real B., Kispal G., Lill R., Neupert W. *EMBO J.* (1993) 12 (5) : 2211- 2218
- Settles A.M., Martienssen R. *Trends in Cell Biology* (1998) 8 : 494 - 501
- Sharples F.P., Wrench P.M., Ou K., Hiller R.G. *Biochimica et Biophysica Acta* (1996) 1276 : 117 - 123
- Shashidhara L.S., Lim S.H., Shackleton J.B., Robinson C., Smith A.G. *J. of Biol. Chem.* (1992) Vol. 267, No. 18 : 12885 - 12891
- Shirataki H., Kaibuchi K., Sakoda T., Kishida S., Yamaguchi K., Wada K., Miiyazaki M., Takai Y. *Mol. Cell. Biol.* (1993) 13 : 2061 - 2068
- Simpson A.G.B. *Arch. Protistenkd.* (1997) 148 : 318 - 328
- Sinder-Krüger B., Stenmark H., Zerial, M. (1995) *J. Cell Sci.* 108 : 3509 - 3521
- Sjöling S., Glaser E. *Trends in Plant Science* (1998) Vol. 3, No. 4 : 136 - 140
- Small I., Wintz H., Akashi K., Mireau H. *Plant Mol. Biol.* (1998) 38 : 265 - 277
- Smeekens S, Bauerle C., Hageman J., Keegstra K., Weisbeek P. *Cell* (1986) 46 (3) 365 - 375
- Smetacek V. *Protist* (1999) 50 (1) : 25 - 32
- Smith C.J., Grigorieff N., Pearse B.M. *EMBO J.* (1998) 17 (17) : 4943 - 53
- Smith G.J., Gao Y. and Alberte R.S. *Plant Physiol.* (1997) 114 : 1136
- Smith-Johannnsen H., Fromson D., Gibbs S.P. *J. Cell Sci.* (1980) 43 : 119 - 136
- Smith-Johannnsen H., Gibbs S. *J. of Cell Biol.* (1972) 52 : 598 - 614
- Sohrt K., Soll J. *J. Cell Biol.* (2000) 148 (6) : 1213-1222
- Sprang S.R. *Annu Rev Biochem.* (1997) 66 : 639 - 678
- Staudacher E., Altmann F., Wilson I.B:H., März L. *Biochimica et Biophysica Acta* (1999) 1473 : 216 - 236
- Stephans C. *Current Biology* (1998) 8 : R578 - R581

- Stoebe B., Kowallik K.V. *Trends in Genetics* (1999) Vol. 15, No. 9 : 344 - 347
- Stroud R.M., Walter P. *Current Opinion in Structural Biology* (1999) 9 : 754 - 759
- Stultz C.M., Nambudripad R., Lathrop R.H., White J.V. „Protein Structural Biology in Bio-Medical Research“
Vol. 22B (1997), JAI Press, Greenwich
- Stultz C.M., White J.V., Smith T.F. *Protein Science* (1993) 2 : 305 - 314
- Sulli C., Fang Z.W., Muchhal U., Schwartzbach S.D. *J. of Biol. Chem.* (1999) Vol. 274, No. 1 : 457 - 463
- Sulli C., Schwartzbach S. *J. of Biol. Chem.* (1995), Vol. 270, No. 22 : 1308 - 13090
- Sullivan K.F., Kay S.A. (Editors) *Methods in Cell Biology*, (1999) Vol. 58, Academic Press.
- Tan S., Ducret A., Aebersold R., Gantt E. *Photosynthesis Research* (1997) 53 : 129 - 140
- Teasdale R.D., Jackson M.R. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* (1996) 12 : 27 - 54
- Tessier L.H., Paulus F., Keller M., Vial C., Imbault P. *Mol. Biol.* (1995) 245 (1) : 22 - 33
- Thompson S.J., Kim S.J., Robinson C. *J. of Biol. Chem.* (1998) Vol. 273, No. 30 : 18979 - 18983
- Thorgeirsson T.E., Yu Y.G., Shin Y.K. *Biochemistry* (1995) 34 : 5518 - 5522
- Tu C.J., Peterson E.C., Henry R., Hoffman N.E. *J. of Biol. Chem.* (2000) Vol. 275, No. 18 : 13187 - 13190
- Tu C.J., Schuenemann D., Hoffman N.E. *J. of Biol. Chem.* (1999) 274 : 27219 - 27224
- Ulbrandt N.D., Newitt J.A., Bernstein H.D. *Cell* (1997) 88 (2) : 187 - 96
- v. Heijne G. *Eur. J. Biochem.* (1983) 133 : 17 - 21
- v. Heijne G. *J. Mol. Biol.* (1984) 173 : 243 - 251
- v. Heijne G. *J. Mol. Biol.* (1985) 184 : 99 - 105
- v. Heijne G., Hirai T., Klösigen R.B., Steppuhn J., Bruce B., Keegstra K., Herrmann R.
Plant Molecular Biology Reporter (1991) Vol. 9 (2) 104 - 126
- v. Heijne G., Steppuhn J., Herrmann R.G. (1989) *Eur. J. Biochem.* 180 : 535 - 45
- Vacula R., Steiner J.M., Krajcovic, Ebringer L., Löffelhardt W. *DNA Research* (1999) 6 : 45 - 49
- Valent Q.A., Scotti P.A., High S., de Gier J.W., von Heijne G., Lentzen G., Wintermeyer W., Oudega B., Luirink J.
EMBO J. (1998) 17 : 2504 - 2512
- Van de Peer Y., Rensing SA, Maier UG, De Wachter R *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1996) 93 (15) : 7732 - 7736
- Van de Peer Y., De Wachter R. *J. of Mol. Evol.* (1997) 45 (6) : 619 - 630
- Van der Vere PS, Bennett TM, Oblong JE, Lamppa GK (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 7177 - 7181
- van't Hof R., de Kruijff B. *J. of Biol. Chem.* (1995) Vol. 270, No. 38 : 22368 - 22373
- van't Hof R., Demel R.A., Keegstra K., de Kruijff B. *FEBS Letters* (1991) Vol. 291, No. 2 : 350 - 354
- Vierstra R.D. *Ann. Rev. Plant Mol. Biol.* (1993) 44 : 385 - 410
- Vogel H., Fischer S., Valentin K. *Plant Mol. Biol.* (1996) 32 : 685 - 692
- Voos W., Martin H., Krimmer T., Pfanner N. *Biochimica et Biophysica Acta* (1999) 1422 : 235 - 254
- Vrieling E.G., Gieskes W.W.C. *J. Phycol.* (1999) 35 : 548 - 559
- Waegemann K., Soll J. *J. of Biol. Chem.* (1996) Vol. 271, No. 11 : 6545 - 6554
- Walker M.B., Roy L.M., Coleman E., Völker R., Barkan A. *J. of Cell Biol.* (1999) Vol. 147, No. 2 : 267 - 275
- Wallace T.P., Robinson C., Howe C.J. *FEBS Letters* (1990) Vol. 272, No. 1-2 : 141 - 144
- Waller R.F., Reed M.B., Cowman A.F., McFadden G.I. *The EMBO J.* (2000) Vol. 19, No. 8 : 1794 - 1802
- Walter P., Blobel G. *Nature* (1982) 299 : 691 - 698
- Wang J., Maziarz K., Ratnam M. *J. Mol. Biol.* (1999) 286 (5) : 1303 - 1310

- Wang L., Dobberstein B. *FEBS Letters* (1999) 457 (3) : 316 - 322
- Wedel N., Klein R., Ljungberg U., Andersson B., Herrmann R.G. *FEBS Letters* (1992) 314 (1) : 61-66
- Wedel N., Soll J., Paap B.K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) Vol. 94 : 10479 - 10484
- Wexler M., Bogsch E., Klösgen R.B., Palmer T., Robinson C., Berks B.C. *FEBS Letters* (1998) 431: 339 - 342
- White J.V., Stultz C.M., Smith T.F. *Mathematical BioScience s* (1994) 119 : 35 - 75
- Wiese A., Gröner U., Sonnewald U., Deppner H., Lerchl J., Hebbecker U., Flügge U.I., Weber A
FEBS Letters (1999) 461 : 13 - 18
- Wittpoth C., Doktorarbeit (1996)
- Wittpoth C., Kroth P.G., Weyrauch K., Kowallik K.V., Strotmann H. *Planta* (1998) 206 : 79 – 85
- Wollman F.A., Minai L., Nechustai R. *Biochimica et Biophysica Acta* (1999) 1411 : 21 - 85
- Yalovsky S., Neéman E., Schuster G, Paulsen H, Harel E, Nechushtai R. *J. of Biol. Chem.* (1992) Vol. 267 :
20689 - 20693
- Yalovsky S., Paulsen H., Michaeli D., Chitnis P.R., Nechustai R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) Vol. 89 :
5616 - 5619
- Yang F, Moos L.G., Phillips G.N. *Nature Biotechnol.* (1996) 14 : 1246- 1251
- Yu L.M., Merchant S., Theg S., Selman B.R. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1988) 85 : 1369 - 1373
- Yuan J., Henry R., Cline K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1993) Vol. 90 : 8552 - 8556
- Zaslavskaja L.A., Lippmeier C., Kroth P.G., Grossman A., Apt K. *J. of Phycol.* (2000) 36 : 379 - 386
- Zhang Z., Green B.R., Calvalier-Smith T. *Nature* (1999) Vol. 400 : 155 - 159
- Zuther E., Johnson J.J., Haselkorn R., McLeod R., Gornicki P. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1999) Vol. 96, No. 23 :
13387 - 13392

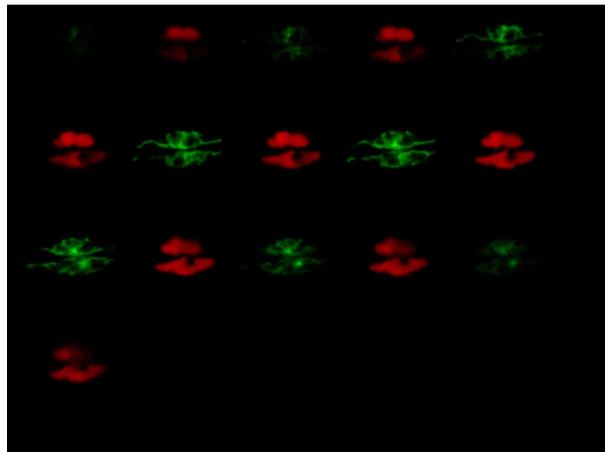
6.2. Abkürzungsverzeichnis

³² P	Phosphor-32-Isotop im Phosphat
³⁵ S	Schwefel-35-Isotop im Methionin
ADP	Adenosin-5'-diphosphat
AMP	Adenosin-5'-monophosphat
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
ATPase	Adenosin-5'-triphosphatase
Bp	Basenpaar
BPB	Bromphenolblau
BSA	Rinderserumalbumin
CER	chloroplastidäres endoplasmatisches Reticulum (Chloroplasten-ER)
CF ₀	Membranteil der Chloroplasten-ATPase
CF ₁	Katalytischer Teil der Chloroplasten-ATPase
Chl.	Chlorophyll
CLSM	Konfokale Laser-Scanning-Mikroskopie
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
DTT	Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatisches Reticulum
Fa.	Firma
FCP	Fucoxanthin-chlorophyll-a,c-bindendes Protein
Fig.	Figur
g	Erdbeschleunigungskonstante g
g	Gramm
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-Piperazin-N-Ethansulfonsäure
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
λ	Wellenlänge (nm)
l	Liter
LHC	Lichtsammelkomplex
M	Molar
mA	Milliampere
mg	Milligramm
min	Minute

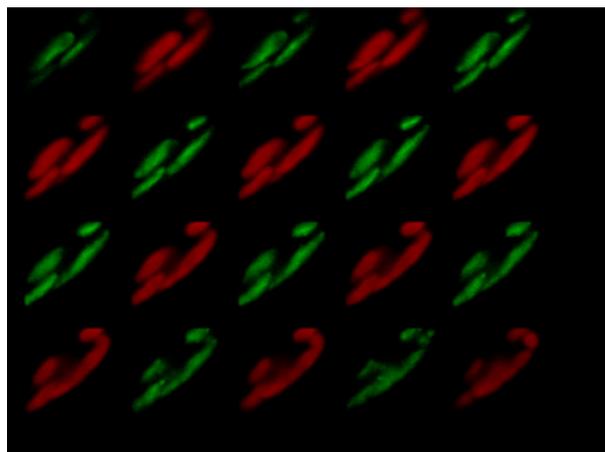
ml	Milliliter
mM	Millimolar
mmol	Millimol
MOPS	4-Morpholinpropansulfonsäure
mRNA	Boten-RNA
nm	Nanometer
nmol	Nanomol
Nt	Nukleotid
OEE	Wasserspaltungskomplex des PSII
PAA	Polyacrylamid
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PRK	Phosphoribulokinase
PSI	Photosystem I
Psi	pounds per square inch
PSII	Photosystem II
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehung pro Minute
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SRP	Signalsequenz-Erkennungskomplex (signal recognition particle)
Std	Stunde
T	Temperatur
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(Hydroxymethyl)aminomethan
U	Enzymeinheit (Unit)
UE	Untereinheit
üN	über Nacht
V	Volt
VE	Volumeneinheit
v/v	Volumenanteil pro Volumen
w/v	Gewichtsanteil pro Volumen
°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µmol	Mikromol
9AA	9-Aminoacridin

6.3. Weitere Abbildungen

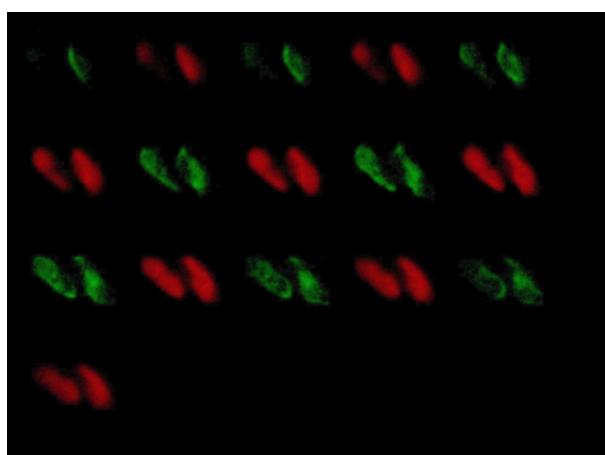
Nachfolgende CLSM-Aufnahmen stellen Einzelaufnahmen durch verschiedene Schnittebenen von transformierten Phaeodactylum-Zellen dar. Immer paarweise gehören eine Fluoreszenzaufnahme für GFP (grün) und für Chlorophyll (rot) zusammen. Der Beginn der Serien ist oben links.:



t-atpC1GFP



t-atpC3GFP-DDEL



t-STpcpGFP

Ich versichere, daß ich diese Arbeit selbst verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Düsseldorf, den 10.6.2000

Untersuchungen zum Transport kernkodierter Plastiden-Proteine in Kieselalgen

1. Einleitung	
1.1. Entwicklung und Charakterisierung der verschiedenen Algengruppen	2
1.2. Der sekretorische Proteintransportweg	4
1.2.1. Proteintransport in die Plastiden von höheren Pflanzen	6
1.2.2. Proteintransport in die Plastiden von Algen	8
1.2.3. Proteintransport in die Thylakoide von höheren Pflanzen	10
1.3. Die Kieselalgen	11
1.4. Zielsetzung	13
2. Material und Methoden	
2.1. Allgemeines	14
2.1.1. Chemikalien	14
2.1.2. Gene und Vektoren	14
2.1.3. Kultivierung des biologischen Materials	14
2.1.3.1. <i>Escherichia coli</i>	14
2.1.3.2. <i>Odontella sinensis</i> , <i>Coscinodiscus granii</i> und <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	15
2.2. Klonierung von DNA	15
2.2.1. Endonucleolytische Restriktion, Klenow-fill-in, Phosphorylierung, alkalische Dephosphorylierung und Ligation	15
2.2.2. Transformation von <i>E.coli</i>	16
2.2.2.1. Herstellung transformationskompetenter Zellen	16
2.2.2.2. Transformation	16
2.2.3. DNA-Aufreinigung	16
2.2.3.1. Plasmid-DNA-Isolation	16
2.2.3.2. Untersuchung von DNA in Agarosegelen	17
2.2.3.3. Elution von DNA aus Agarosegelen	17
2.2.4. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	17
2.2.4.1. Standard- und Mutagenese-PCR	17
2.2.4.2. Kreis-PCR	18
2.2.4.3. Fusions-PCR und Megaprimer-PCR	18
2.2.4.4. Verwendete Primer	20
2.2.5. Koloniehybridisierung	20
2.2.6. Gensequenzierung	20
2.3. Fraktionierung von pflanzlichen Zellen	21
2.3.1. Isolation von Chloroplasten	21
2.3.1.1. Plastidenisolation aus <i>Odontella sinensis</i> und <i>Coscinodiscus granii</i>	21
2.3.1.2. Chloroplasten aus höheren Pflanzen	22
2.3.1.3. Chlorophyllbestimmung	22
2.3.1.4. Sauerstoffbestimmung mittels Clark-Elektrode	23
2.3.1.5. Bestimmung der Osmolalität einer Lösung	23
2.3.2. Isolation von Thylakoiden	23
2.3.2.1. Thylakoidisolation aus Plastiden von Kieselalgen	23
2.3.2.2. Thylakoidisolation aus Erbsenplastiden	24
2.3.2.3. Fluoreszenzmessung mit 9-Aminoacridin (9AA)	24
2.3.3. Fraktionierung von <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	25
2.4. Proteintransport	25
2.4.1. <i>In-vitro</i> -Proteinsynthese	25
2.4.1.1. <i>In-vitro</i> -Transkription	25
2.4.1.2. Untersuchung von RNA in Formaldehyd-Agarosegelen	25
2.4.1.3. <i>In-vitro</i> -Translation	26
2.4.2. Kotranslationaler Proteinimport	27
2.4.2.1. Transport in ER-Vesikel	27
2.4.2.2. Deglykosylierung von Glykoproteinen	27
2.4.3. Integration von FCP in ER-Vesikel	27
2.4.4. Posttranslatonaler Import in Plastiden von höheren Pflanzen	27
2.4.5. Thylakoidimport	27

2.4.5.1. Import in Thylakoide von Kieselalgen	27
2.4.5.2. Import in Thylakoide von höheren Pflanzen	28
2.4.6. Auftrennung und Nachweis von Proteinen	28
2.4.6.1. Polyacrylamidgelelektrophorese	28
2.4.6.2. Proteinfärbung, Autoradiographie und Quantifizierung	29
2.4.6.3. Western Blot und Immunodetektion	30
2.5. Transformation von <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	30
2.6. Mikroskopie	31
2.6.1. Fluoreszenz- und Lichtmikroskopie	31
2.6.2. Konfokale Laser Scanning Mikroskopie (CLSM)	31
3. Ergebnisse	
3.1. Kotranslatationaler Transport von kernkodierten Plastiden-Proteinen aus Kieselalgen in ER-Vesikel	32
3.1.1. Modifikation von kernkodierten Plastiden-Proteinen aus der Kieselalge <i>Odontella sinensis</i>	32
3.1.2. Import der γ -Untereinheit der plastidären ATPase in ER-Vesikel	32
3.1.3. Glykosylierung der PRK beim kotranslationalen Import in ER-Vesikel	33
3.2. Untersuchungen zum posttranslationalen Transport von kernkodierten Plastiden-Proteinen aus Diatomeen in Erbsen-Chloroplasten	35
3.2.1. Posttranslatationaler Import der γ -Untereinheit der ATPase in Erbsen-Chloroplasten	35
3.2.1.1. Proteinimport der γ -Untereinheit in den Erbsen-Chloroplasten	35
3.2.2. Funktionelle Charakterisierung der Transitsequenz und der Prozessierungsstelle der γ -UE der ATPase	37
3.2.2.1. Konstrukterstellung	37
3.2.2.2. Untersuchung zur Prozessierung der γ -Untereinheit der ATPase	40
3.2.3. Posttranslationale Importversuche mit FCP- und PRK-Protein in Erbsen-Chloroplasten	42
3.2.3.1. Konstrukterstellung	42
3.2.3.2. Versuche zum Proteintransport von iFCP und pFCP	43
3.3. Untersuchung des plastidären Proteintransportes von Kieselalgen in vivo	43
3.3.1. Gentechnische Veränderung der Kieselalge <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	43
3.3.1.1. Erstellung homologer Genkonstrukte zur Transformation von <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	43
3.3.1.2. Erstellung heterologer Genkonstrukte zur Transformation von <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	45
3.3.2. Analyse der transformierten <i>Phaeodactylum</i>-Zellen	47
3.3.2.1. BiPGFP-, BiPGFP-DDEL- und GFP-Transformanden	48
3.3.2.2. atpC-GFP-Transformanden	48
3.3.2.3. FCP-GFP-Transformanden	54
3.3.2.4. PRK-GFP-Transformanden	54
3.3.2.5. Transformanden mit Transportsequenzen aus höheren Pflanzen, Euglenophyten und Dinoflagellaten	54
3.3.2.6. Strukturbetrachtung der Transitsequenzen von Diatomeen-Proteinen und der atpC-GFP-Konstrukte	54
3.4. Voruntersuchungen zum möglichen vesikulären Proteintransport in der Diatomeen-Plastidenhülle	61
3.4.1. Primer- und Genauswahl	61
3.4.2. Das arf1-Fragment	61
3.4.3. Das ypt1-Fragment	63
3.4.4. Das rab5-Fragment	65
3.4.5. Die Phosphoglycerat-Kinase (PGK) und das 60S-ribosomale Protein L18a (RL1X)	65
3.5. Untersuchung des Proteintransportes innerhalb der Diatomeen-Plastiden	66
3.5.1. Aufbau eines thylakoidalen Importsystems für Kieselalgen	66
3.5.1.1. Untersuchungen zum Aufbau eines Protonengradienten bei isolierten Thylakoiden aus Kieselalgen	66
3.5.2. Charakterisierung des Thylakoidimports von FCP	69
3.5.2.1. Nachweisbedingungen für die Integration des FCP-Proteins	69
3.5.2.2. Abhängigkeiten der FCP-Integration in Diatomeen-Thylakoide	71
3.5.2.3. Untersuchungen zur unabhängigen Integration von FCP	73
3.5.2.4. FCP-Integration in Thylakoide von höheren Pflanzen	74
3.5.2.5. LHC-Integration in Thylakoide von Diatomeen	75
3.5.2.6. Voruntersuchungen zum Δ pH-abhängigen Transport in die Thylakoide aus Kieselalgen	76

4. Diskussion	
4.1. Transport von Plastiden-Proteinen der Diatomeen in das ER	78
4.1.1. ER-Import als Initiationsschritt des Proteintransportes in die Plastiden	78
4.1.2. Mögliche Glykosylierung von Plastiden-Proteinen im ER	78
4.2. Untersuchungen zur Transitsequenzdomäne von kernkodierten Plastiden-Proteinen der Diatomeen	80
4.2.1. Strukturvergleich von Diatomeen-Transitsequenzen	81
4.2.2. <i>in-vitro</i> -Importverhalten der Diatomeen-Transitsequenzen	83
4.2.3. <i>in-vivo</i> -Lokalisationsstudien in <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	85
4.2.4. <i>in-vivo</i> -Transport von deletierten Diatomeen-Präsequenzen in <i>Phaeodactylum</i>	86
4.2.5. Vergleich von <i>in-vitro</i> - und <i>in-vivo</i> -Transportuntersuchungen	89
4.2.6. ER-Retention und Chloroplastenimport	90
4.3. <i>in-vivo</i> -Transport von Präsequenzen aus anderen Pflanzengruppen in <i>Phaeodactylum</i>	91
4.4. Voruntersuchungen zum möglichen vesikulären Transport im periplastidären Raum der Diatomeen-Plastiden	93
4.5. Endocytobiosen und Proteintransport in die Plastiden	94
4.6. Intraplastidärer Proteintransport der Diatomeen	100
4.6.1. Das Diatomeen-Thylakoidimportsystem	100
4.6.2. Integration von FCP in die Thylakoidmembran	100
4.6.2.1. SRP-abhängige und unabhängige FCP-Integration	101
4.6.2.2. Heterologe Integration von FCP und LHC	102
4.6.2.3. Untersuchungen zum Bindebereich der cpSRP in FCP-Proteinen	103
4.6.2.4. Evolutionäre Bedeutung der FCP- und LHC-Integrationen in Diatomeen-Thylakoide	104
4.6.3. Heterologer Import von OEE23 aus Weizen in Diatomeen-Thylakoide	105
5. Zusammenfassung	107
6. Anhang	
6.1. Literaturverzeichnis	108
6.2. Abkürzungsverzeichnis	118
6.3. Weitere Abbildungen	120