

# **Proteinimport in die Chromatophoren**

**von *Paulinella chromatophora***

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

**Anna Singer**

aus Brjansk, Russland

Leverkusen, November 2017

aus der Emmy-Noether-Gruppe für Mikrobielle Symbiose und Organellenevolution  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Berichterstatter:

1. Dr. Eva C. M. Nowack
2. Prof. Dr. Andreas Weber

Tag der mündlichen Prüfung: 25. Januar 2018

### **Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbstständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist. Die Dissertation wurde in ihrer jetzigen oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht. Ich habe zuvor keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

---

Ort, Datum

---

Anna Singer

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden von Oktober 2014 bis Oktober 2017 in Düsseldorf an der Heinrich-Heine-Universität in der Emmy-Noether-Gruppe für Mikrobielle Symbiose und Organellenevolution unter der Betreuung von Frau Dr. Eva C. M. Nowack durchgeführt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

**Singer, A., Poschmann, G., Mühlich, C., Valadez-Cano, C., Hänsch, S., Hüren, V., Rensin S. A., Stühler K., Nowack, E. C. M.** (2017). Massive Protein Import into the Early-Evolutionary-Stage Photosynthetic Organelle of the Amoeba *Paulinella chromatophora*. *Current Biology*, 27(18), 2763–27

## Zusammenfassung

Mitochondrien und Plastiden haben sich vor über einer Milliarde Jahren durch Endosymbiose aus freilebenden Bakterien entwickelt. Dieser Vorgang hatte einen enormen Einfluss auf die Evolution von Eukaryoten, jedoch bleiben die frühen Schritte der Integration, sowie die zeitliche Abfolge der beteiligten Prozesse trotz langjähriger Forschung an beiden Organellen noch weitgehend ungeklärt. Die Amöbe *Paulinella chromatophora* besitzt zwei photosynthetische Organellen, welche als Chromatophoren bezeichnet werden. Diese stammen von Cyanobakterien ab und haben sich, unabhängig von Plastiden, vor ca. 90-120 Millionen Jahren entwickelt. Daher bieten sie die einzigartige Möglichkeit die Reorganisation des Proteoms eines Organells während der Integration in eine eukaryotische Wirtszelle zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden Proteine aus isolierten Chromatophoren sowie vollständigen Zelllysaten mittels Massenspektrometrie untersucht, was in der Identifikation von 207 Wirts-kodierten Proteinen in der Chromatophorenfraktion resultierte. Diese Importkandidaten konnten in zwei Klassen unterteilt werden, welche vermutlich auf unabhängigen Wegen in die Chromatophoren importiert werden. Lange Importkandidaten scheinen spezifisch Lücken in Chromatophoren-lokalisierten Biosynthesewegen und Prozessen zu füllen. Besonders interessant ist hier eine große Gruppe von Proteinen, welche an der Prozessierung genetischer Information (z.B. Transkriptionsfaktoren) beteiligt ist. Interessanterweise konnte eine konservierte N-terminale Sequenz innerhalb der langen Importkandidaten identifiziert werden, welche ein potentiell Chromatophoren-Transitpeptid (crTP) repräsentiert. Erste Untersuchungen der Lokalisation nach heterologer Expression in *Nicotiana benthamiana* zeigten den crTP-vermittelten Import von Proteinen in die Plastiden der Pflanzenzelle, was auf gemeinsame Komponenten in der Proteinimportmaschinerie der Chromatophoren und Plastiden hindeutet. Die andere Klasse von Importkandidaten besteht aus kurzen Proteinen (< 10 kDa). Diese weisen keine gemeinsamen Sequenzmotive auf, welche auf ein potentiell Transitpeptid hindeuten könnten. Stattdessen zeigt eine Gruppe der kurzen Importkandidaten charakteristische Eigenschaften von antimikrobiellen Peptiden (AMP). Um die antimikrobielle Aktivität der potentiellen AMPs zu untersuchen, wurden verschiedenen Kandidaten mithilfe eines His-Tags aufgereinigt und ihr Einfluss auf das Wachstum von *E. coli* ermittelt. Dabei zeigten einige der potentiellen AMPs einen Zeit- und Konzentrations-abhängigen inhibierenden Effekt auf das Wachstum des Bakteriums. Zudem führten die aktiven Proteine zu einer Erhöhung der Membranpermeabilität der bakteriellen Zellen und zeigten eine Interaktion mit dem negativ geladenen Lipid Phosphatidylinositol-4-Phosphat. Zusammen mit den Berichten von symbiotischen AMPs aus diversen anderen Wirt-Endosymbiont-Interaktionen, liefern diese Ergebnisse Hinweise auf eine mögliche Beteiligung der AMPs an der Interaktion zwischen dem Chromatophor und der Wirtszelle.

## Summary

The endosymbiotic acquisition of mitochondria and plastids more than 1 billion years ago profoundly impacted the evolution of eukaryotes. Early stages of organelle integration as well as the temporal sequence of events in this process however remain poorly understood. The amoeba *Paulinella chromatophora* contains more recently established cyanobacterium-derived photosynthetic organelles, termed “chromatophores”. To explore the re-arrangement of an organellar proteome during its integration into a eukaryotic host cell, the chromatophore proteome was characterized by mass spectrometry. For this purpose, isolated chromatophores and full cell lysates were analyzed in triplicates revealing a total of 207 host-encoded proteins which seem to be targeted to the chromatophores. These import candidates can be grouped into two classes of proteins which are likely clients to independent import pathways. Long import candidates seem to specifically fill in gaps in chromatophore-encoded metabolic pathways and processes (in particular genetic information processing). Interestingly a conserved N-terminal domain could be identified in the long import candidates, which might represent a chromatophore transit peptide (crTP) which targets proteins to the chromatophore. Intriguingly, upon heterologous expression in a plant cell, the crTP confers plastid localization suggesting common features in chromatophore and plastid protein import pathways, which evolved independently and more than 1 billion years apart from each other. The second class of import candidates are short peptides (<10 kDa) without a conserved import signal. A group of these peptides shows features that are characteristic of antimicrobial peptides (AMPs). To access antimicrobial activity of these putative AMPs, different peptides of this group were purified as recombinant His-tag fusion proteins and incubated with *E. coli* cultures. Subsequent growth assays of the challenged *E. coli* cells revealed that some of these ‘AMPs’ show a time/dose dependent inhibitory effect on the growth. Furthermore, the active peptides were shown to increase membrane permeability of bacterial cells and to interact with the negatively charged lipid phosphatidylinositol-4-phosphate. Together with the report of symbiont-targeted AMPs from several other symbiotic systems, these results indicate that symbiotic AMPs might play a role in the interaction between the *P. chromatophora* host cell and the chromatophores.

## Abkürzungen und Fachbegriffe

|                                  |                                                                                    |                   |                                                                         |
|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------|-------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| %                                | Prozent                                                                            | M                 | Molar                                                                   |
| Abb.                             | Abbildung                                                                          | Mb                | Mega-Basenpaare                                                         |
| AMP                              | Antimikrobielles Peptid                                                            | mM                | Millimolar                                                              |
| Amp                              | Ampicillin                                                                         | mRNA              | <i>messenger RNA</i><br>(Boten-RNA)                                     |
| Amp <sup>R</sup>                 | Ampicillinresistenz                                                                | MS                | Massenspektrometrie                                                     |
| AS                               | Aminosäure                                                                         | mTP               | Mitochondriales<br>Transitpeptid                                        |
| bp                               | Basenpaar                                                                          | NK                | Niedrige Konfidenz                                                      |
| BSA                              | Bovines Serumalbumin                                                               | nt                | Nukleotid                                                               |
| cDNA                             | <i>Complementary DNA</i><br>(komplementäre DNA)                                    | N-terminal        | Amino-terminal                                                          |
| Cm                               | Chloramphenicol                                                                    | OD <sub>600</sub> | Optische Dichte bei 600 nm                                              |
| Cm <sup>R</sup>                  | Chloramphenicolresistenz                                                           | ORF               | <i>Open reading frame</i><br>(offener Leserahmen)                       |
| crTP                             | Chromatophor-Transitpeptid                                                         | PCR               | <i>Polymerase chain reaction</i><br>(Polymerasekettenreaktion)          |
| C-terminal                       | Carboxy-terminal                                                                   | PI                | Propidiumiodid                                                          |
| cTP                              | Chloroplast-Transitpeptid                                                          | PTS               | Peroxisomen Targeting<br>Signal                                         |
| DIC                              | <i>Differential interference<br/>contrast</i><br>(Differenzialinterferenzkontrast) | rDNA              | Ribosomale DNA                                                          |
| DNA                              | <i>Deoxyribonucleic acid</i><br>(Desoxyribonukleinsäure)                           | Rif               | Rifampicin                                                              |
| dNTP                             | Desoxyribonukleosidtriphosphat                                                     | RNA               | <i>Ribonucleic acid</i><br>(Ribonukleinsäure)                           |
| ER                               | Endoplasmatisches Retikulum                                                        | RT                | Raumtemperatur                                                          |
| <i>et al.</i>                    | <i>Et alia</i><br>(und Andere)                                                     | SP                | Signalpeptid                                                            |
| Gb                               | Giga-Basenpaare                                                                    | Spec              | Spectinomycin                                                           |
| Gent                             | Gentamicin                                                                         | SVM               | <i>Support Vector Machine</i><br>(Stützvektormaschine)                  |
| H <sub>2</sub> O <sub>bid.</sub> | zweifach destilliertes Wasser                                                      | Tab.              | Tabelle                                                                 |
| His-Tag                          | Histidin-Tag                                                                       | TMD               | Transmembrandomäne                                                      |
| HK                               | Hohe Konfidenz                                                                     | U                 | Unit                                                                    |
| HMM                              | Hidden Markov Modell                                                               | UPM               | Umdrehungen pro Minute                                                  |
| HRP                              | <i>Horseradish peroxidase</i><br>(Meerrettichperoxidase)                           | v/v               | Volumenprozent                                                          |
| <i>In silico</i>                 | Im Computer moduliert                                                              | w/v               | Gewichtsprozent                                                         |
| <i>In vitro</i>                  | Im Glas (außerhalb lebender<br>Organismen)                                         | WT                | Wildtyp                                                                 |
| <i>In vivo</i>                   | Im lebendigem Organismus                                                           | x g               | -fach<br>Schwerebeschleunigung                                          |
| Kan                              | Kanamycin                                                                          | YFP               | <i>Yellow fluorescent protein</i><br>(gelb fluoreszierendes<br>Protein) |
| kDa                              | Kilodalton                                                                         | α                 | Anti                                                                    |

# Inhaltsverzeichnis

|                                                                                                                                                  |     |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| Zusammenfassung.....                                                                                                                             | III |
| Summary .....                                                                                                                                    | IV  |
| Abkürzungen und Fachbegriffe .....                                                                                                               | V   |
| Inhaltsverzeichnis.....                                                                                                                          | VI  |
| 1 Einleitung .....                                                                                                                               | 1   |
| 1.1 Ursprung und Diversität von Plastiden .....                                                                                                  | 1   |
| 1.1.1 Wirts-kodierte Proteine in Plastiden .....                                                                                                 | 2   |
| 1.1.2 Import von Proteinen in primäre Plastiden .....                                                                                            | 3   |
| 1.2 <i>P. chromatophora</i> als Modellorganismus für Untersuchungen der Organellenevolution .....                                                | 6   |
| 1.2.1 Genomreduktion in Chromatophoren von <i>P. chromatophora</i> .....                                                                         | 8   |
| 1.2.2 Import Wirts-kodierter Proteine in die Chromatophoren von <i>P. chromatophora</i> .....                                                    | 9   |
| 1.3 Zielsetzung dieser Arbeit .....                                                                                                              | 11  |
| 2 Ergebnisse .....                                                                                                                               | 12  |
| 2.1 Isolation der Chromatophoren aus <i>P. chromatophora</i> .....                                                                               | 12  |
| 2.2 Das Proteomdatenset von <i>P. chromatophora</i> .....                                                                                        | 13  |
| 2.3 Chromatophoren-kodierte Proteine.....                                                                                                        | 16  |
| 2.4 Import von zwei Klassen von Proteinen in die Chromatophoren von <i>P. chromatophora</i> .....                                                | 17  |
| 2.5 Lange importierte Proteine .....                                                                                                             | 19  |
| 2.5.1 Identifikation eines N-terminalen Importsignals .....                                                                                      | 20  |
| 2.5.2 <i>In silico</i> Vorhersage von langen importierten Proteinen .....                                                                        | 24  |
| 2.5.3 Rekonstruktion von Chromatophoren-lokalisierten Biosynthesewegen und Prozessen durch <i>in silico</i> vorhergesagte Importkandidaten ..... | 26  |
| 2.6 Kurze importierte Proteine.....                                                                                                              | 27  |
| 2.6.1 Antimikrobielle Aktivität von kurzen importierten Proteinen .....                                                                          | 28  |
| 2.6.2 Kationische AMPs erhöhen die Membranpermeabilität von <i>E. coli</i> .....                                                                 | 33  |
| 2.6.3 Interaktion von antimikrobiellen Peptiden mit Lipiden .....                                                                                | 34  |
| 2.7 Funktionale Klassifizierung von Importkandidaten.....                                                                                        | 34  |

|       |                                                                                                            |    |
|-------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 2.8   | Phylogenetischer Ursprung importierter Proteine .....                                                      | 35 |
| 2.9   | Subzelluläre Lokalisation importierter Proteine nach heterologer Expression in <i>N. benthamiana</i> ..... | 36 |
| 3     | Diskussion.....                                                                                            | 39 |
| 3.1   | Das Chromatophor-Proteomdatenset .....                                                                     | 39 |
| 3.2   | Lange importierte Proteine .....                                                                           | 40 |
| 3.2.1 | Importmechanismus langer Importkandidaten und Ursprung der crTPs.....                                      | 41 |
| 3.2.2 | <i>In silico</i> Vorhersage des Proteoms der Chromatophoren .....                                          | 43 |
| 3.3   | Kurze importierte Proteine .....                                                                           | 44 |
| 3.3.1 | Antimikrobielle Eigenschaften von kurzen Importkandidaten .....                                            | 45 |
| 3.3.2 | Importmechanismus und potentielle Rolle kurzer Importkandidaten .....                                      | 47 |
| 3.4   | Reorganisations-Prozess des Proteoms der Chromatophoren .....                                              | 49 |
| 3.5   | Elemente der parallelen Evolution in anderen endosymbiotischen Interaktionen .....                         | 50 |
| 3.6   | Ausblick .....                                                                                             | 51 |
| 4     | Material und Methoden .....                                                                                | 53 |
| 4.1   | Material .....                                                                                             | 53 |
| 4.1.1 | Chemikalien .....                                                                                          | 53 |
| 4.1.2 | Kulturmedien .....                                                                                         | 53 |
| 4.1.3 | Enzyme und molekularbiologische Kits.....                                                                  | 55 |
| 4.1.4 | Oligonukleotide .....                                                                                      | 56 |
| 4.1.5 | Plasmide .....                                                                                             | 57 |
| 4.1.6 | Stämme .....                                                                                               | 59 |
| 4.2   | Methoden.....                                                                                              | 60 |
| 4.2.1 | Mikrobiologische Methoden .....                                                                            | 60 |
| 4.2.2 | Molekularbiologische Methoden.....                                                                         | 62 |
| 4.2.3 | Proteinbiochemische Methoden .....                                                                         | 64 |
| 4.2.4 | Untersuchung des Proteoms von Chromatophoren .....                                                         | 68 |
| 4.2.5 | <i>In silico</i> Vorhersage von potentiellen Importkandidaten .....                                        | 71 |

|       |                                                                                   |    |
|-------|-----------------------------------------------------------------------------------|----|
| 4.2.6 | Untersuchung der Lokalisation von Importkandidaten in <i>N. benthamiana</i> ..... | 75 |
| 4.2.7 | Computerprogramme und bioinformatische Analysemethoden .....                      | 77 |
| 5     | Literaturverzeichnis .....                                                        | 79 |
| 6     | Ergänzende Daten .....                                                            | 94 |
| 7     | Manuskripte .....                                                                 | 96 |
|       | Danksagung .....                                                                  | IX |

# 1 Einleitung

## 1.1 Ursprung und Diversität von Plastiden

Bereits am Ende des 19. Jahrhunderts führten mikroskopische Untersuchungen durch Julius Sachs, Andreas Schimper und Richard Altmann zu der Entdeckung der semiautonomen Natur von Plastiden und Mitochondrien (Schimper 1883; Altmann 1890; Sachs 1882). Doch erst ca. 15 Jahre später, im Jahr 1905 vereinte der russische Botaniker Constantin Mereschkovsky diese Beobachtungen zu der Hypothese, dass Plastiden von Cyanobakterien abstammen könnten (Mereschkowsky 1905). Nachdem mikroskopische Hinweise für die Präsenz von DNA in Plastiden und Mitochondrien publiziert wurden (Nass & Nass 1963; Ris & Plaut 1962), formulierte Lynn Margulis die Theorie der Endosymbiose, welche postuliert, dass Plastiden und Mitochondrien von ursprünglich freilebenden Prokaryoten abstammen (Sagan 1967; Margulis 1971). Obwohl immer noch verschiedene Aspekte der Endosymbionten-Theorie über den Ursprung von Plastiden und Mitochondrien kontrovers debattiert werden, wird die Theorie heute weitgehend akzeptiert, da vor allem Ergebnisse phylogenetischer Analysen und Genomsequenzvergleiche freilebender Cyanobakterien und Plastiden für ihre Richtigkeit sprechen (Bonen & Doolittle, 1975; Giovannoni *et al.*, 1988; Stackebrand *et al.*, 1988; Yang *et al.*, 1985).

Alle Plastiden haben einen monophyletischen Ursprung und sind vermutlich durch die Integration eines cyanobakteriellen Endosymbionten vor ca. 1,2 Milliarden Jahren entstanden (Parfrey *et al.*, 2011). Dieses Ereignis wird als primäre Endosymbiose bezeichnet und führte zu der Entstehung von drei autotrophen Linien: den Glaucophyten (Glaucophyta), den roten (Rhodophyta) und den grünen Algen sowie deren Nachkommen, den Landpflanzen (zusammen: Chlorophyta) (siehe Abbildung 1.1-1). Dabei ähnelt die Morphologie der Cyanellen, wie die Plastiden von Glaucophyten genannt werden, noch sehr dem Aufbau des cyanobakteriellen Vorgängers. So enthalten Cyanellen noch eine dünne Peptidoglycan-ähnliche Zellwand zwischen der inneren und der äußeren Cyanellenmembran (Kies & Kremer 1990). Zudem besitzen sie Phycobilisomen und Carboxysomen mit großer Ähnlichkeit zu denen freilebender Cyanobakterien (Steiner *et al.*, 2005). Alle primären Plastiden sind von zwei Hüllmembranen umgeben, welche jeweils von der äußeren und der inneren cyanobakteriellen Membran abstammen (Cavalier-Smith, 2000; Duy *et al.*, 2007). Zudem besitzen alle primären Plastiden eine sehr ähnlich aufgebaute Proteinimportmaschinerie, welche in den Hüllmembranen lokalisiert und einen weiteren starken Hinweis auf den monophyletischen Ursprung der Plastiden liefert (Cavalier-Smith, 2000; Duy *et al.*, 2007).

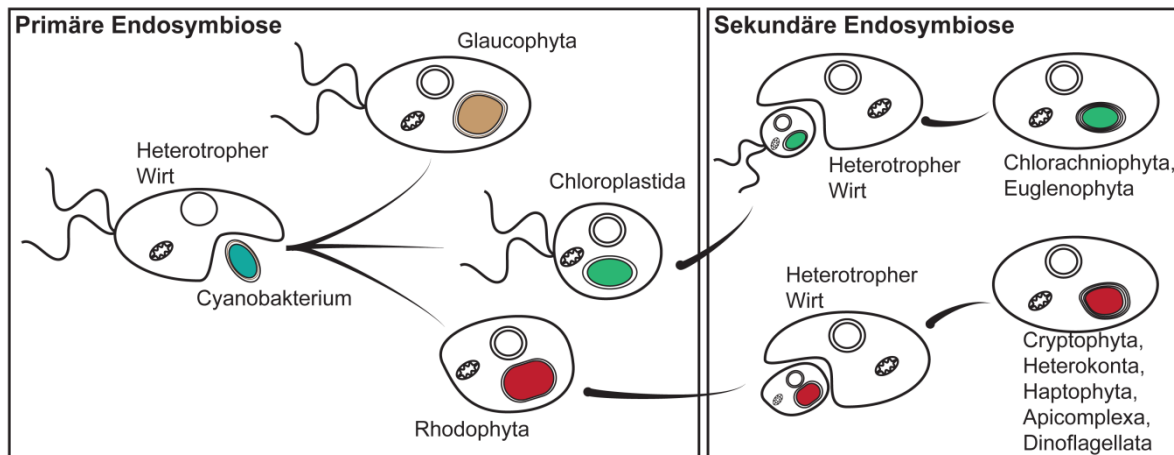


**Abbildung 1.1-1 Schematische Darstellung der Evolution von Plastiden.** Primäre Plastide haben einen gemeinsamen Ursprung und sind durch die Aufnahme und Integration eines Cyanobakteriums durch eine heterotrophe, eukaryotische Zelle entstanden. Dies führte zur Entstehung von drei autotrophen Linien: den Glaucophyta, den Chloroplastida und den Rhodoplastida. Bei der sekundären Endosymbiose dienten Rhodophyta oder Chloroplastida als Endosymbionten für eine heterotrophe eukaryotische Zelle. Während Chlorarachniophyta und Euglenophyta ihre Plastiden durch die Integration von Chloroplastida erwarben, führte die Integration von Rhodoplastida zu der Entstehung von Cryptophyta, Stramenopila, Haptophyta und Apicomplexa. Die komplexen Plastiden dieser Linien sind durch mehrere, meist drei oder vier, Membranen umgeben. Die Abbildung wurde nach (Gould *et al.*, 2008), (Keeling 2010) und (Garg & Gould 2016) angefertigt.

Nach der Etablierung der primären Plastiden führten mehrere sekundäre Endosymbiosen zu der Verbreitung der Photosynthese auch in anderen eukaryotischen Linien (Archibald 2009; Gould *et al.* 2008). Dabei dienten Rot- oder Grünalgen als Endosymbionten für heterotrophe Eukaryoten, was zu der Entstehung von sekundären Plastiden in Euglenophyta, Chlorarachniophyta, Cryptophyta, Heterokontophyta, Haptophyta, Dinoflagellata, and Apicomplexa führte (Keeling 2010). Solche komplexen Plastiden sind von drei oder vier Hüllmembranen umgeben (Archibald & Keeling, 2002; McFadden, 2001) und enthalten in den Fällen von Cryptophyta und Chlorarachniophyta noch den stark reduzierten Nukleus des eukaryotischen Endosymbionten, der als Nucleomorph bezeichnet wird (Archibald 2007; Gilson *et al.* 2006).

### 1.1.1 Wirts-kodierte Proteine in Plastiden

Während Glaucophyten, Rot- und Grünalgen jeweils nur eine Art von Plastiden besitzen, können die primären Plastiden von Landpflanzen in Organellen mit verschiedenen Morphologien und Funktionen differenzieren, wie z. B. die Pigment-haltigen Chloroplasten, Chromoplasten und Gerontoplasten oder die farblosen Leukoplasten. Um diese vielfältigen Rollen erfüllen zu können, benötigen Plastiden an die 2000 Proteine (Kleine *et al.*, 2009; Richly & Leister, 2004), wobei die bisher untersuchten Plastidengenome für nur 15 bis 209 Proteine kodieren (Keeling & Palmer 2008). Diese Diskrepanz zwischen der Anzahl der Proteine, welche in den Plastiden benötigt wird und der Anzahl der Plastiden-kodierten Proteine, wird weitgehend durch den Verlust, sowie den Transfer von Plastiden-kodierten Genen in den Nukleus der Wirts-Zelle erklärt, dem sogenannten endosymbiotischen Gentransfer (EGT) (Martin & Herrmann 1998). Doch erst die Entwicklung eines funktionalen Importapparates, der den

Re-Import der nun cytosolisch synthetisierten Proteine zurück in den Plastiden ermöglichte, erlaubte den Verlust der entsprechenden Gene im Plastiden (Allen 1993). Dabei führte der EGT in Plastiden (und auch Mitochondrien) zur Expansion des eukaryotischen Genoms, während es in der evolutionären Genomreduktion der Organellen resultierte (Allen 1993; Martin & Herrmann 1998). Somit werden ca. 95% der Plastiden-Proteine durch das Wirtsgenom kodiert und die meisten posttranslational in die Plastiden importiert (Kleine *et al.*, 2009). So wird z. B. die Teilung von Plastiden durch diverse Wirtskodierte Proteine mit cyanobakteriellem Ursprung kontrolliert (Maple & Møller 2007).

Neben bakteriellen Proteinen, scheinen auch eukaryotische Wirtskodierte Proteine in die Plastiden importiert zu werden. Ein Beispiel dafür sind Faktoren, die an der Expression Plastiden-kodierter Gene beteiligt sind. Obwohl die grundlegende Genexpression von einer prokaryotischen Maschinerie mit cyanobakteriellem Ursprung kontrolliert wird, werden keine homologen bakteriellen Proteine, die die Funktion von Transkriptionsfaktoren und Nucleoid-Proteinen übernehmen könnten, in Landpflanzen wie *Arabidopsis thaliana* gefunden (Karcher *et al.*, 2009; Kobayashi *et al.*, 2002). Interessanterweise konnte bei der Untersuchung des Proteoms von Plastiden aus *A. thaliana* neue nicht-bakterielle Proteine identifiziert werden, welche an der Transkription, posttranslationalen RNA-Prozessierung sowie der Translation beteiligt sind (Pfalz & Pfannschmidt 2013; Kobayashi *et al.* 2002). Diese Proteine werden als transkriptional aktive Chloroplasten (pTAC) bezeichnet und suggerieren die Existenz einer hybriden Transkriptions-Maschinerie in Plastiden von Landpflanzen, welche sich sowohl aus bakteriellen als auch eukaryotischen Komponenten zusammensetzt.

### 1.1.2 Import von Proteinen in primäre Plastiden

Die meisten Wirtskodierten Proteine werden auf cytoplasmatischen Ribosomen synthetisiert und posttranslational in die Plastiden importiert. Dabei enthalten Präkursor-Proteine abspaltbare N-terminale Sequenzen, welche als Chloroplast-Transitpeptide (cTPs) bezeichnet werden. Diese Sequenzen enthalten alle Informationen, welche für das Targeting, sowie die Translokation eines Proteins über beide Membranen benötigt werden. cTPs sind meistens zwischen 50 und 70 Aminosäuren (AS) lang, angereichert mit hydroxylierten und basischen AS, arm an negativ geladenen AS und haben eine mit Argininen angereicherte C-terminale Domäne (Bruce 2000; Garg & Gould 2016). Abgesehen davon ist die primäre Aminosäuresequenz stark variabel, was darauf hindeutet, dass nicht ein spezifisches Sequenzmotiv, sondern eher strukturelle und/oder physikochemische Eigenschaften der Sequenz wichtig für die Erkennung durch die Translokationsmaschinerie sind. Die sekundäre Struktur der cTPs ist bisher nicht völlig geklärt. Während es viele Berichte darüber gibt, dass cTPs im Allgemeinen unstrukturiert sind, suggerieren andere die Ausbildung einer  $\alpha$ -helikalen Konformation beim Kontakt mit der Zielmembran (Bruce 2001). Zusätzlich existieren in Plastiden mehrere Proteine

mit nicht-abspaltbaren Transitpeptiden. Dabei handelt es sich vor allem um Proteine, welche in der äußeren Plastidenmembran lokalisieren. Mit der Ausnahme von Toc75, welches die Haupttranslokationspore der äußeren Hüllmembran darstellt und mithilfe eines klassischen cTPs zu dieser geleitet wird, wird der Großteil der Proteine durch intrinsische Informationen, z.B. in Form einer Transmembrandomäne (TMD) mit positivgeladenen AS in den flankierenden Bereichen oder eines  $\beta$ -Fass Strukturmotivs zu der äußeren Plastidenmembran transportiert (Oh & Hwang, 2015; Schleiff & Klösgen, 2001). Im Gegensatz dazu haben die meisten Proteine der inneren Plastidenmembran sowie Proteine des Intermembranraums klassische, abspaltbare cTPs (Garg & Gould 2016).

Die meisten Proteine werden posttranslational über einen Multiprotein-Komplex importiert, welcher als TOC/TIC Komplex (für Translokation der äußeren und inneren Chloroplastenmembran) bezeichnet wird (siehe Abbildung 1.1-2 A). Dieser besteht aus mehreren löslichen und Membran-gebundenen Proteinen, welche nach ihrem molekularen Gewicht benannt wurden und einen dualen evolutionären Ursprung haben (Bölter *et al.*, 1998; Reumann & Keegstra, 1999). Dabei wird das cTP im ersten Schritt an den Serinen phosphoryliert und durch den sogenannten *Guidance*-Komplex, bestehend aus dem Hitzeschock-Protein 70 (Hsp70) und einem 14-3-3 Protein, zur äußeren Plastidenmembran dirigiert (Lamberti *et al.*, 2011; May & Soll, 2000). Das Hitzeschock-Protein 90 (Hsp90) ist ein weiteres Chaperon, welches eine Rolle beim Dirigieren der Präkursor-Proteine spielt (Fellerer *et al.*, 2011). Der Kern-Komplex der äußeren Membran besteht aus den integralen Membranproteinen Toc34, Toc75 und Toc159 (Schleiff *et al.*, 2003). Dabei bilden die Proteine Toc34 und Toc159 GTP-abhängige Rezeptoren, welche an der Erkennung des *Guidance*-Komplexes beteiligt sind (Kessler & Schnell, 2009; Schleiff *et al.*, 2003), während Toc75 die Haupttranslokationspore der äußeren Membran darstellt (Schnell *et al.*, 1994). Eine weitere Komponente der äußeren Membran, das Toc64 Protein, wurden bisher nur in Landpflanzen identifiziert und dient als Rezeptor für Hsp90-assoziierte Präkursor-Proteine, welche im Anschluss an Toc34 übergeben werden (Qbadou *et al.* 2006). Im Gegensatz zu Toc34, Toc75 und Toc159 ist Toc64 nicht essentiell für die Zelle (Aronsson *et al.* 2007). Der Kern-Komplex der inneren Membran besteht aus den Proteinen Tic20/21, Tic22 und Tic110. Tic22 ist ein lösliches Protein, welches im Intermembranraum lokalisiert und mit dem ankommenden Präkursor-Protein interagiert (Kouranov *et al.*, 1998). Dabei könnte Tic22 die Rolle eines Chaperons übernehmen, welches korrektes Targeting zur inneren Pore vermittelt, sowie die Missfaltung des ankommenden Präkursor-Proteins verhindert (Rudolf *et al.* 2013; Kasmati *et al.* 2013). Tic20/21 (Kouranov & Schnell 1997; Kouranov *et al.* 1998) und Tic110 (Schnell *et al.*, 1994) sind integrale Membranproteine und bilden vermutlich zwei unabhängige Poren in der inneren Plastidenmembran, wobei genaue Details bis heute nicht bekannt sind (Reumann *et al.*, 2005). Tic40 ist ein potentieller Interaktionspartner von Tic110 und stellt vermutlich ein Gerüst für stromale Chaperone dar. Weitere identifizierte TIC-Komponenten, wie z.B. Tic32, Tic55, and Tic62 sind vermutlich an der Redox-Regulation des

Proteinimports beteiligt (Stengel *et al.*, 2009; Stengel *et al.*, 2008). Als letztes interagieren die Chaperone GroEL und CplC mit dem Präkursor-Protein im Stroma des Plastiden. Diese sind an der Faltung des reifen Proteins nach Abspaltung des cTPs beteiligt (Reumann *et al.*, 2005).

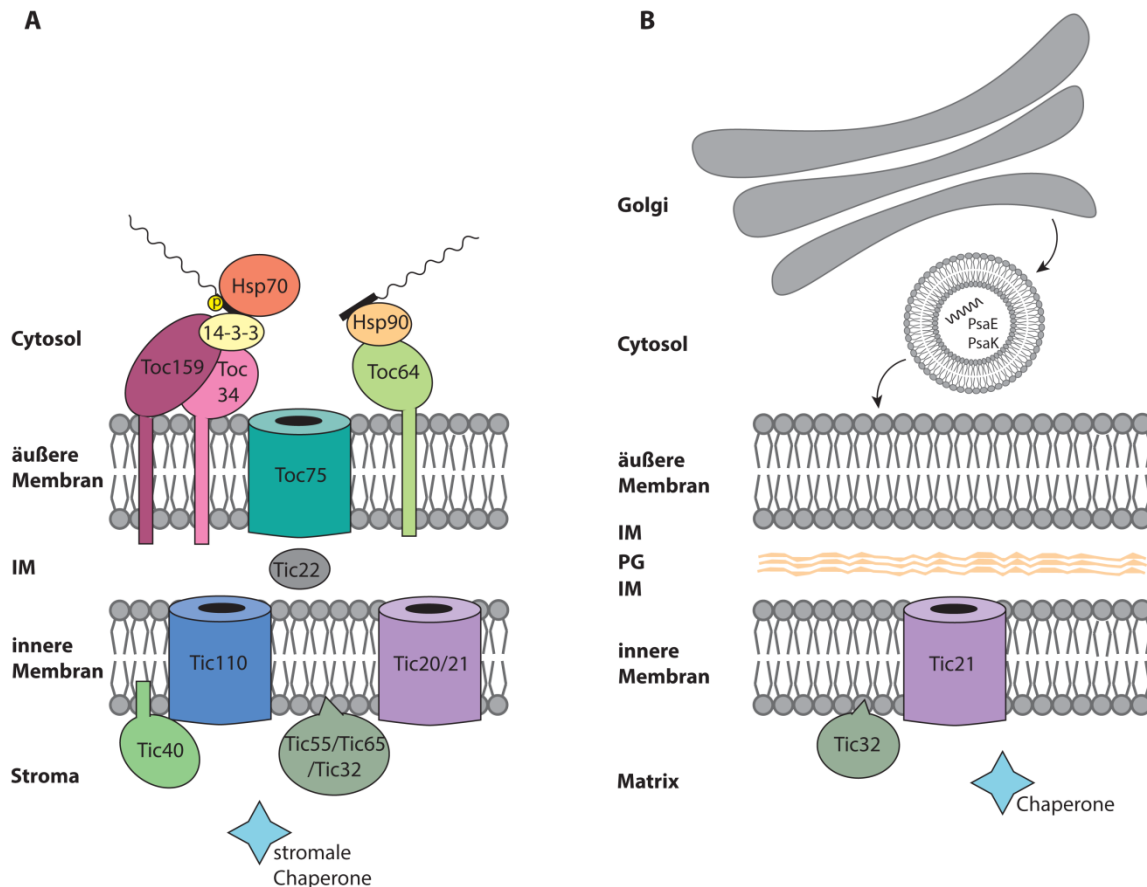


**Abbildung 1.1-2 Übersicht über den Proteinimport in primäre Plastiden (A) und potentielle Proteinimportmaschinerie in Chromatophoren von *P. chromatophora* (B).** (A) TOC/TIC-Maschinerie in primären Plastiden. Präkursor-Proteine werden mithilfe des Guidance-Komplexes oder durch das cytosolische Chaperon Hsp90 zu der äußeren Plastidenmembran gebracht. Präproteine, welche durch den Guidance-Komplex gebunden sind, werden durch die GTP-abhängigen Rezeptoren Toc34 und Toc159 erkannt und an Toc75, die Hauptpore der äußeren Membran, übergeben. Hsp90-gebundene Präproteine werden durch den Rezeptor Toc64 erkannt und anschließend an Toc34 transferiert. Im Intermembranraum (IM) wird das ankommende Präprotein durch das Chaperon Tic22 erkannt. Tic110 und Tic20/21 bilden vermutlich zwei unabhängige Poren in der inneren Plastidenmembran. Tic40 interagiert mit Tic110 und stellt vermutlich eine Plattform für stromale Chaperone dar. Die Proteine Tic55, Tic65 und Tic32 sind an der Redox-Regulation der Import-Maschinerie beteiligt. Die Abbildung wurde nach (Sjuts *et al.*, 2017) angefertigt. (B) Potentieller Importmechanismus der Wirts-kodierten Proteine PsalE und PsalK in die Chromatophoren von *P. chromatophora*. Im Gegensatz zu Präkurso-Proteinen, welche in Plastiden importiert werden, weisen PsalE und PsalK keine N-terminale Sequenzen auf, welche den Import vermitteln könnten. Stattdessen werden PsalE und PsalK möglicherweise über das Endomembransystem (ER und Golgi) zum Chromatophor geleitet. Nach dem Freilassen der Proteine in den Intermembranraum könnten diese mithilfe der Orthologe von Tic21 und Tic32 über die innere Membran in die Matrix der Chromatophoren importiert werden. Anschließend könnten die ankommenden Proteine mithilfe von Chaperonen in die Matrix der Chromatophoren gezogen werden. Die Abbildung wurde nach (Bodyt *et al.*, 2009) und (Nowack & Grossman, 2012) angefertigt.

Zusätzlich zu dem beschriebenen Proteinimportmechanismus, gibt es Berichte über den TOC/TIC-unabhängigen Proteinimport in Plastiden. Villarejo und seine Kollegen konnten in 2005 zeigen, dass das *A. thaliana* Protein  $\alpha$ -Carboanhydrase (CAH1) ein N-terminales Signalpeptid (SP) besitzt, welches für das Targeting des Proteins in das endoplasmatische Retikulum (ER) verantwortlich ist (Villarejo *et al.* 2005). Interessanterweise konnte die Lokalisation des Proteins in den Plastiden von *A. thaliana*

durch drei unabhängige Methoden gezeigt werden. Dabei erfolgte der Import des Proteins unabhängig von der TOC-Maschinerie der äußeren Membran und konnte durch Brefeldin A inhibiert werden, was auf die Beteiligung des Golgi-Apparates während des Proteinimportes hindeutet. Der Import von Proteinen in Plastiden unter Beteiligung des Endomembransystems ist bereits seit einiger Zeit für die komplexen Plastiden mit sekundären Ursprung bekannt (Maie *et al.*, 2015). Diese besitzen typischerweise drei oder vier Hüllmembranen, wobei die jeweils äußere Membran vom ER der Wirtszelle abgeleitet ist (Cavalier-Smith, 2003). Die Präkursor-Proteine, die über diesen Weg importiert werden, besitzen ein zweigeteiltes Transitpeptid, welches aus einem Signalpeptid und einer nachgeschalteten cTP-ähnlichen Sequenz besteht (Kilian & Kroth 2004). Bisher konnte für das *A. thaliana* Protein CAH1 jedoch keine Sequenz identifiziert werden, welche das Protein zum Plastiden leiten würde und der Mechanismus des Importes bleibt nicht vollständig geklärt.

## 1.2 *P. chromatophora* als Modellorganismus für Untersuchungen der Organellenevolution

Obwohl der evolutionäre Ursprung und die Funktion von Mitochondrien und Plastiden lange erforscht werden, sind die frühen Schritte, welche zu der Integration eines zuvor freilebenden Bakteriums in eine unabhängige Wirtszelle führten, sowie die zeitliche Abfolge der beteiligten Prozesse kaum verstanden. Allerdings macht der sehr lange zurückliegende Ursprung von Mitochondrien und Plastiden es schwer, die initialen Prozesse der Interaktion zwischen Endosymbiont und Wirtszelle zu erforschen. Die Amöbe *Paulinella chromatophora* bietet eine einzigartige Möglichkeit die Beziehung zwischen einer Wirtszelle und einem photosynthetischen Organell zu untersuchen, da die Analyse der 18S ribosomalen RNA (rRNA) zeigt, dass das maximale Alter der Chromatophoren bei 90-140 Millionen Jahren liegt (Delaye *et al.*, 2016). Dies macht sie zu einem geeigneten Organismus um die frühen Schritte der Evolution von Organellen zu untersuchen.

Die Frischwasseramöbe wurde zuerst 1895 von dem deutschen Wissenschaftler Robert Lauterborn beschrieben (Lauterborn 1895). Sie gehört zu der Gruppe der Cercozoa (Cavalier-Smith & Chao, 2003; Moreira *et al.*, 2007) und zeigt eine globale Verbreitung in Brackwasserzonen und Süßwassergewässern (Melkonian & Mollenhauer 2005). Die Amöbe lebt in einer oval förmigen Hülle, welche aus Silikatschuppen besteht und besitzt eine terminale Mundöffnung aus der Filopodien austreten können und eine Fortbewegung der Zelle durch kriechende Bewegungen ermöglichen (Nowack, 2014). Das Kerngenom von *P. chromatophora* ist, laut ersten Illumina HiSeq-Sequenzierungen, 9,61 Giga-Basenpaaren (Gb) groß, konnte aufgrund der Größe bisher jedoch nicht vollständig sequenziert bzw. assembliert werden. Im Gegensatz dazu, liegen sehr vollständige Transkriptomdaten von *P. chromatophora* vor. Diese bestehen aus 49,5 Mega-Basenpaaren (Mb) an assemblierten Sequenzen, welche für 442 der 458 (= 97%) eukaryotischen Kernproteine der *Core*

*Eukaryotic Genes Mapping Approach* (CEGMA) Datenbank kodieren (Nowack *et al.*, 2016). Im Gegensatz zu verwandten heterotrophen Spezies, wie *Paulinella ovalis*, *Paulinella intermedia*, und *Paulinella indentata*, besitzt *Paulinella chromatophora*, sowie die beiden erst kürzlich beschriebenen photosynthetischen Spezies *Paulinella longichromatophora* und *Paulinella micropora* (Lhee *et al.* 2017; Kim & Park 2016) zwei längliche, blaugüne Organellen, welche als Chromatophoren bezeichnet werden. Phylogenetische Untersuchungen der kernkodierten 18S rDNA zeigen, dass es sich um drei distinkte Spezies mit einem monophyletischen Ursprung handelt. Zudem zeigen phylogenetische Bäume, welche anhand der 18S und der 16S rDNA sowie weiteren genetischen Markern berechnet wurden, dass die Chromatophoren nur einmal erworben wurden. Nach diesem Ereignis kam es vermutlich zu der Entstehung von zumindest zwei separaten Kladen, von denen eine *P. micropora* und die marine Spezies *P. longichromatophora* und die zweite *P. chromatophora* beinhaltet. Die Chromatophoren von *P. chromatophora* sind ca. 15-20 µm lang und 3,5-4 µm im Durchmesser. Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Ultrastruktur von Chromatophoren zeigt, dass diese zwei Membranen besitzen, welche das Organell von der Wirtszelle abgrenzen und zwischen denen eine bakterielle Zellwand liegt. In der Matrix der Chromatophoren befinden sich konzentrisch angeordnete Thylakoidmembranen, sowie Carboxysomen, welche am Kohlenstoffkonzentrationsmechanismus beteiligt sind (Nowack, 2014). Dabei ähnelt die Morphologie der Chromatophoren eher freilebenden Cyanobakterien als Plastiden, wobei isolierte Chromatophoren außerhalb ihrer Wirtszelle nicht überleben können. Die Chromatophoren werden ausschließlich vertikal vererbt (Hoogenraad 1927). Dabei sind die Teilungszyklen der Wirtszelle und der Chromatophoren stark synchronisiert, sodass jede Zelle genau zwei Chromatophoren besitzt.

Die phylogenetische Analyse des ribosomalen und des carboxysomalen Operons der Amöbe zusammen mit zahlreichen Cyanobakterien und Plastiden hat gezeigt, dass die Chromatophoren von *P. chromatophora* mit der Kladde der *Synechococcus/Prochlorococcus/Cyanobium* Cyanobakterien gruppieren. Diese Gruppe wird auch als  $\alpha$ -Cyanobakterien bezeichnet, während alle Plastiden von  $\beta$ -Cyanobakterien abstammen (Marin *et al.*, 2007; Marin *et al.*, 2005). Später wurde der  $\alpha$ -cyanobakterielle Ursprung der Chromatophoren durch die Analyse diverser Protein-kodierender Gene (Moreira *et al.*, 2007; Yoon *et al.*, 2006) sowie der Genomsequenz der Chromatophoren bestätigt (Nowack *et al.*, 2008). Diese Untersuchungen liefern starke Hinweise auf einen unabhängigen phylogenetischen Ursprung der Chromatophoren und Plastiden und indizieren, dass sich photosynthetisch-aktive Organellen nicht nur einmal, sondern mindestens zweimal während der evolutionären Geschichte entwickelt haben.

### 1.2.1 Genomreduktion in Chromatophoren von *P. chromatophora*

Die Sequenzierung des Genoms der Chromatophoren aus *P. chromatophora* CCAC0185 zeigte, dass es 1,02 Mb groß ist und 867 Proteinen-kodierenden Gene enthält (Nowack *et al.*, 2008). Damit ist es um ca. 1/3 kleiner als das Genom nah verwandter, freilebender  $\alpha$ -Cyanobakterien wie *Synechococcus* sp. WH5701 (3,28 Mbp und 3185 Protein-kodierenden Gene (Coutinho *et al.*, 2016)). Diese Genomreduktion führte zum Verlust vieler physiologischer/metabolischer Funktionen, welche typischerweise in einem Cyanobakterium zu finden sind. So wurden Gene verloren, welche für die Biosynthesewege vieler AS, wie Glutaminsäure, Arginin, Histidin, Tyrosin und Methionin sowie verschiedener Kofaktoren, wie NAD<sup>+</sup>, Riboflavin, Thiamin und Biotin benötigt werden. Zudem kam es zum Verlust aller Protein-kodierender Gene, welche für den Citratzyklus und somit die Herstellung vieler wichtiger zellulärer Bausteine benötigt werden. Trotzdem scheint das Chromatophor deutlich autonomer zu sein als Plastiden, deren Genome um das ca. zehnfache kleiner sind als das des Chromatophoren. So besitzt das Chromatophor immer noch alle essentiellen Gene, welche für den Lichtsammelkomplex, sowie die Photosysteme I und II (mit der Ausnahme von PsaE und PsaK, siehe unten) benötigt werden. Außerdem werden Proteine kodiert, welche für die Biosynthese einiger AS, Fettsäuren und anderer Moleküle benötigt werden und deren Herstellung einen Vorteil für die Wirtszelle darstellen könnte (Nowack, 2014; Nowack *et al.*, 2008).

Um herauszufinden, ob neben dem Verlust Chromatophoren-kodierter Gene, auch der EGT eine Rolle bei der Reduktion des Chromatophoren-Genoms spielt, ähnlich dem Fall in Plastiden, wurde eine cDNA Bibliothek generiert und sequenziert (Nowack *et al.*, 2011; Nowack *et al.*, 2016). Dabei wurde eine axenische Kultur für die Untersuchung verwendet um eine gezielte Suche nach bakteriellen Genen im *Paulinella*-Transkriptom zu ermöglichen. Mithilfe der phylogenetischen Analyse von Proteinen, welche durch die nuklearen Transkripte kodiert werden, konnten 229 Gene mit bakteriellem Ursprung ermittelt werden, welche aus der Duplikation/Expansion von 150 unabhängig erworbenen, bakteriellen Genen resultierten. Für 58 dieser Proteine konnte ein  $\alpha$ -cyanobakterieller Ursprung bestimmt werden. Diese Proteine stammen vermutlich vom Chromatophor und könnten endosymbiotische Gentransfere repräsentieren, obwohl die Möglichkeit eines horizontalen Gentransfers (HGT) von anderen nahverwandten cyanobakteriellen Spezies nicht ausgeschlossen werden kann. Die meisten dieser EGT-Proteine kodieren für kurze Proteine, welche eine Rolle in der Photosynthese oder der Lichtanpassung haben und weisen somit eine klare Chromatophoren-verwandte Funktion auf, was einen Hinweis auf den potentiellen Import dieser Proteine in die Chromatophoren liefert. Unter ihnen befinden sich auch mehrere Kopien der beiden kleinen Untereinheiten des Photosystems I, PsaE und PsaK. Beides sind Proteine mit niedrigem molekularen

Gewicht und die einzigen Proteine der Photosysteme I und II (PSI und II), welche nicht im Chromatophoren kodiert sind.

Die verbliebenen 171 Gene mit bakteriellem Ursprung im Genom von *P. chromatophora* wurden vermutlich durch horizontalen Gentransfer erworben. Die Lokalisation dieser Gene im Nukleus der Wirtszelle wurde durch das Vorhandensein einer sogenannten *spliced leader* (SL) Sequenz am 5' Ende der mRNA oder der Präsenz von Introns bestätigt. Darunter befinden sich viele Proteine, welche spezifisch Lücken in Chromatophoren-kodierten metabolischen Biosynthesewegen füllen. Beispiele dafür sind die O-Acetyltransferase CysE, welche an der Synthese von Cystein beteiligt ist oder die DNA-Ligase LigA, die die Verknüpfung von DNA-Fragmenten während der DNA-Replikation katalysiert. Andere Proteine sind an der Zellwandbiosynthese und der Prozessierung genetischer Information beteiligt. Zudem repräsentieren einige bakterielle Proteine potentielle Transporter, welche an dem Austausch von Metaboliten zwischen der Wirtszelle und dem Chromatophor beteiligt sein könnten. Somit könnten diese Proteine mit bakteriellem Ursprung an der Integration der Chromatophoren in die Wirtszelle beteiligt gewesen sein, indem sie dem Wirt Mechanismen zur Kontrolle des bakteriellen Endosymbionten liefern (Nowack *et al.*, 2016).

### 1.2.2 Import Wirts-kodierter Proteine in die Chromatophoren von *P. chromatophora*

Die Rekonstruktion des Metabolismus der Wirtszelle und des Chromatophoren mithilfe der Transkriptom- und Genomdaten zeigte, dass das Chromatophor viele Gene, die auf dem Genom des  $\alpha$ -cyanobakteriellen Vorgängers kodiert waren, verloren hat. Dabei fällt auf, dass der Wirt und das Chromatophor oftmals für komplementäre Funktionen kodieren. Beispiele hierfür sind die Biosynthesewege der AS Serin und Methionin. Während alle Proteine, die für die Synthese der beiden AS benötigt werden auf dem Genom der Wirtszelle kodiert sind, fehlen sie vollkommen im Genom des Chromatophoren (Abbildung 1.2-1 A). Andere Beispiele, wie die Biosynthese von Arginin, zeigen ein sich stark ergänzendes Muster an kodierten Proteinen (Abbildung 1.2-1 B). So fehlen der Wirtszelle die Gene für die Proteine, die den vierten und sechsten Schritt der Arginin-Biosynthese katalysieren, während auf dem Chromatophor nur diese beiden Proteine des Biosyntheseweges kodiert sind. Auch Enzyme, welche an der Prozessierung genetischer Information beteiligt sind, wie die Ligase A, zeigen ein komplementäres Muster (Abbildung 1.2-1 C). So fehlt das korrespondierende Gen auf dem Chromatophoren-Genom, während es im Wirt kodiert ist (Nowack *et al.*, 2016).



Diese Situation deutet auf einen starken Austausch der beiden Interaktionspartner hin. Dabei besteht eine Möglichkeit im Austausch von Metaboliten zwischen dem Chromatophor und der Wirtszelle. Dafür würde ein effizientes System an Metabolitransportern erforderlich sein. Jedoch hat die Untersuchung des Chromatophorengenoms gezeigt, dass viele Transporter, die in dem  $\alpha$ -cyanobakteriellen Vorgänger kodiert waren, während der Evolution des Chromatophoren verloren wurden (Nowack *et al.*, 2008). Aus diesem Grund müssten Wirts-kodierte Transporter, wie z.B. die bereits in Kapitel 1.2.1 beschriebenen bakteriellen Proteine, diese Funktionen übernehmen.

10

Proteinen in das ER verantwortlich ist. Zudem konnte durch die bioinformatische Analyse der Gensequenzen keine gemeinsame Präsequenz, welche als mögliches Transitpeptid dienen könnte, in den EGT-Genen identifiziert werden (Nowack *et al.*, 2011). Der genaue Importmechanismus Wirtskodierter Gene in die Chromatophoren von *P. chromatophora* bedarf also weiterer Untersuchungen und bleibt bis heute nicht geklärt.

### 1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Der komplementäre Satz relevanter Gene in Wirtszelle und Chromatophoren von *P. chromatophora* deutet auf einen möglichen Import Wirtskodierter Proteine in die Organellen. In früheren Untersuchungen konnte bereits der Import der kleinen Photosystem I Untereinheiten PsuE und PsuK gezeigt werden (Nowack & Grossman, 2012). Beide Proteine sind, wie das Chromatophor, von  $\alpha$ -cyanobakteriellem Ursprung, werden jedoch im Nukleus der Wirtszelle kodiert und posttranslational in die Chromatophoren importiert. Sowohl PsuE als auch PsuK sind Proteine mit niedrigem molekularen Gewicht und weisen im Vergleich zu ihren cyanobakteriellen Homologen keine Verlängerung der Sequenz auf, welche als potentiell Chromatophoren-Transitpeptid dienen und den Import in die Chromatophoren regulieren könnte.

Ob neben diesen beiden kurzen EGT-Proteinen weitere Wirtskodierte Proteine in die Chromatophoren importiert werden, ist bisher nicht bekannt und soll in dieser Arbeit untersucht werden. Dafür sollen Chromatophoren mit hoher Reinheit isoliert und das Proteom mittels Massenspektrometrie (MS) untersucht werden. Durch die Berechnung der Anreicherung im Vergleich zu MS-identifizierten Proteinen aus dem vollständigen Zelllysate sollen potentielle Wirtskodierte Importkandidaten identifiziert werden. Diese sollen auf ihre physiologische Funktion sowie den phylogenetischen Ursprung untersucht werden. Anschließend sollen die Importkandidaten auf gemeinsame Sequenzeigenschaften überprüft werden, um ein potentiell Chromatophoren Transitpeptid zu identifizieren. Zudem soll anhand der generierten Daten eine *in silico* Methode entwickelt werden, welche die Vorhersage weiterer Importkandidaten ermöglichen könnte. Da bisher kein Transformationsprotokoll für *P. chromatophora* existiert, welches die Charakterisierung der Lokalisation der Importkandidaten im Wirtsorganismus ermöglicht, soll zudem die Analyse der Lokalisation der Importkandidaten im heterologen System der Pflanzenzelle erfolgen. Dies könnte erste Hinweise auf einen potentiellen Importmechanismus der Proteine in die Chromatophoren von *P. chromatophora* liefern.

Die Untersuchungen in dieser Arbeit sollen zum Verständnis der Beteiligung Wirtskodierter Proteine an der Reorganisation des Proteoms eines evolutionär jungen Organells beitragen.

## 2 Ergebnisse

### 2.1 Isolation der Chromatophoren aus *P. chromatophora*

Für die Untersuchung der Proteomzusammensetzung von Chromatophoren wurden diese aus *P. chromatophora* CCAC0185 isoliert. Dafür wurden die Zellen zunächst mithilfe von Druck aufgeschlossen und die intakten Chromatophoren über einen diskontinuierlichen Percollgradienten von dem Rest der Zellbestandteile getrennt. Im nächsten Schritt sollten Wirts-kodierte Proteine, welche von außen an dem Chromatophor haften und potentielle Kontaminanten darstellen könnten, durch die Behandlung mit einer Protease entfernt werden. Dafür wurden die Proteasen Proteinase K und Thermolysin verwendet, welche bereits erfolgreich zur Degradation externer Proteine bei isolierten Plastiden und Mitochondrien eingesetzt wurden (Cline *et al.*, 1984; Yu *et al.*, 2009). Um die Aktivität der Proteasen sowie verschiedene Proteasemengen für die eingesetzte Anzahl an Chromatophoren zu testen, wurde BSA zu den isolierten Chromatophoren hinzugegeben und die Chromatophoren für 30 min auf Eis mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen Protease inkubiert. Wie in Abbildung 2.1-1 A zu sehen, konnte BSA alleine sowohl mit Proteinase K als auch mit Thermolysin verdaut werden. Die Aktivität der Proteinase K scheint dabei so stark zu sein, dass die Protease auch sich selbst während der Inkubation auf Eis verdaut. Wurden Chromatophoren hinzugegeben, konnte jedoch kein Verdau von BSA durch die Proteasen festgestellt werden. Auch nach der Inkubation der Reaktionen mit verschiedenen Konzentrationen der Proteasen, bei verschiedenen Temperaturen (auf Eis, 4°C, 16°C, RT) oder mit anderen zugegebenen Proteinen (z.B. Glucose-Oxidase) fand kein Verdau der extern zugegeben Proteine statt (Ergebnisse nicht gezeigt). Aus diesem Grund wurde versucht externe Proteine mit EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin zu biotinylieren. Dabei soll laut Hersteller die negative Ladung des Moleküls dessen Aufnahme in die Zelle verhindern und die selektive Markierung von Oberflächenproteinen ermöglichen. Nach der Inkubation der isolierten Chromatophoren mit EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin für 30 min auf Eis wurden die Chromatophoren über einen erneuten Percoll-Gradienten aufgereinigt um das nicht-gebundene Biotin zu entfernen und die Proteine extrahiert. Wie in Abbildung 2.1-1 B zu sehen, konnten keine biotinylierten Proteine in unbehandelten Chromatophoren detektiert werden. Die Markierung der Chromatophoren mit externem EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin führte hingegen zu der Biotinylierung diverser Proteine, welche anschließend mittels Massenspektrometrie untersucht wurden. Dabei konnte jedoch gezeigt werden, dass auch Proteine, welche in der Matrix der Chromatophoren lokalisieren (z.B. Phycobiliproteine) mit Biotin markiert wurden.

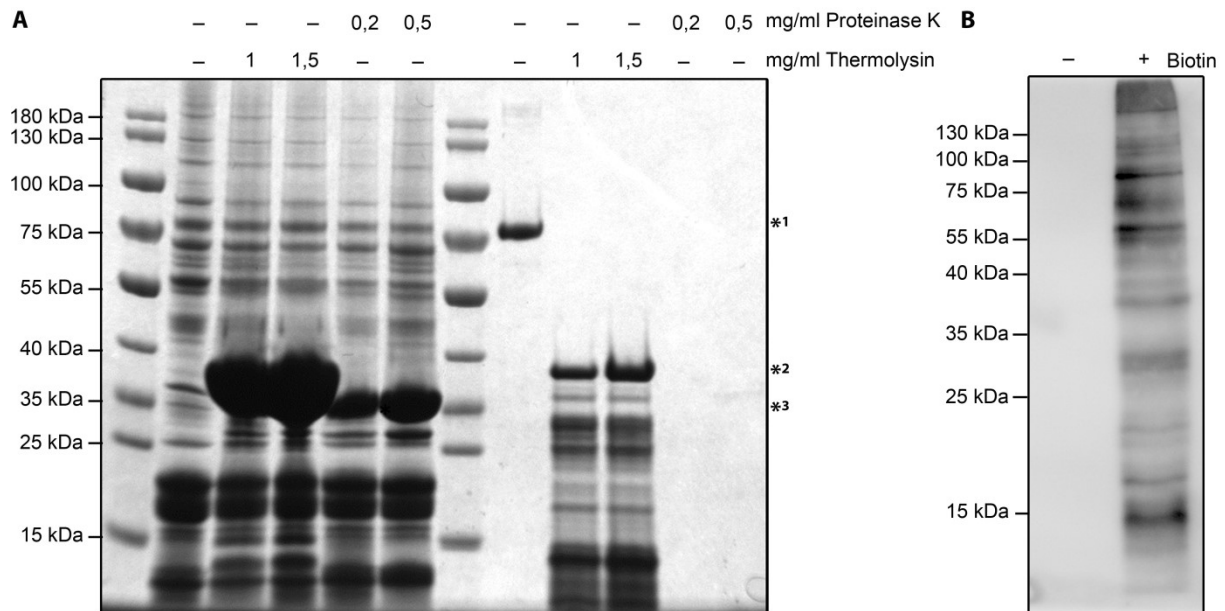


**Abbildung 2.1-1 Extrazelluläre Behandlung isolierter Chromatophoren.** (A) Protease-Verdau von isolierten Chromatophoren. 1 µg BSA wurden zu  $3 \cdot 10^6$  isolierten Chromatophoren hinzugegeben und diese mit verschiedenen Konzentrationen an Proteinase K und Thermolysin für 30 min auf Eis behandelt. Die Proteine wurden mithilfe von Trichloressigsäure extrahiert, auf einem SDS-Gel analysiert und mithilfe von Coomassie-Brillant-Blau visualisiert (Spuren 2-6). Als Kontrolle wurden die gleichen Konzentrationen an Proteinase K und Thermolysin zu 1 µg BSA hinzugegeben (Spuren 8-12). \*1: BSA, \*2: Thermolysin (34,6 kDa); \*3: Proteinase K (28,9 kDa). (B) Biotin-Markierung von isolierten Chromatophoren.  $3 \cdot 10^6$  isolierte Chromatophoren wurden mit 2 mM EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin für 30 min auf Eis inkubiert, die Chromatophoren über einen Percoll-Gradienten aufgereinigt und die Proteine mithilfe von Trichloressigsäure extrahiert. 5 µg der extrahierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE und Westernblot analysiert und mit Streptavidin-HRP visualisiert. Als Kontrolle wurden isolierte Chromatophoren verwendet.

Da beide Ansätze unzufriedenstellende Ergebnisse lieferten, wurde die nachfolgende massenspektrometrische Untersuchung an nicht-behandelten Chromatophoren durchgeführt.

## 2.2 Das Proteomdatenset von *P. chromatophora*

Für die MS-Untersuchung der Chromatophoren wurden diese aus *P. chromatophora* (Abbildung 2.2-1 A) isoliert und die isolierten Chromatophoren (Abbildung 2.2-1 B) über einen zweiten Percoll-Gradienten erneut aufgereinigt, um eine höhere Reinheit der Fraktion zu erreichen. Proteine, die aus den isolierten Chromatophoren sowie aus ganzen Zellen mithilfe der Trichloressigsäure-Methode extrahiert wurden, zeigten unterschiedliche Bandenmuster nach SDS-PAGE und Silberfärbung des Gels. Zudem konnte eine Anreicherung der Proteine aus den isolierten Chromatophoren im Vergleich zum Zelllysate gezeigt werden. Ein Beispiel dafür sind die zwei Banden, die bei ca. 17 kDa laufen und die Chromatophoren-kodierten Phycobiliproteine repräsentieren (Abbildung 2.2-1 C).

Proteine aus drei unabhängigen Chromatophoren Isolationen sowie drei Gesamtzelllysaten wurden mithilfe der MS untersucht. Um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu vergleichen wurden die normalisierten Ionenintensitäten, die während der MS-Analyse detektiert wurden in einem Streudiagramm aufgetragen und die sechs Fraktionen miteinander verglichen. Vergleicht man die Chromatophoren-Proteine, sowie die Proteine aus dem Zelllysate jeweils untereinander, so konnte ein

reproduzierbares Muster an Ionenintensitäten, mit Korrelationskoeffizienten von 0,904-0,957 für die Lysate und 0,922-0,932 für die Chromatophorenfraktionen, erzielt werden (Abbildung 2.2-1 D).

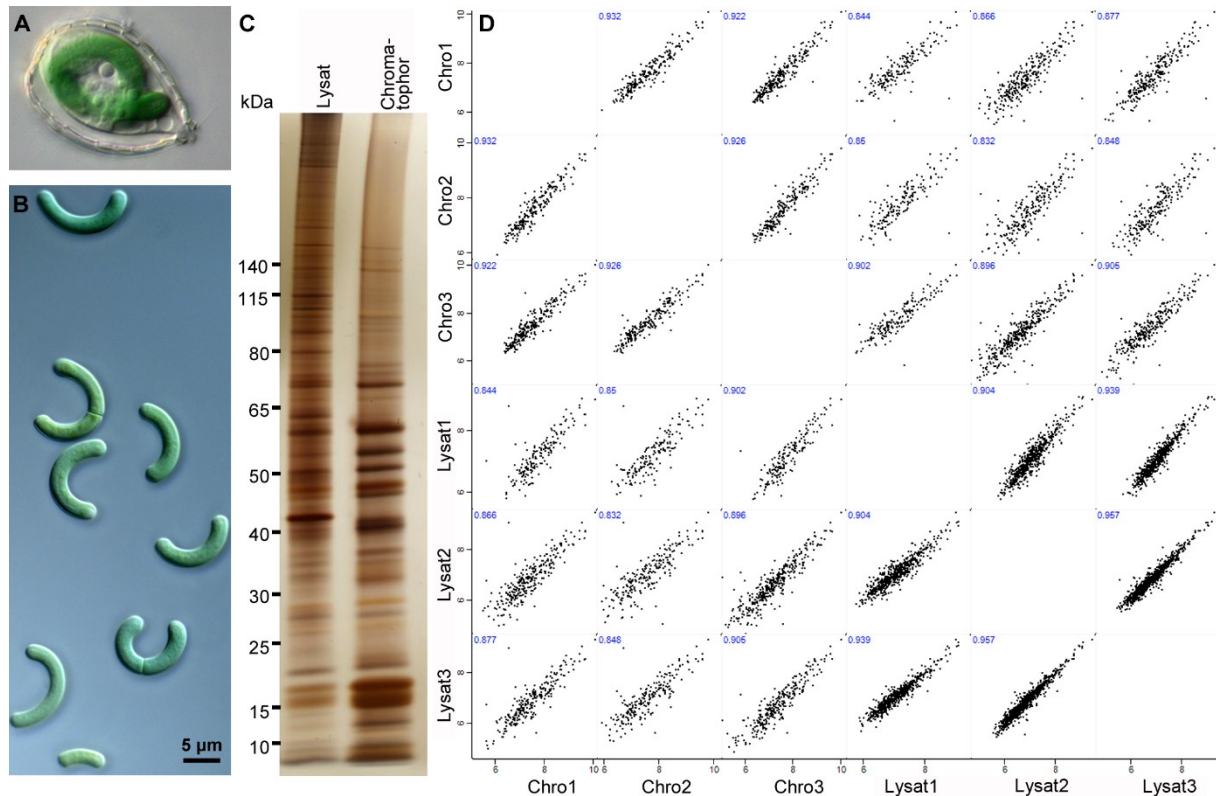


**Abbildung 2.2-1 Reinheit der isolierten Chromatophoren.** Lichtmikroskopische Aufnahme (Differentialinterferenzkontrast) von (A) einer intakten *P. chromatophora* Zelle und (B) isolierten Chromatophoren. (C) SDS-PAGE von Proteinen, extrahiert aus dem gesamten Zelllysate sowie aus isolierten Chromatophoren. 1 µg Protein wurden mithilfe von 4-12%-igen Polyacrylamidgelen aufgetrennt und anschließend mit Silbernitrat gefärbt. (D) Multistreudiagramm von normalisierten Ionenintensitäten, welche während der MS-Analyse von drei isolierten Chromatophoren-Replikaten (Chro1-3) und drei Lysat-Replikaten (Lysat1-3) detektiert wurden. Blaue Zahlen zeigen den Rangkorrelationskoeffizienten an.

**Tabelle 2.2-1 Übersicht der *P. chromatophora* Proteine, welche in den Lysat- und den Chromatophorenfraktionen durch die Massenspektrometrie identifiziert wurden.**

|                                  | Total       | Lysat      |               |                  | Chromatophor |               |                  |
|----------------------------------|-------------|------------|---------------|------------------|--------------|---------------|------------------|
|                                  |             | Total      | Wirts-kodiert | Chromat.-kodiert | Total        | Wirts-kodiert | Chromat.-kodiert |
| Total                            | 2452        | 2358       | 1943          | 415              | 641          | 219           | 422              |
| ≥2Peptide identifiziert          | 1938        | 1901       | 1518          | 383              | 531          | 141           | 390              |
| Identifiziert in ≥2 Proben       | 1031        | 966        | 732           | 234              | 283          | 45            | 238              |
| <b>Kombination beider Filter</b> | <b>1025</b> | <b>960</b> | <b>726</b>    | <b>234</b>       | <b>283</b>   | <b>45</b>     | <b>238</b>       |

Insgesamt konnten mithilfe der MS 2452 verschiedene Proteine identifiziert werden, von denen 2358 Proteine im Gesamtzelllysate und 641 Proteine in isolierten Chromatophoren gefunden wurden (Abbildung 2.2-2 und Tabelle 2.2-1). 960 Proteine aus dem Lysat und 283 Proteine aus dem

Chromatophor wurde mit mindestens zwei Peptiden und in mindestens zwei von drei Replikaten identifiziert und werden im Folgenden als Proteine, welche mit hoher Konfidenz (HK) identifiziert wurden, betrachtet. Die übrigen Proteine werden im Folgenden als niedrige Konfidenz Proteine (NK) bezeichnet.

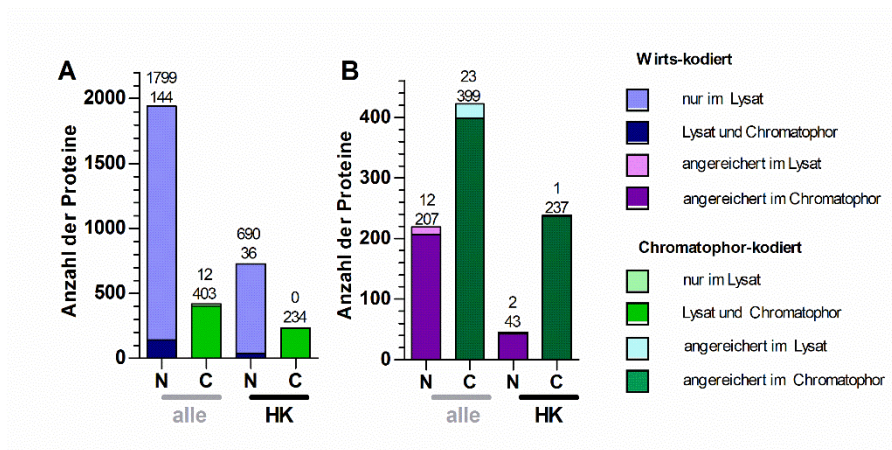


**Abbildung 2.2-2 Übersicht über die, während der MS-Analyse identifizierten, Proteine.** Anzahl der Proteine, die im (A) Lysat und (B) im Chromatophoren identifiziert wurden. Wirts-kodierte Proteine (N) sind in blauen und violetten Farben dargestellt, Chromatophoren-kodierte Proteine (C) in hell- und dunkelgrünen Farben. Für beide Gruppen sind die Zahlen für alle identifizierten sowie für Proteine, welche mit hoher Konfidenz (HK) identifiziert wurden über den jeweiligen Balken gezeigt. Eine Farbkodierung zeigt die Zahl der Proteine an, welche ausschließlich im Lysat oder in beiden Fraktionen identifiziert wurden und ob die Proteine im Lysat oder im Chromatophoren angereichert sind.

Um die Reinheit der gewonnenen Chromatophorenfraktion zu überprüfen, wurden die Intensitäten für jeweils zwei Markerproteine für das Cytoskelett, das ER, die Mitochondrien sowie Peroxisomen im MS-Datenset untersucht. Wie in Tabelle 2.2-2 zu sehen, konnten alle analysierten Proteine im Zelllysate, jedoch nicht in den isolierten Chromatophoren gefunden werden. Zudem konnten unter den 100 kernkodierten Proteinen, die im Lysat mit den höchsten Ionenintensitäten identifiziert wurden, nur zwei Proteine auch in der Chromatophorenfraktion gefunden werden (Tabelle S1, grün markiert). Bei den beiden Proteinen handelt es sich um eine  $\beta$ -Carboanhydrase (scaffold10708-m.75678) und Polyubiquitin (scaffold29708-m.137851). Während die Carboanhydrase eine um mehr als 200 Mal geringere Ionenintensität in Chromatophoren verglichen mit dem Zelllysate zeigte, war Polyubiquitin um den Faktor 4,5 angereichert. Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass die isolierten Chromatophoren eine sehr hohe Reinheit ohne nennenswerte Kontamination mit Proteinen aus anderen Zellkompartimenten aufweisen.

**Tabelle 2.2-2 Identifikation von Markerproteinen für verschiedene Kompartimente in Zelllysate- und Chromatophorenfraktionen.** Die Tabelle zeigt durchschnittliche Ionenintensitäten sowie die Standardabweichung ( $n=3$ ) von jeweils zwei Markerproteinen für das Cytoskelett, das endoplasmatische Retikulum (ER), das Mitochondrium und das Peroxisom im Lysat ( $Int_L$ ) und Chromatophor ( $Int_C$ ). Das Targeting zeigt entweder die mittels TargetP ermittelte Targeting-Vorhersage („M“: Mitochondrium, „SP“: Signalpeptid, „RC“: Klassifizierung der Zuverlässigkeit der Vorhersagen (engl. für:

*reliability class*) von 1 (zuverlässige Vorhersage) bis 5 (schlechte Vorhersage)) oder die Präsenz eines Motivs für das Peroxisomen Targeting Signal der Klasse 1 (PTS1: AKL oder SKL) im C-Terminus des Proteins.

| Kompartiment         | Name                           | Annotation                                   | Targeting    | Int <sub>L</sub>          | Int <sub>C</sub> |
|----------------------|--------------------------------|----------------------------------------------|--------------|---------------------------|------------------|
| <b>Cytoskelett</b>   | scaffold11503-size1155 m.79251 | Aktin                                        | Andere (RC1) | 1,43E+09±<br>1,53E+08     | 0                |
|                      | scaffold7465-size1536 m.59800  | β-Tubulin                                    | Andere (RC1) | 3,06E+07±<br>5,09E+06     | 0                |
| <b>ER</b>            | scaffold3144-size2267 m.33051  | HSP70                                        | SP (RC1)     | 1,15E+08<br>±<br>3,63E+06 | 0                |
|                      | scaffold6341-size1678 m.53586  | Calreticulin                                 | SP (RC2)     | 5,57E+07±<br>1,36E+07     | 0                |
| <b>Mitochondrium</b> | scaffold2046-size2984 m.24480  | mtHSP70                                      | M (RC1)      | 7,09E+07±<br>5,98E+06     | 0                |
|                      | scaffold2113-size2644 m.25049  | ATPase β-Untereinheit                        | M (RC2)      | 9,42E+07±<br>1,55E+07     | 0                |
| <b>Peroxisom</b>     | scaffold12158-size1105 m.82069 | PeroxisomenHydratase-Dehydrogenase-Epimerase | AKL          | 2,91E+06±<br>3,45E+05     | 0                |
|                      | scaffold8851-size1387 m.66895  | Peroxisomen 2,4-dienoyl-CoA Reduktase        | SKL          | 6,55E+05±<br>1,02E+05     | 0                |

## 2.3 Chromatophoren-kodierte Proteine

Von den 641 Proteinen, die in isolierten Chromatophoren identifiziert wurden, handelte es sich bei 422 um Chromatophoren-kodierte Proteine. Dies entspricht einer Abdeckung von 49% der insgesamt 857 Chromatophoren-kodierten Proteine. Von diesen 422 Chromatophoren-kodierten Proteinen, konnten 238 Proteine mit hoher Konfidenz identifiziert werden, was 27% der Chromatophoren-kodierten Proteine abdeckt. Betrachtet man die 20 Proteine, für die die höchste Ionenintensität in der Chromatophorenfraktion detektiert wurden, findet man Untereinheiten des cyanobakteriellen Lichtsammelkomplexes (z.B. Phycocyanin, Allophycocyanin), der Carboxysomen (Carboxysomen-Hüllenprotein), der Photosynthesekomplexe (PsaC, PsaD, PsaF, und PsbO), die F-Typ ATPase, Enzyme welche in die Kohlenstofffixierung über den Calvin Zyklus involviert sind (z.B. kleine Untereinheit der Ribulose-1,5-bisphosphat-Carboxylase/-Oxygenase (RuBisCO)), sowie die molekularen Chaperone GroEL und DnaK (Tabelle S1, gelb markiert). Betrachtet man die Anreicherung der identifizierten

Proteine, indem man die Ionenintensität im Zelllysats von der im Chromatophor subtrahiert ( $\text{Int}_c - \text{Int}_l > 0$ ) so zeigt sich, dass 399 von 422 (237 von 238 HK Proteine) Proteinen im Chromatophor, im Vergleich zum Zelllysats, angereichert sind (Abbildung 2.2-2 B). Die 23 Chromatophoren-kodierten Proteine, welche in der Chromatophorenfraktion abgereichert sind ( $\text{Int}_c - \text{Int}_l < 0$ ) können vermutlich auf die semiquantitative Natur der MS zurückgeführt werden und repräsentieren hochwahrscheinlich nicht den Export von Proteinen aus den Chromatophoren. Alle abgereicherten Proteine werden nur in sehr geringen Mengen, welche 3,6–0,1% der durchschnittlichen Menge der im Chromatophor identifizierten Proteine entspricht, gefunden. In diesem Bereich spielt der Zufall vermutlich eine große Rolle. Zudem weisen viele dieser Proteine, z.B. das 50S ribosomales Protein und ein Plastocyanin Vorläufer, eine Funktion auf, die im eindeutigen Zusammenhang mit dem Chromatophor steht.

## 2.4 Import von zwei Klassen von Proteinen in die Chromatophoren von *P. chromatophora*

Die übrigen 219 der 422 Proteinen (45 von 283 HK Proteinen), welche im Chromatophoren gefunden werden, repräsentieren Wirts-kodierte Proteine. 207 von den 219 Proteinen wiesen eine höhere Ionenintensität im Chromatophor als im Zelllysats auf und waren somit in der Chromatophorenfraktion angereichert. Aus diesem Grund werden sie im Weiteren, im Gegensatz zu den 12 abgereicherten Proteinen, als potentielle Importkandidaten betrachtet (Abbildung 2.2-2 B). Für die Proteine welche mit hoher Konfidenz identifiziert wurden, wiesen 43 der 45 Proteine eine höhere durchschnittliche Ionenintensität im Chromatophor als im Zelllysats auf. Diese werden daher als HK Importkandidaten betrachtet.

Bei näherer Untersuchung der Importkandidaten konnte festgestellt werden, dass die Proteine in zwei Klassen unterteilt werden können. Betrachtet man nur die 145 Proteine, für die die Vollängensequenz des Transkripts vorhanden ist, besteht die erste Gruppe aus 85 kurzen Proteinen, mit 10 HK Importkandidaten, mit einer Länge von weniger als 90 AS. Die zweite Gruppe besteht aus 60 Proteinen, mit 24 HK Importkandidaten und zeigt eine größere Variabilität der Länge, wobei alle Proteine mehr als 268 AS lang sind. (Abbildung 2.4-1). Das Vorhandensein der Vollängen-mRNA wurde entweder durch die Anwesenheit einer sogenannten *spliced leader* Sequenz am 5' Ende der mRNA (Nowack *et al.*, 2016) oder eines vorgeschalteten Stopcodons im gleichen Leseraster wie das Start-Methionin bestätigt. Diese zwei Gruppen von Proteinen werden im Folgenden als kurze bzw. lange Importkandidaten bezeichnet.

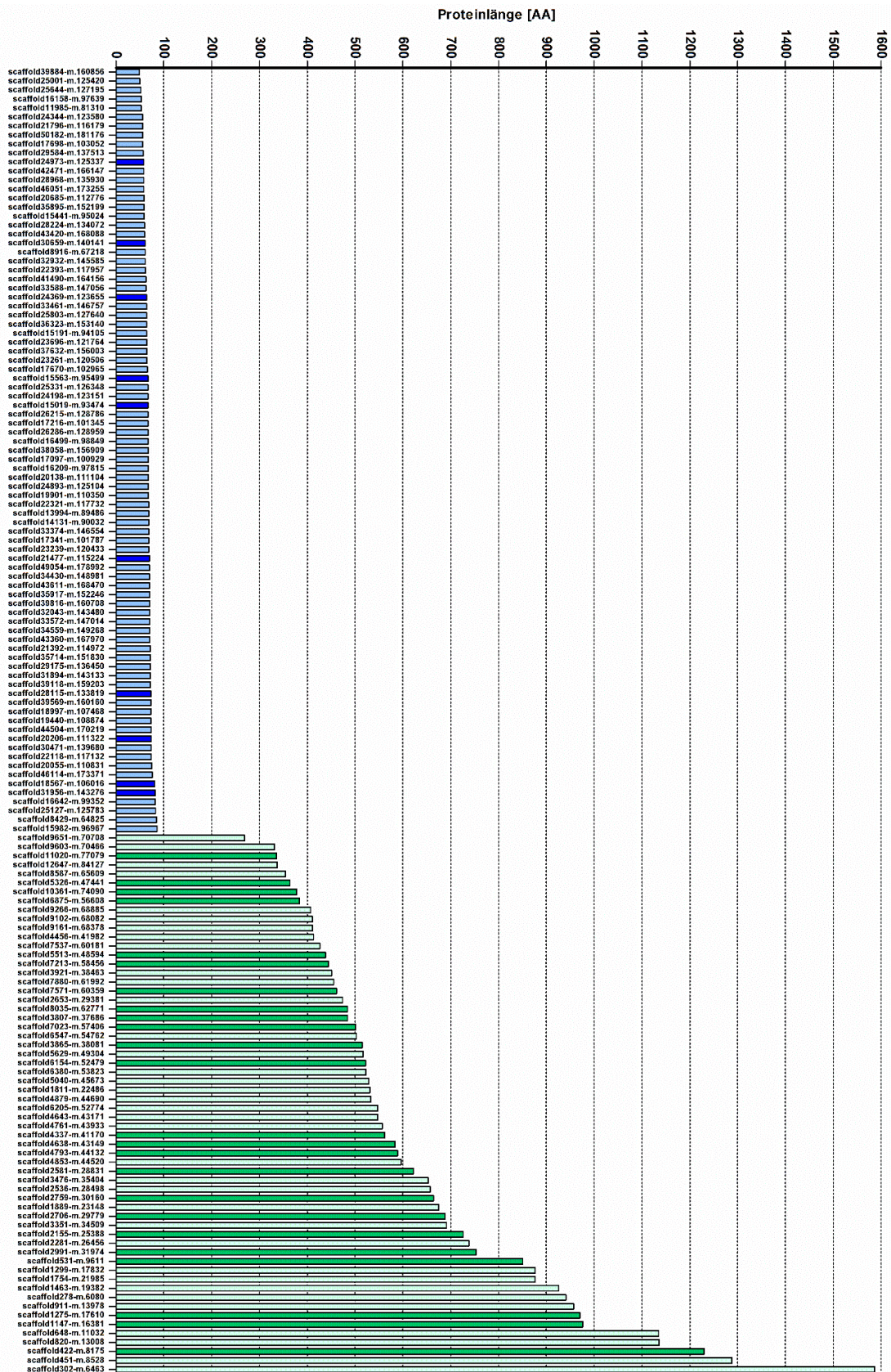


**Abbildung 2.4-1 Verteilung der Proteinlängen von identifizierten Importkandidaten.** Das Balkendiagramm zeigt die Länge der kernkodierten Proteine, welche während der MS-Analyse als Importkandidaten identifiziert wurden. Kurze Importkandidaten (<90 AS) sind in blau, lange Importkandidaten (>268 AS) in grün dargestellt. Proteine, welche mit hoher Konfidenz identifiziert wurden sind in dunkelblau oder dunkelgrün gezeigt.

## 2.5 Lange importierte Proteine

Die Untersuchung der langen Importkandidaten zeigt, dass 18 der Proteine eine bekannte Funktion haben (Tabelle S1, blau markiert). Die meisten dieser Proteine spielen eine Rolle im primären Metabolismus der Zelle und sind zum Beispiel am AS- und Kohlenhydrat-Metabolismus beteiligt. Bei näherer Betrachtung dieser Proteine konnte festgestellt werden, dass viele der Importkandidaten spezifisch Lücken in Chromatophoren-kodierten Biosynthesewegen füllen (Abbildung 2.5-1).

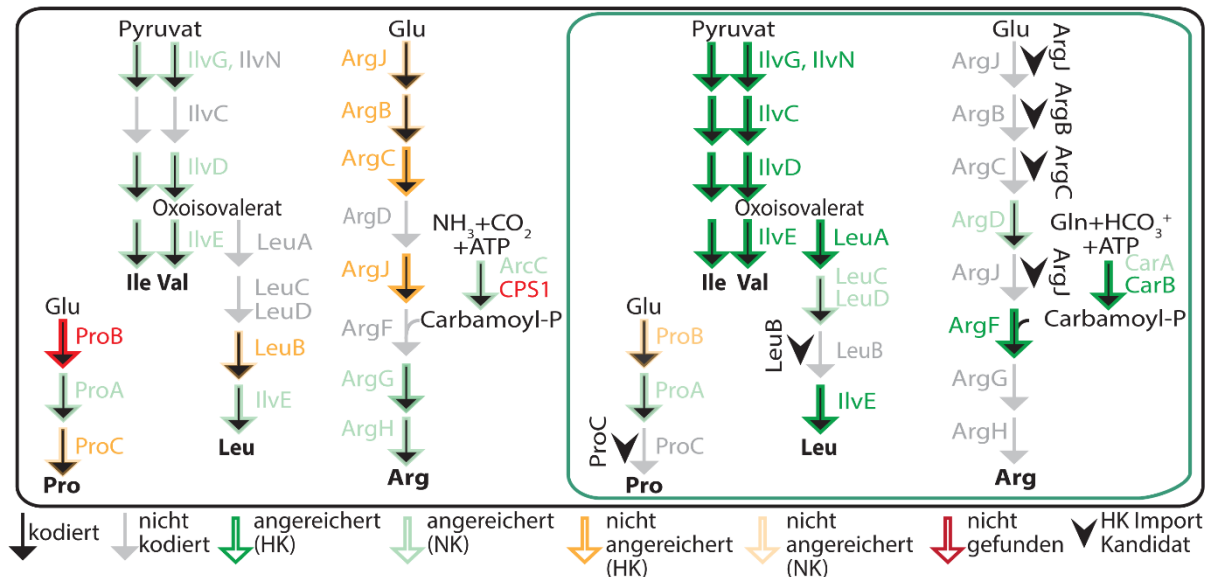


**Abbildung 2.5-1 Lange Importkandidaten füllen Lücken in Chromatophoren-kodierten metabolischen Biosynthesewegen.** Dargestellt sind Chromatophoren-kodierte (innerhalb des grünen Vierecks) und Wirts-kodierte Gene für die Biosynthese der AS Prolin, Leucin und Arginin. Schwarze Pfeile und Schrift zeigen Gene, welche auf dem Chromatophoren-Genom kodiert sind oder in den nuklearen Transkriptom-Daten gefunden werden, während graue Pfeile und Schrift das Fehlen der Gene anzeigen. Farbige Pfeile, welche die schwarzen Pfeile umranden, sowie die farbige Schrift zeigen an, ob die entsprechenden Genprodukte während der MS-Analyse im Chromatophoren (innerhalb des grünen Vierecks) oder im Lysat angereichert (grün), nicht angereichert (orange) oder nicht gefunden wurden (rot). Dunkle Farben repräsentieren Proteine, die mit hoher Konfidenz (HK) identifiziert wurden, während blassere Farben Proteine, die mit niedriger Konfidenz (NK) identifiziert wurde, anzeigen. Schwarze Pfeilspitzen zeigen HK Importkandidaten.

Beispiele für Importkandidaten sind die Pyrroline-5-Carboxylat Reduktase (ProC) und die 3-Isopropylmalat Dehydrogenase (LeuB). Beide Enzyme katalysieren die jeweils einzige fehlende enzymatische Reaktion im Prolin- bzw. Leucin-Biosyntheseweg, für die es keine Chromatophoren-kodierten Enzyme gibt. Somit würde der Import dieser zwei Proteine zu einer Vervollständigung der beiden Biosynthesewege führen. Ein weiteres Beispiel sind drei Enzyme, die an der Biosynthese der AS Arginin beteiligt sind, welche durch ein komplementäres Patchwork von Wirts- und Chromatophoren-Genen kodiert wird. Enzyme, welche die ersten drei sowie den fünften Schritt der Arginin-Biosynthese katalysieren, also die bifunktionale Glutamat/Ornithin Acetyltransferase (ArgJ), die N-Acetylglutamat Kinase (ArgB) und die N-Acetyl-Gamma-Glutamyl-Phosphat Reduktase (ArgC), wurden unter den HK langen Importkandidaten gefunden. Die Enzyme ArgD und ArgF, welche den jeweils vierten und sechsten Schritt katalysieren, sowie die beiden Enzyme CarA und CarB, die an der Synthese von

Carbamoyl-Phosphat beteiligt sind, sind Chromatophoren-kodiert und wurden während der MS Analyse in der Chromatophorenfraktion identifiziert. Im Gegensatz dazu wurden die beiden Wirts-kodierten Enzyme ArgG und ArgH, welche die zwei letzten Schritte der Arginin-Biosynthese katalysieren ausschließlich im Lysat gefunden. Beide Enzyme tragen ein mTP und zeigen daher vermutlich eine mitochondriale Lokalisation.

Zusammengenommen zeigen die Ergebnisse, dass der Import von Wirts-kodierten Proteinen zur Vervollständigung von Chromatophoren-lokalisierte Biosynthesewegen führt.

### 2.5.1 Identifikation eines N-terminalen Importsignals

Alignments der 24 HK langen Importkandidaten mit orthologen Sequenzen aus anderen Organismen führten zu der Identifikation einer verlängerten N-terminalen Sequenz in den *P. chromatophora* Proteinen, welche nicht in anderen Organismen gefunden wird (Abbildung 2.5-2 A). Der Vergleich dieser 24 N-terminalen Bereiche zeigte eine konservierte Proteinsequenz, welche in der Länge zwischen 97 und 221 AS variiert (Abbildung 2.5-2 B). Da diese im Durchschnitt ca. 200 AS lange Sequenz in allen 24 langen HK Importkandidaten identifiziert wurde, wurde sie als potentiell Chromatophoren-Transitpeptid (crTP) interpretiert. Wie in Abbildung 2.5-2 B zu sehen, zeigen die N-terminalen Sequenzen nur eine insgesamt moderate Gesamtkonservierung. Dabei gibt es jedoch Bereiche mit stark konservierten Motiven, diese sind in Abbildung 2.5-2 B in grau hinterlegt.

Die BlastP Analyse der crTPs gegen die NCBI-Proteindatenbank mit einem E-Wert von  $1.0E-3$  zeigte, dass keine homologen Sequenzen in anderen Organismen bekannt sind. Mit Hilfe von InterProScan wurde keine Zugehörigkeit zu einer Proteinfamilie sowie keine bekannten Domänen oder Gen-Ontologie (GO)-Termini der internationalen Ontologie-Datenbank zugeordnet. Zudem konnten keine bekannten mTPs oder cTPs mittels TargetP (Emanuelsson *et al.*, 2000) vorhergesagt werden. Für die crTPs von scaffold1147-m.16381 (annotiert als ATP-bindendes Überfamilienprotein) und scaffold1147-m.16381 (annotiert als RNA Helikase) konnte jeweils eine Transmembrandomäne mithilfe des Online-Vorhersageprogramms TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) bestimmt werden. Die Nettoladung der crTPs bei pH 7 variiert zwischen +9.0 und -13.7.

21

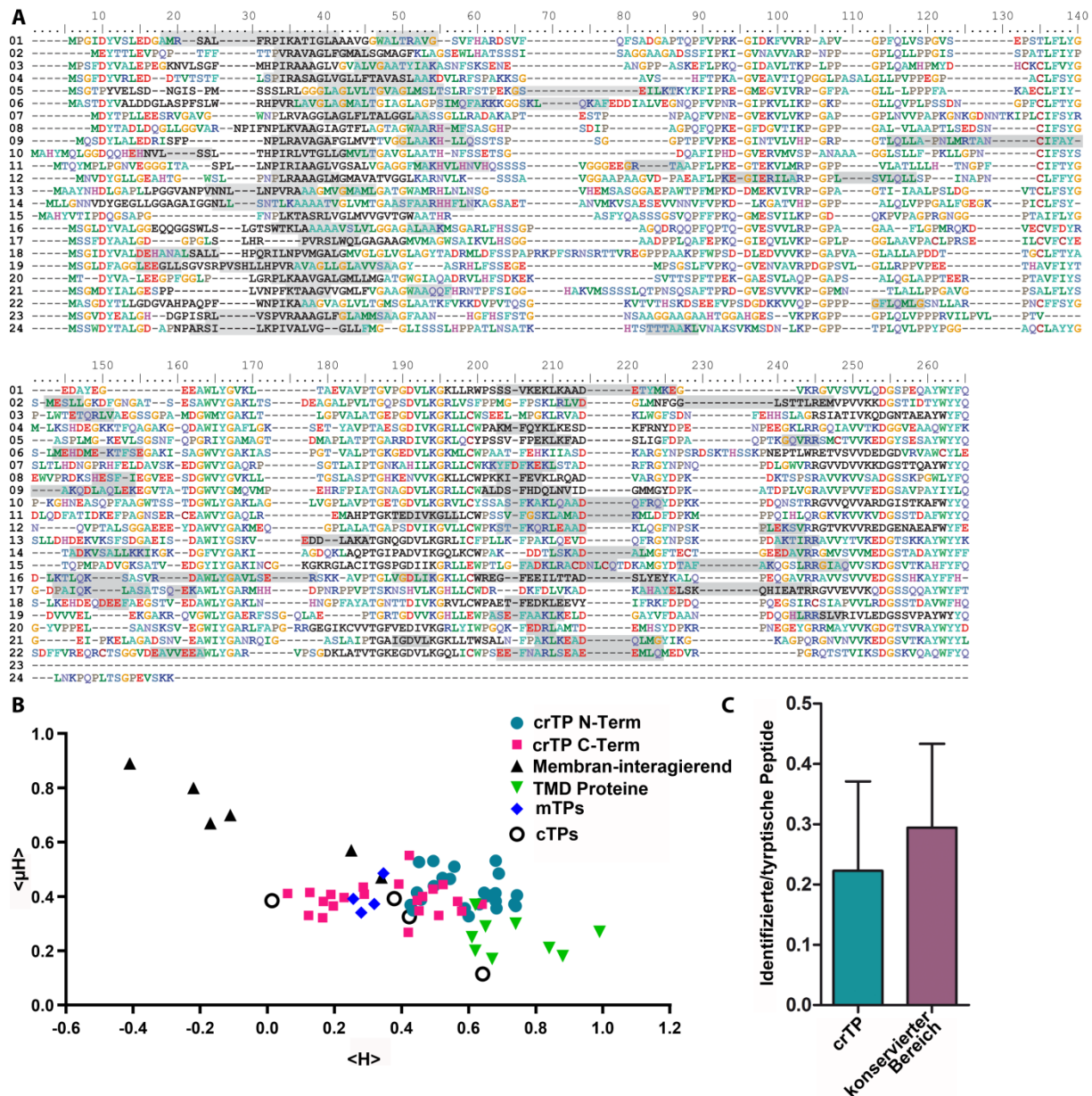


**Abbildung 2.5-3 Physikochemische Eigenschaften der crTPs und die Detektion der crTPs während der MS-Analyse.** (A) Alignment der 24 crTPs der HK Importkandidaten.  $\alpha$ -helikale Konformation wurde mittels NetSurfP vorhergesagt, Sequenzen mit einem Z-Wert  $\geq 0,5$  ( $\alpha$ -Helix-Wahrscheinlichkeit  $> 50\%$ ) sind grau unterlegt. Für die Vorhersage von amphipathischen Helices wurden der N-Terminus (Position 0 bis 68 im Alignment) und der C-Terminus (Position 176 bis Ende des Alignments) mittels HeliQuest auf Helixigenschaften, wie das hydrophobe Moment ( $\langle \mu_H \rangle$ ) und die Hydrophobizität ( $\langle H \rangle$ ), untersucht. Die 18 AS lange Sequenz, für die das höchste  $\langle \mu_H \rangle$  innerhalb der untersuchten Region vorhergesagt wurde, ist mit schwarzen Buchstaben dargestellt. Dabei fällt auf, dass für die vorhergesagten  $\alpha$ -Helices im N-Terminus der Proteine, die Sequenzen mit den höchsten  $\langle \mu_H \rangle$  stark mit der Position der Helices überlappen, während für die  $\alpha$ -Helices im C-Terminus der crTPs, Sequenzen mit dem höchsten  $\langle \mu_H \rangle$  eine höhere Variabilität der Position im Vergleich zu den Helices zeigen. (B) Der Graph zeigt das hydrophobe Moment  $\langle \mu_H \rangle$  und die Hydrophobizität  $\langle H \rangle$  der Sequenzen mit dem höchsten  $\langle \mu_H \rangle$  aus dem N- und dem C-terminalem Bereich der crTPs, welche mittels HeliQuest identifiziert wurden. Als Referenz werden Sequenzen mit dem höchsten  $\langle \mu_H \rangle$  für die mTPs der ATP-Synthase aus *Neurospora tetrasperma* und *Nicotiana sylvestris*, Cytochrom-c-Peroxidase und Citratsynthase aus *Saccharomyces cerevisiae*, wie auch cTPs der kleinen Untereinheit von RuBisCO, Chlorophyll A/B bindenden Proteins, der Ferredoxin-NADP-Reduktase und des Chloroplasten 30S ribosomalen Proteins aus *Arabidopsis thaliana* gezeigt. Außerdem werden Werte für eine repräsentative Auswahl an Membran-interagierenden Proteinen, sowie Proteinen mit Transmembranandomänen (TMD) aus (Eisenberg *et al.*, 1984) entnommen. (C) Das Balkendiagramm zeigt das durchschnittliche Verhältnis von MS-identifizierten und vorhergesagten tryptischen Peptiden aus den 24 HK langen Importkandidaten. Die Untersuchung wurde unabhängig für die crTPs und den konservierten Bereich der Proteine durchgeführt. Tryptische Peptide wurden mithilfe des MS-Verdau-Tools aus <http://prospector.ucsf.edu/> durchgeführt. Dabei wurden nur Peptide mit einer Länge von mind. 7 AS in Betracht gezogen.

Für alle 24 Sequenzen konnten Bereiche mit  $\alpha$ -helikaler Konformation mittels NetSurfP (Petersen, *et al.*, 2009) ( $\alpha$ -Helixwahrscheinlichkeit > 50%) vorhergesagt werden. Wie in Abbildung 2.5-3 A zu sehen, befanden sich die vorhergesagten  $\alpha$ -Helices alle in einem ähnlichen Sequenzbereich im N-Terminus der crTPs, während die vorhergesagten  $\alpha$ -Helices im C-Terminus der crTPs weiter innerhalb der Sequenzen verstreut lagen. Zwei Parameter, durch die  $\alpha$ -Helices beschrieben werden können sind die Hydrophobizität ( $\langle H \rangle$ ), welche durch die Anzahl der verschiedenen hydrophoben AS bestimmt wird und das hydrophobe Moment ( $\langle \mu H \rangle$ ), welches die Symmetrie der Hydrophobizitätsverteilung innerhalb einer putativen  $\alpha$ -Helix angibt. Der Vergleich mit  $\alpha$ -Helices aus Membran-interagierenden Proteinen, sowie aus TMDs, mTPs und cTPs von Proteinen zeigt, dass die vorhergesagten Helices einen leicht amphipathischen Charakter aufweisen (Abbildung 2.5-3 B). Zudem wurde untersucht, ob die crTPs nach dem Import in die Chromatophoren möglicherweise abgespalten werden. Dafür wurde jeweils die Anzahl der während der MS-Analyse identifizierten Peptide aus der crTP-Sequenz sowie aus dem konservierten Bereich der 24 HK langen Importkandidaten in der Chromatophorenfraktion miteinander verglichen. Wie in Abbildung 2.5-3 C zu sehen, stammen die MS-identifizierten Peptide sowohl aus den crTPs als auch aus dem Rest der untersuchten Proteine, was darauf hindeutet, dass die crTPs nach dem Import in die Chromatophoren entweder nicht abgespalten werden, oder trotz Abspaltung stabil genug sind um während der MS-Analyse detektiert zu werden. Zudem wurde spezifisch nach langen tryptischen Peptiden innerhalb der 24 HK langen Importkandidaten gesucht, welche den Bereich zwischen dem crTP und dem konservierten Bereich des Proteins überbrücken könnten. Diese Analyse wird jedoch durch die Tatsache erschwert, dass für die MS-Untersuchung ein vollständiger tryptischer Verdau über Nacht durchgeführt wurde, was in relativ kurzen Peptiden resultiert. Darüber hinaus, kann das Ende der crTP-Sequenzen und somit die potentielle Schnittstelle für eine Peptidase nicht genau vorhergesagt werden. Nur für zwei lange Importkandidaten (scaffold2706-m.29779 und scaffold2991-m.31974) konnte jeweils ein längeres Peptid für den beschriebenen Bereich in der Chromatophorenfraktion identifiziert werden. Nach Vergleich mit konservierten Proteinen aus anderen Organismen konnte jedoch gezeigt werden, dass beide Peptide jeweils kurz vor Beginn des konservierten Bereichs der zwei Proteine enden, sodass eine genaue Aussage über die Abspaltung des crTPs nicht getroffen werden kann.

Insgesamt wiesen 50 der 60 langen Importkandidaten ein sequenzkonserviertes crTP auf. Die zehn Proteine, in welchen keine konservierten crTP-Sequenzen identifiziert werden konnten, könnten Proteine repräsentieren, welche mit der Membran der Chromatophoren oder mit Proteinen der äußeren Chromatophorenmembran interagieren oder durch einen crTP-unabhängigen Transport in die Chromatophoren gelangen. Für zwei der zehn Proteine (scaffold820-m.13008 und scaffold278-m.6080, beide annotiert als hypothetische Proteine), konnten TMDs vorhergesagt werden. Während scaffold820-m.13008 nur eine TMD aufweist, werden für scaffold278-m.6080 acht TMDs vorhergesagt.

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass, zumindest die Proteine ohne vorhergesagte TMDs, cytoplasmatische Kontaminationen darstellen. Ein Argument, was dafür sprechen würde ist, dass acht von zehn Proteinen jeweils nur mit einem oder zwei Peptiden identifiziert wurden.

## 2.5.2 *In silico* Vorhersage von langen importierten Proteinen

Um weitere lange Importkandidaten innerhalb der 60973 translatierten Wirts-kodierten Transkripte zu identifizieren, wurden, in Kooperation mit Prof. Dr. Stefan Rensing von der Philipps-Universität Marburg, *in silico* Vorhersagemodelle erstellt, welche die Vorhergesagte von crTPs ermöglichen. Dazu wurde zum einen das *Support Vector Machine* (SVM) Modell angewendet. Dafür wurden Datensätze zusammengestellt, welche aus Importkandidaten (positives Trainingsset) und aus kernkodierten Proteinen, welche während der MS ausschließlich im Zelllysate gefunden werden (negatives Trainingsset), bestehen. Anhand dieser konnten Merkmale identifiziert werden, welche eine Unterscheidung der importierten und der nicht importierten Sequenzen mithilfe von SVM ermöglichen (Abbildung 2.5-2 B). Zudem wurde das Hidden Markov Modell (HMM) angewandt, welches die Vorhersage der in Abbildung 2.5-2 B grau unterlegten Motive ermöglicht. Mit einer Kombination der SVM-Vorhersage mit einer Grenze von  $\geq 0.663$  und des HMM-Ansatzes mit einer Grenze von  $\geq 4$ ,  $\geq 3$ , oder  $\geq 2$  identifizierten Sequenzmotiven (SVM&HMM\_4, SVM&HMM\_3, oder SVM&HMM\_2) konnten insgesamt jeweils 478, 498, oder 519 Wirts-kodierte Proteine mit einer Länge von mehr als 250 AS als potentielle Chromatophoren-importierte Proteine identifiziert werden. Um die Sensitivität und die Spezifität der drei Modelle zu berechnen, wurden die *in silico* vorhergesagten Proteine mit der Lokalisation der Proteine verglichen, welche mithilfe der MS-Analyse abgeleitet wurde. Von den 33 langen Importkandidaten, welche nicht für das Training oder das Testen der Modelle verwendet wurden, konnten jeweils elf Proteine nicht mit SVM&HMM\_4 und SVM&HMM\_3 identifiziert werden, während SVM&HMM\_2 zehn Proteine nicht vorhersagen konnte. Interessanterweise konnten die N-Termini dieser zehn falsch positiven Proteine nicht mit den crTPs der HK langen Importkandidaten aligniert werden (siehe Kapitel 2.5.1). Das elfte Protein zeigt ein ungewöhnlich divergentes crTP und konnte vermutlich aus diesem Grund nicht durch SVM&HMM\_4 und SVM&HMM\_3, jedoch durch SVM&HMM\_2, vorhergesagt werden. Von den 670 Vollängen-Proteinen, welche ausschließlich im Lysat gefunden wurden, konnten die gleichen neun Proteine mit allen drei Methoden als importiert vorhergesagt werden. Die nähere Untersuchung dieser neun Proteine zeigt, dass alle die konservierte crTP-Sequenz aufweisen. Dies könnte darauf hindeuten, dass diese Proteine zwar importiert werden, jedoch nicht während der MS-Untersuchung detektiert wurden. Acht der neun Proteine wurden in nur einem der drei Zelllysate gefunden und sieben der neun Proteine wurden mit nur einem oder zwei Peptiden detektiert, was auf eine geringe Abundanz hindeutet. Da die Berechnung gezeigt hat, dass alle drei Modelle die gleiche Spezifität aufweisen, SVM&HMM\_2 jedoch

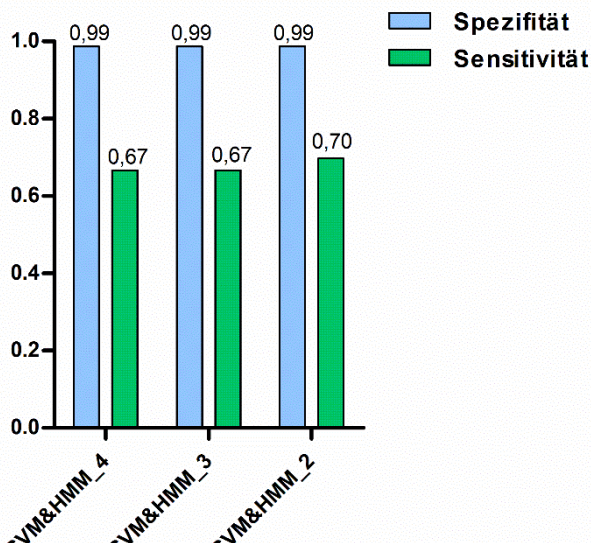


**Abbildung 2.5-4 Eigenschaften der *in silico* Vorhersage-Methoden.** Dargestellt sind Balkendiagramme für die Sensitivität und die Spezifität der drei Vorhersage-Methoden SVM&HMM\_4, SVM&HMM\_3, und SVM&HMM\_2. Die Werte wurden durch den Vergleich der *in silico* vorhergesagten importierten Proteine mit Proteinlokalisationen, die mithilfe der MS-Analyse ermittelt wurde, berechnet. Die Werte für die Spezifität und die Sensitivität sind jeweils über dem Balken gezeigt.

eine etwas höhere Sensitivität zeigt (Abbildung 2.5-4), wurde im weiteren Verlauf der Arbeit mit diesem Modell gearbeitet.

Wie in Tabelle S2 zu sehen, wurden von den 519 Proteinen, welche mit SVM&HMM\_2 vorhergesagt, 220 Proteine nur mit SVM identifiziert, 113 nur mit HMM und 186 mit einer Kombination der beiden Modelle. Diese vorhergesagten Proteine wurden mit Proteinen verglichen, welche während der MS-Analyse identifiziert wurden. Dabei konnten 5 der 220 nur mit SVM vorhergesagten, 15 der 113 nur mit HMM vorhergesagten und 50 der 186 mit beiden Modellen vorhergesagten Proteine auch durch MS als Importkandidaten

identifiziert werden. Um herauszufinden, ob die *in silico* vorhergesagten Proteine wahre Importkandidaten repräsentieren, wurden die Sequenzen der Proteine mit den crTPs der 24 HK langen Importkandidaten aligniert. Alle Proteine, die mit der Kombination der beiden Modelle, sowie 105 der 113 HMM-vorhergesagten Proteine, zeigten die konservierte crTP-Sequenz. Von den 220 Proteinen, welche ausschließlich mit SVM vorhergesagt wurden, wiesen nur drei der Proteine ein crTP auf. Diese drei wurden auch durch die MS-Analyse als Importkandidaten identifiziert und zeigen ein stark verkürztes crTP (siehe Alignment in Abbildung 2.5-2 B, Sequenz 23 und 24). Unter den verbliebenen 225 vorhergesagten Proteinen, welche kein crTP aufweisen, konnten nur zwei MS-identifizierte Importkandidaten gefunden werden. Ob diese 225 Proteine tatsächlich in die Chromatophoren importiert werden oder falsch positive Vorhersagen darstellen ist unklar und muss experimentell untersucht werden. Aus diesen Gründen werden im Weiteren nur die 291 Proteine, für welche ein erkennbares crTP identifiziert werden konnte, als wahre *in silico* vorhergesagte Importkandidaten betrachtet (siehe Tabelle S2).

Von den 291 vorhergesagten Importkandidaten wurden 65 Proteine auch als Importkandidaten durch die MS-Analyse identifiziert. 47 dieser Proteine gehören zu der Gruppe der langen Importkandidaten, während für 18 Proteine nicht die genaue Länge bestimmt werden konnte, da für die Transkripte nicht die vollständige Sequenz zur Verfügung stand. Von den 60 langen Importkandidaten konnten somit 13 Proteine nicht vorhergesagt werden. Wie bereits beschrieben, weisen 10 dieser Proteine kein crTP auf, während drei Proteine ein ungewöhnlich kurzes crTP haben und ausschließlich mit SVM vorhergesagt

wurden. Zusätzlich zu den 65 Importkandidaten konnten elf weitere MS-identifizierte Proteine vorhergesagt werden. Neun dieser Proteine wurden ausschließlich im Zelllysate gefunden. Die verbliebenen zwei gehören zu den in Kapitel 2.4 bereits erwähnten zwölf Proteinen, welche durch die MS zwar in der Chromatophorenfraktion identifiziert wurden, jedoch eine geringere Ionenintensität im Vergleich zum Zelllysate aufwiesen und aus diesem Grund nicht als Importkandidaten betrachtet wurden. Ob diese elf Proteine tatsächlich in die Chromatophoren importiert werden ist nicht klar und muss experimentell untersucht werden.

### 2.5.3 Rekonstruktion von Chromatophoren-lokalisierten Biosynthesewegen und Prozessen durch *in silico* vorhergesagte Importkandidaten

Viele der 291 *in silico* vorhergesagten Importkandidaten scheinen weitere Lücken in Chromatophoren-lokalisierten Biosynthesewegen zu füllen. Für einige Wirts-kodierte Proteine, deren Lokalisation aufgrund der An- bzw. Abwesenheit weiterer Proteine im gleichen Biosyntheseweg im Chromatophoren erwartet werden würde, konnte keine Vorhersage getroffen werden, da die Transkripte am 5'-Ende nicht vollständig sind. Ein Beispiel hierfür ist die Uroporphyrinogen III Synthase (HemD), welche den einzigen, im Chromatophor fehlenden Schritt der Phycocyanobilin- bzw. Chlorophyll A-Biosynthese katalysiert. Die genauere Untersuchung des entsprechenden Transkripts zeigte jedoch die Präsenz eines unvollständigen crTPs, sodass der Import des Enzyms zu einer Vervollständigung der Biosynthese von Phycocyanobilin und Chlorophyll A im Chromatophor führen würde (Abbildung 2.5-5 A).

Weitere Beispiele für den Import von *in silico* vorhergesagten Proteinen sind die Aspartat Carbamoyltransferase (PyrB) und die Aspartat--Ammoniak Ligase (AsnA), welche jeweils zur Vervollständigung der Biosynthesewege von Cytidintriphosphat bzw. Asparagin führen (Abbildung 2.5-5 A). Andere Beispiele für Funktionen von vorhergesagten importierten Proteinen sind die Ligation von Esterbindungen in DNA-Strängen durch die Ligase A (LigA) und die Entgiftung von Methylglyoxal durch die Enzyme Lactoylglutathion Lyase (GloA) und die Hydroxyacylglutathione Hydrolase (GloB) (Abbildung 2.5-5 B, C). In den untersuchten Biosynthesewegen wiesen die meisten Wirts-kodierten Proteine, für die eine Chromatophoren-kodierte Variante vorhanden ist, keine crTP-Sequenz auf. Eine Ausnahme bildeten hier die Enzyme HemF und GloA, welche trotz der Präsenz einer Chromatophoren-kodierten Version, ein crTP aufzeigen und aus diesem Grund vermutlich in die Chromatophoren importiert werden.

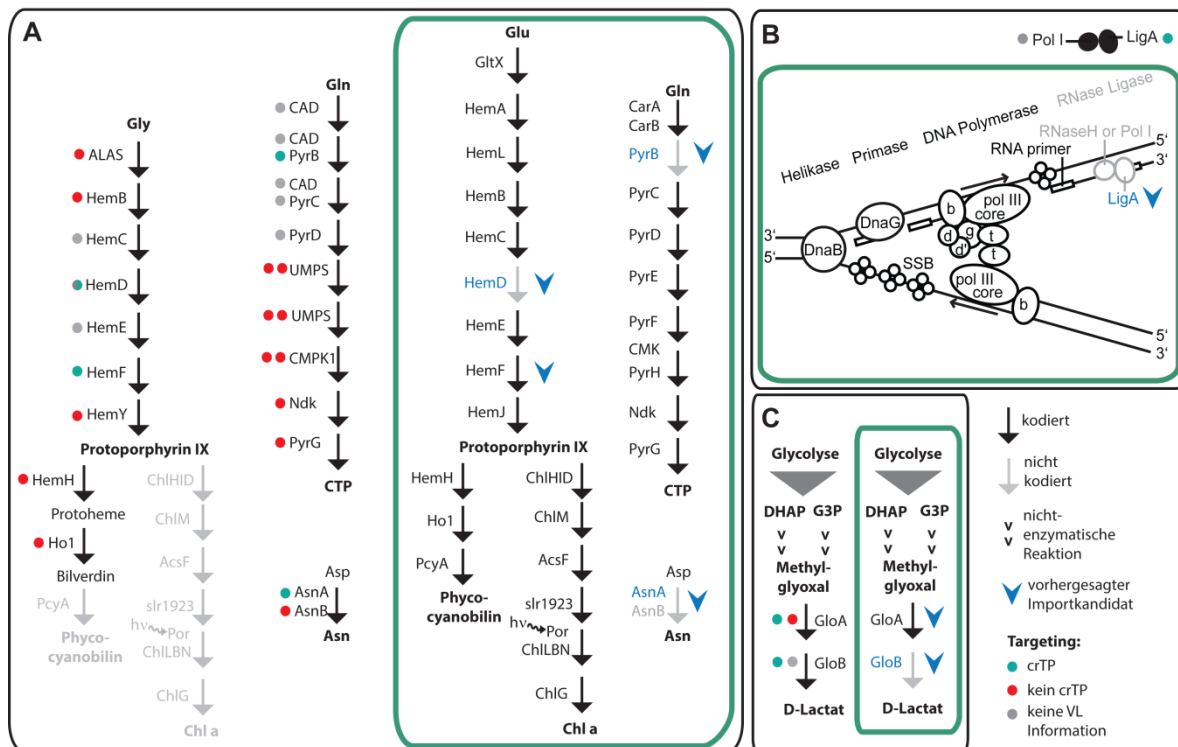


**Abbildung 2.5-5 Rekonstruktion von Chromatophoren-kodierten metabolischen Biosynthesewegen und Prozessen mithilfe der vorhergesagten Importkandidaten.** Dargestellt sind Chromatophoren-kodierte (innerhalb des grünen Vierecks) und Wirts-kodierte Proteine. Schwarze Pfeile und Schrift zeigen Genprodukte, welche auf dem Chromatophoren-Genom kodiert sind oder in den nuklearen Transkriptom-Daten gefunden werden, während graue Pfeile und Schrift das Fehlen der Genprodukte anzeigen. Die Kreise neben den Wirts-kodierten Proteinen zeigen die Targeting-Vorhersage der Proteine an: grün, vorhandenes crTP; rot, kein crTP vorhanden; grau, keine Vollängen-Information für das Transkript vorhanden und grün/grau, manuelle Identifikation eines verkürzten crTPs. Mehrere Kreise repräsentieren die Präsenz von mehreren Wirt-kodierten Protein-Isoformen. Die *in silico* vorhergesagten Importkandidaten sind als blaue Pfeilspitzen dargestellt. Diese füllen Lücken in der Phycocyanobilin- und Chlorophyll A- (Chl a), Cytidintriphosphat- (CTP) und Asparagin-Biosynthese (Asn) (A). Außerdem sind sie an der Prozessierung von genetischer Information z.B. durch die Ligation von DNA-Strängen durch Ligase A (LigA) beteiligt (B) und sind in die Detoxifikation von z.B. Methylglyoxal durch Lactoylglutathionlyase (GloA) und Hydroxyacylglutathionhydrolase (GloB), involviert (C).

## 2.6 Kurze importierte Proteine

Von den 85 Proteinen aus der Gruppe der kurzen Importkandidaten konnten für 77 Proteine entweder keine Homologe in anderen Organismen gefunden werden (67 Proteine) oder sie zeigen Homologien zu Proteinen mit unbekannter Funktion (10 Proteine). Sechs der 85 Proteine haben eine Funktion in der Photosynthese oder sind an der Photoprotektion beteiligt und sind cyanobakteriellen Ursprungs (Nowack *et al.*, 2011; Nowack, 2014). Unter diesen befinden sich auch die beiden kleinen Untereinheiten des Photosystems I, PsaE und PsaK (Nowack & Grossman, 2012). PsaK wurde jedoch nur mit einem Peptid und beide Proteine in jeweils nur einem der drei Chromatophoren-Replika gefunden. Eine mögliche Erklärung dafür könnte die geringe Menge der beiden Proteine in der Zelle sowie die kurze Länge von PsaE und PsaK darstellen. Durch das alignieren von kurzen Importkandidaten mit homologen Sequenzen aus anderen Organismen konnte keine N-terminale Sequenz, welche ein mögliches Transitpeptid repräsentieren könnte, identifiziert werden (Abbildung 2.6-1 A). Das Fehlen eines Transitpeptids wurde bereits für PsaE und PsaK gezeigt (Nowack &

Grossman, 2012) und konnte mithilfe der weiteren identifizierten kurzen Import Kandidaten bestätigt werden.

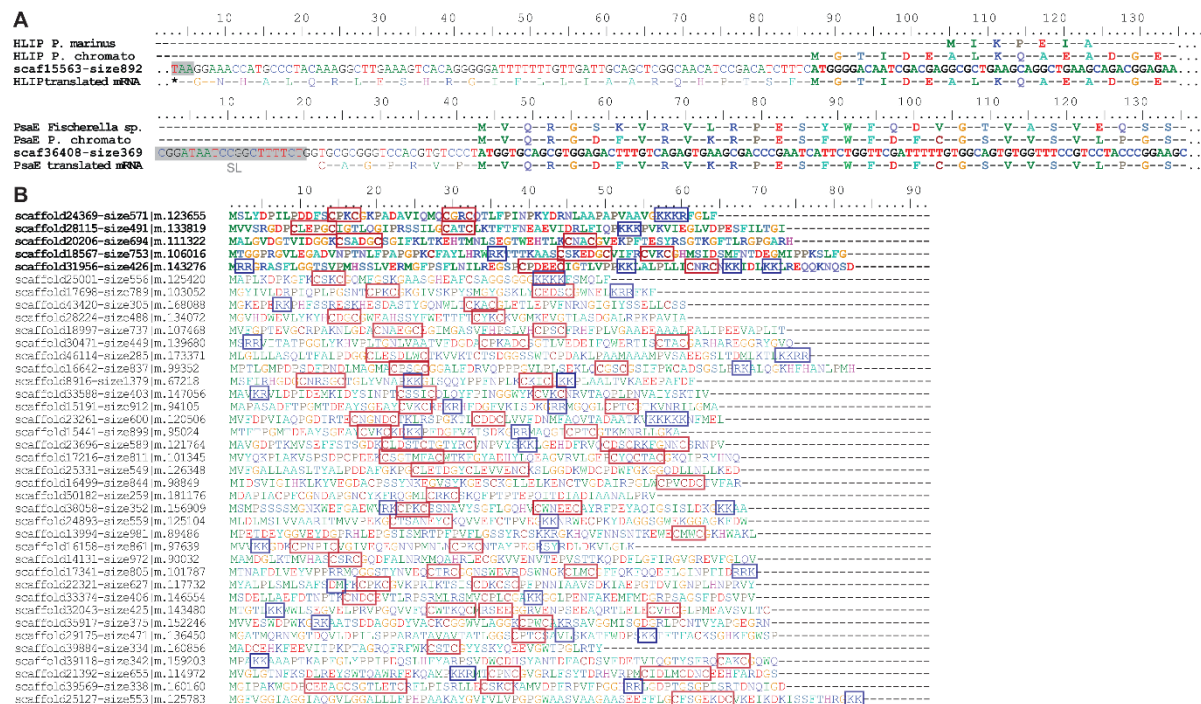


**Abbildung 2.6-1 Kurze Importkandidaten.** (A) kurze Importkandidaten weisen keine N-terminalen Präsequenzen auf. Als Beispiel sind die Sequenzen von einem Protein, welches durch starkes Licht induziert wird (HILIP, engl. für *high light inducible protein*), kodiert durch scaffold15563-size892 und die Photosystem I Untereinheit PsAE, kodiert durch scaffold36408-size369, gezeigt. Ein Stopcodon, welches sich upstream im Leserahmen von scaffold15563-size892 befindet, sowie die Anwesenheit einer SL-Sequenz im Transkript von scaffold36408-size369 bestätigen das Vorhandensein der Vollängen-Sequenz der entsprechenden Transkripte. (B) 39 kurze Importkandidaten zeigen Charakteristika von antimikrobiellen Peptiden. HK Importkandidaten sind in dunklen Farben dargestellt, NK Importkandidaten in blassen Farben. Auffällige Cystein-Motive (Cx<sub>n</sub>C) werden durch rote Boxen, Abschnitte mit aufeinanderfolgenden positivgeladenen AS durch blaue Boxen hervorgehoben.

Wie in Abbildung 2.6-1 B zu sehen, zeigen viele der kurzen Importkandidaten (39 Proteine) Cystein-Motive (Cx<sub>n</sub>C) und/oder Abschnitte mit aufeinanderfolgenden positiv geladenen AS, wie sie bei antimikrobiellen Peptiden (Broden, 2005; Mergaert *et al.*, 2017). Interessanterweise konnte kürzlich durch verschiedene Studien gezeigt werden, dass eine Vielzahl von AMPs während der symbiotischen Interaktion mit bakteriellen Zellen durch den eukaryotischen Wirt produziert wird. Diese haben verschiedenen Funktionen und es wird vermutet, dass sie an der Kontrolle der Wirt-Endosymbiont-Interaktion beteiligt sind (Shigenobu and Stern, 2013; Carro *et al.*, 2015; Maróti *et al.*, 2015).

## 2.6.1 Antimikrobielle Aktivität von kurzen importierten Proteinen

Um zu testen, ob die kurzen importierten Proteine eine antimikrobielle Aktivität aufweisen, wurden vier Kandidaten für die heterologe Überexpression in *E. coli* ausgewählt. Dabei wiesen PcAMP1 (für *P. chromatophora* antimikrobielles Peptid 1) und PcAMP2 eine positive Nettoladung auf, während

PcAMP3 insgesamt neutral und PcAMP4 negativ geladen ist (Tabelle 2.6-1). Alle Peptide mit Ausnahme von PcAMP4 enthalten Cystein motive, zusätzlich enthalten PcAMP2 und PcAMP3 Abschnitte mit jeweils 3-4 positiv geladenen AS (Abbildung 2.6-2 A).

**Tabelle 2.6-1 Physikochemische Eigenschaften der untersuchten potentiellen antimikrobiellen Peptide.**

|                                      | Ohne His-Tag |      |                     | N-term. His-Tag |                     | C-term. His-Tag |                     |
|--------------------------------------|--------------|------|---------------------|-----------------|---------------------|-----------------|---------------------|
| Name                                 | Netto-Ladung | pI   | Molekulares Gewicht | pI              | Molekulares Gewicht | pI              | Molekulares Gewicht |
| <b>PcAMP1</b><br>(scf21477-m.115224) | +2,9         | 9,02 | 7,6 kDa             | 7,24            | 10,2 kDa            | 8,6             | 8,5 kDa             |
| <b>PcAMP2</b><br>(scf24369-m.123655) | +3,7         | 9,07 | 7,0 kDa             | 7,82            | 9,8 kDa             | -               | -                   |
| <b>PcAMP3</b><br>(scf28115-m.133819) | -0,3         | 6,14 | 8,0 kDa             | 6,43            | 10,7 kDa            | -               | -                   |
| <b>PcAMP4</b><br>(scf41490-m.164156) | -1,7         | 5,85 | 7,4 kDa             | 6,28            | 10,0 kDa            | -               | -                   |

Viele bekannte antimikrobielle Peptide, die bakterielle Membranen angreifen, wie das Maganin-2 oder das PGLa, welche in der Haut des afrikanischen Frosches *Xenopus laevis* vorkommen, sind in wässriger Lösung unstrukturiert und bilden amphiphatische Helices wenn sie in Kontakt mit der Zielmembran treten (Afonin *et al.*, 2008; Bürck *et al.*, 2008; Tremouilhac *et al.*, 2006). Für alle vier *Paulinella*-kodierte potentiellen AMPs konnten Bereiche mit  $\alpha$ -helikaler Konformation mittels NetSurfP ( $\alpha$ -Helixwahrscheinlichkeit > 50%) vorhergesagt werden. Wie bereits für die crTP-Sequenzen in Kapitel 2.5-1 beschrieben, wurden die Hydrophobizität sowie das hydrophobe Moment für den Bereich der  $\alpha$ -Helices für die hier untersuchten putativen AMPs mittels HeliQuest bestimmt. Für Peptide mit Membran-interagierenden Eigenschaften konnten hohe hydrophobe Momente sowie eine geringe Hydrophobizität gezeigt werden (Eisenberg *et al.* 1984) (Abbildung 2.6-2 C). Verglichen damit weisen Transmembrandomänen eine hohe Hydrophobizität sowie ein geringeres hydrophobes Moment auf. Wie in Abbildung 2.6-2 B und C zu sehen, zeigten die  $\alpha$ -helikalen Bereiche der untersuchten PcAMPs Hydrophobizitäten zwischen 0,287 und 0,543, während das hydrophobe Moment bei 0,189 bis 0,375 lag. Damit zeigen diese ähnliche Werte für das hydrophobe Moment wie Transmembrandomänen, jedoch mit einer geringeren Hydrophobizität.

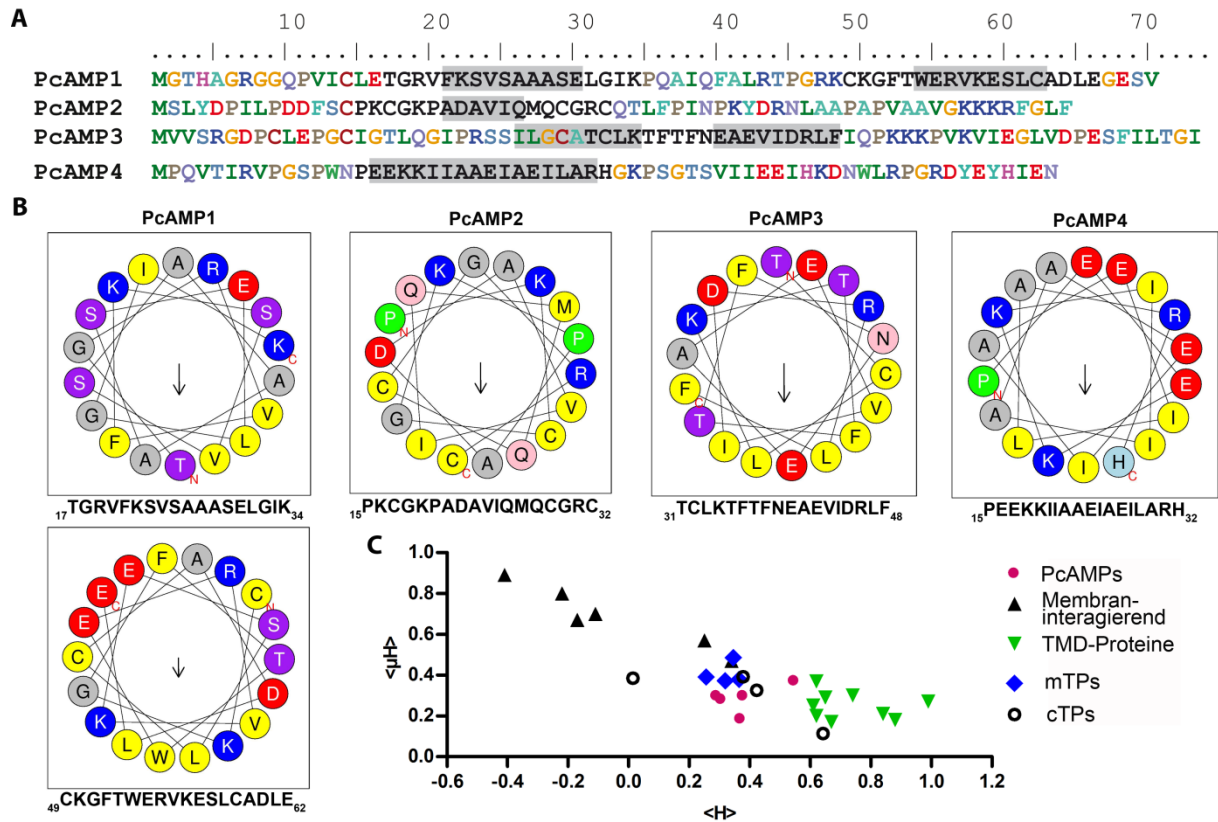


**Abbildung 2.6-2 Sequenzanalyse der vier ausgewählten potentiellen antimikrobiellen Peptide.** (A) Sequenzen der *Paulinella chromatophora* antimikrobiellen Peptide (PcAMP) 1-4.  $\alpha$ -helikale Konformation wurde mittels NetSurfP vorhergesagt, Sequenzen mit einem Z-Wert  $\geq 0,5$  ( $\alpha$ -Helixwahrscheinlichkeit  $> 50\%$ ) sind grau unterlegt. Zusätzlich wurden das hydrophobe Moment  $\langle \mu_H \rangle$  und die Hydrophobizität  $\langle H \rangle$  für die Bereiche mit  $\alpha$ -helikaler Konformation (schwarze Schrift) mittels HeliQuest vorhergesagt. (B) Helikale Projektion der 18 AS langen Bereiche mittels HeliQuest. Unterhalb der Projektionen sind die Aminosäureabfolge sowie die Aminosäurepositionen der untersuchten Sequenz angegeben. Die Eigenschaften der Aminosäurereste sind durch einen Farbcode dargestellt: lila, ungeladen; rosa, ungeladen amidisch; rot, polar negativgeladen; blau, polar positivgeladen; gelb, hydrophob; grau, sonstige. Richtung des hydrophoben Moments ist als Pfeil innerhalb der Projektion dargestellt. Die Länge des Pfeils gibt Hinweise auf die Stärke des hydrophoben Moments. (C) Der Graph zeigt das mittels HeliQuest vorhergesagte hydrophobe Moment  $\langle \mu_H \rangle$  und die Hydrophobizität  $\langle H \rangle$  der beschriebenen  $\alpha$ -helikalen Bereiche. Für Referenzen von  $\langle \mu_H \rangle$  und  $\langle H \rangle$  siehe Abbildung 2.5-3 B.

Um die antimikrobiellen Eigenschaften der putativen AMPs zu untersuchen wurden die vier PcAMPs als His-Fusionen in *E. coli* überexprimiert und mittels Nickel-Affinitätschromatographie aufgereinigt. Anschließend wurden *Synechococcus elongatus* PCC 7942 und *E. coli* Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Peptide behandelt. Bei dem *S. elongatus* PCC 7942 handelt es sich um einen  $\beta$ -cyanobakteriellen Stamm, der eine hohe Verwandtschaft zu den Chromatophoren mit  $\alpha$ -cyanobakteriellem Ursprung aufweist (Golden *et al.*, 1989; Marin, Nowack and Melkonian, 2005). Die beiden Bakterien wurden als Versuchsorganismen gewählt, da die isolierten Chromatophoren nicht teilungsfähig außerhalb ihrer Wirtszelle sind. *E. coli* Zellen sind zudem leicht verfügbar und einfach zu kultivieren. Da ein ähnliches Ergebnis sowohl für *E. coli* Top10 als auch für *E. coli* Rosetta pLysS erzielt wurde (Ergebnisse nicht gezeigt), wurde im Weiteren mit *E. coli* Rosetta pLysS gearbeitet, da hier die Handhabung der Zellen durch die Resistenz gegen Chloramphenicol im Kultivierungsmedium erleichtert wird.

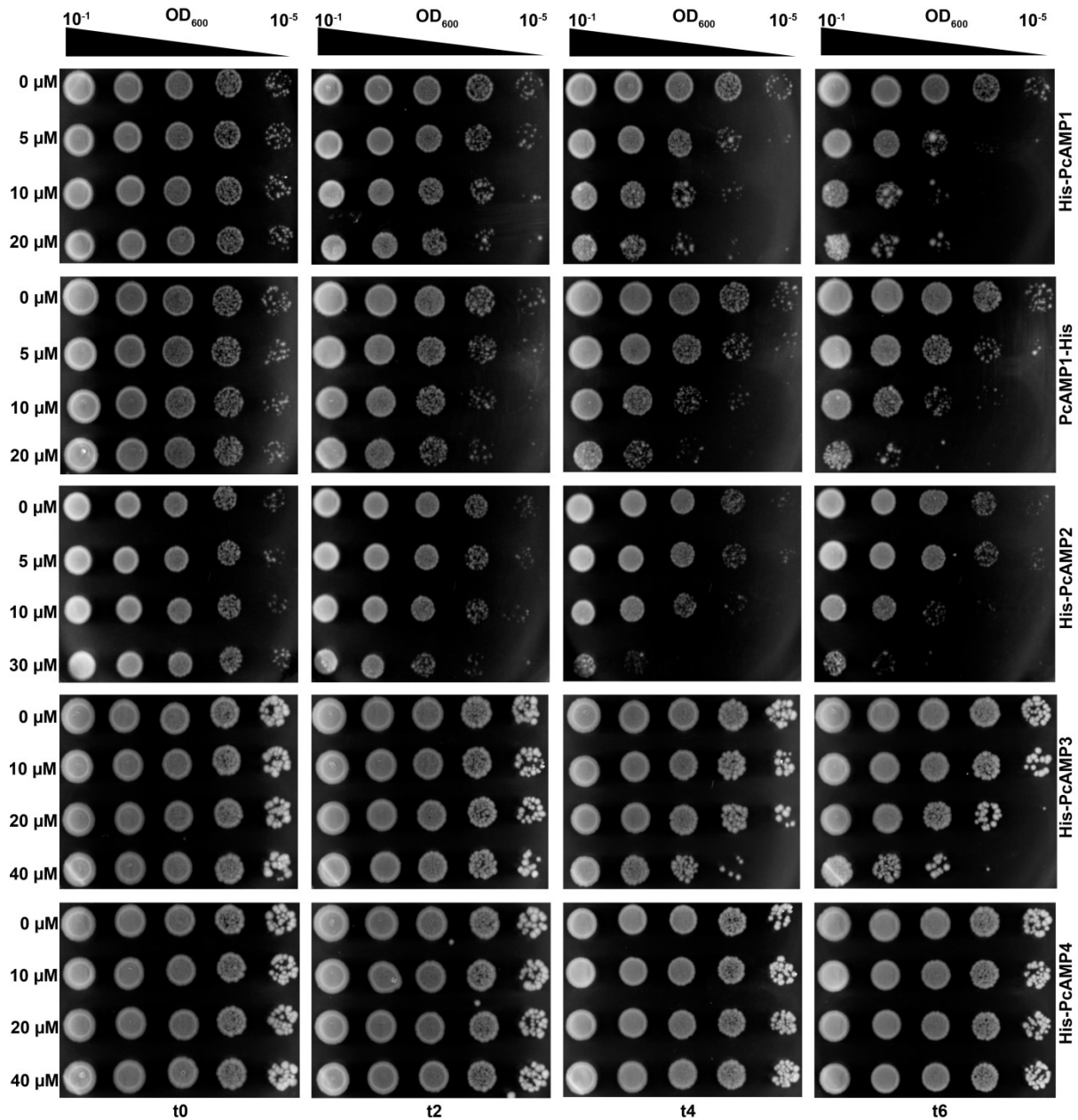


**Abbildung 2.6-3 Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität der vier PcAMPs auf *E. coli*.** Dargestellt sind serielle Verdünnungstropftests von *E. coli* Rosetta pLysS nach Behandlung mit PcAMP1, PcAMP2, PcAMP3 und PcAMP4. Die verwendeten Peptidkonzentrationen sind auf der linken Seite dargestellt. Für die Untersuchung wurden His-Tag-fusionierte Peptide verwendet. Die Position des His-Tags ist dabei auf der rechten Seite zu sehen. Die Proben wurden nach 0, 2, 4 und 6 h Inkubation mit dem jeweiligen Peptid entnommen, seriell von  $OD_{600}=10^{-1}$  bis  $10^{-5}$  verdünnt und jeweils 5  $\mu$ l auf LB-Platten getropft. Die Aufnahme erfolgte nach 16 h Inkubation der Platten bei 37°C. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse von mehreren unabhängig durchgeführten Experimenten ( $n=3$ ).

Wie in Abbildung 2.6-3 zu sehen, konnte für PcAMP1 und PcAMP2 bereits nach 2 h Inkubation mit den Peptiden ein leichter Konzentrations-abhängiger wachstumshemmender Effekt auf *E. coli* beobachtet werden. Dieser wurde nach 4 bzw. 6 h Inkubation mit den Peptiden deutlich verstärkt. Dabei zeigte die Position des His-Tags von PcAMP1 nur eine geringe Auswirkung auf diesen Effekt, wobei His-PcAMP1 einen etwas stärkeren wachstumshemmenden Effekt zeigte als PcAMP1-His. Die minimale inhibitorische Konzentration lag für PcAMP1 bei 5  $\mu$ M und für PcAMP2 bei 10  $\mu$ M. Im Gegensatz dazu konnte erst nach 4 h Inkubation der Zellen mit PcAMP3 ein geringer wachstumshemmender Effekt

beobachtet werden. Hier betrug die minimale inhibitorische Konzentration 20  $\mu\text{M}$  und war somit um das Vierfache bzw. Doppelte höher als für die Peptide PcAMP1 und PcAMP2. Nach 6 h konnte ein etwas stärkerer Konzentrations-abhängiger wachstumshemmender Effekt von PcAMP3 detektiert werden. Die Inkubation mit PcAMP4 über bis zu 6 h führte zu keiner Veränderung des Wachstums der Zellen. Zudem wurde die Wirkung von His-PcAMP2 und His-PcAMP3 auf *S. elongatus* PCC 7942 untersucht. Wie in Abbildung 2.6-4 zu sehen, konnte kein Effekt auf das Wachstum des Cyanobakteriums bei Konzentrationen von bis zu 40  $\mu\text{M}$  für PcAMP2 und bis zu 70  $\mu\text{M}$  für PcAMP3 beobachtet werden. Auch bei einer Wiederholung der Untersuchung für PcAMP3 konnte keine Wirkung auf die Zellen detektiert werden. Daher wurde aus zeitlichen Gründen im weiteren Verlauf der Arbeit mit *E. coli* als Versuchsorganismus gearbeitet.

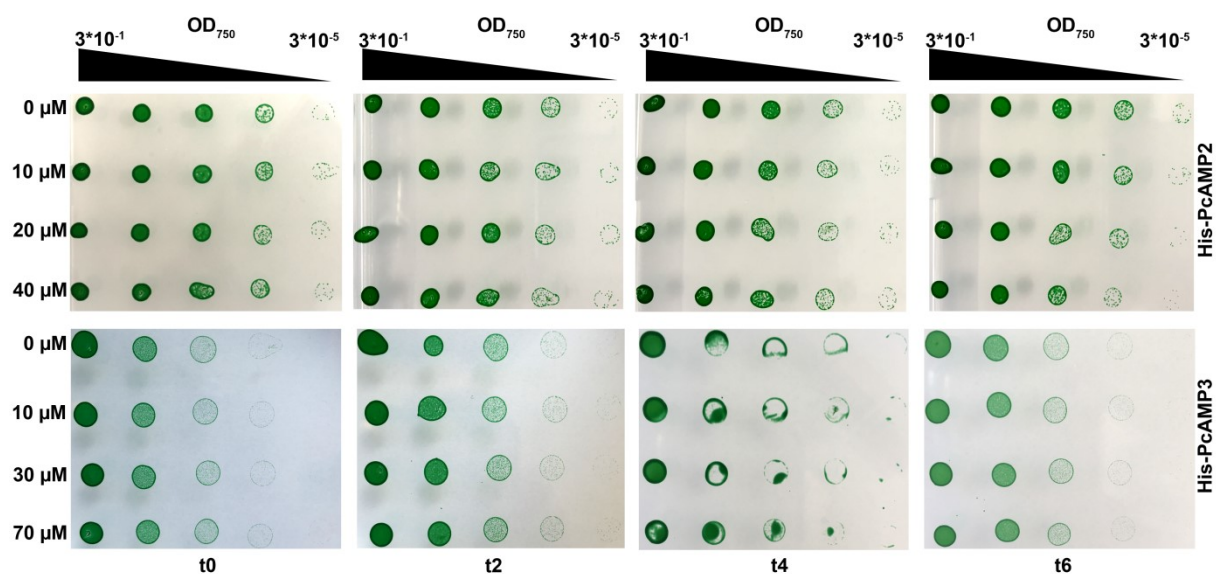


**Abbildung 2.6-4 Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität von PcAMP2 und PcAMP3 auf *S. elongatus* PCC 7942.** Dargestellt sind serielle Verdünnungstropftests von *S. elongatus* PCC 7942 nach Behandlung mit PcAMP2 und PcAMP3. Die verwendeten Peptidkonzentrationen sind auf der linken Seite dargestellt. Für die Untersuchung wurden His-Tag-fusionierte Peptide verwendet. Die Position des His-Tags ist dabei auf der rechten Seite zu sehen. Die Proben wurden nach 0, 2, 4 und 6 h Inkubation mit dem jeweiligen Peptid entnommen, seriell von  $\text{OD}_{750}=3 \cdot 10^{-1}$  bis  $3 \cdot 10^{-5}$  verdünnt und jeweils 5  $\mu\text{l}$  auf BG11-Platten getropft. Die Aufnahme erfolgte nach 10 Tagen Inkubation der Platten bei 30°C und Dauerbelichtung.

Um zu untersuchen, ob der His-Tag einen Einfluss auf die antimikrobielle Aktivität der Peptide hat, wurde versucht diesen von PcAMP2 abzuspalten. Dies wurde durch eine Schnittstelle für die Protease Enterokinase ermöglicht, welche sich zwischen dem N-terminalen His-Tag und dem Peptid befindet. Leider konnten so keine hinreichenden Mengen an reinem Peptid generiert werden, sodass die Ergebnisse hier nicht gezeigt werden können. Jedoch deutet die Variation der His-Tag-Position von PcAMP1 und die fehlende antimikrobielle Aktivität von PcAMP4 darauf hin, dass der His-Tag keinen Einfluss auf die Funktion der Peptide zeigt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass positiv geladen kurze Importkandidaten mit AMP-ähnliche Sequenzeigenschaften (PcAMP1 und PcAMP2), einen starken inhibitorischen Effekt auf das Wachstum von *E. coli* zeigen, während das neutral geladene Peptid PcAMP3 nur einen geringen Effekt

mit einer höheren minimalen inhibitorischen Konzentration hatte. Weitere Untersuchungen der PcAMPs wurden im Folgenden mit den Peptiden PcAMP1 und PcAMP3 durchgeführt.

## 2.6.2 Kationische AMPs erhöhen die Membranpermeabilität von *E. coli*

Für einige symbiotische AMPs aus anderen Organismen konnte eine permeabilisierende Wirkung auf biologische Membranen gezeigt werden (Carro *et al.*, 2015; Maróti *et al.*, 2015). Um zu untersuchen, ob PcAMP1 und PcAMP3 zu einer Erhöhung der Membranpermeabilität in *E. coli* führen, wurde die Aufnahme des Membran-impermeablen DNA-Farbstoffs Propidiumiodid (PI) nach Behandlung mit den aufgereinigten His-Tag fusionierten Peptiden überprüft.

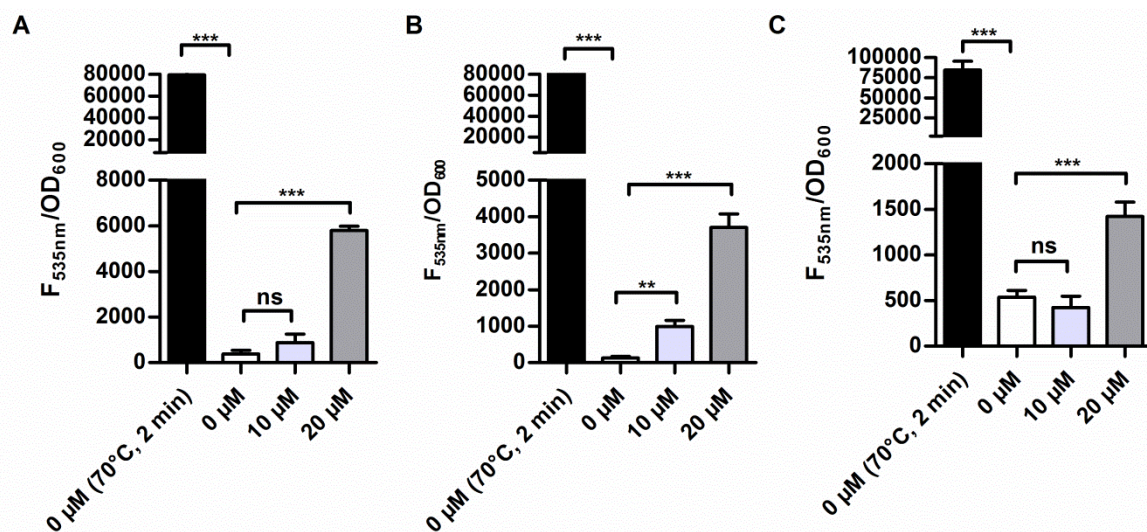


**Abbildung 2.6-5 Konzentrationsabhängiger Effekt verschiedener PcAMPs auf die Aufnahme von Propidiumiodid in *E. coli*.** *E. coli* Rosetta pLysS Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen der putativen AMPs His-PcAMP1 (A), PcAMP1-His (B) für 2 h oder His-PcAMP3 für 4 h (C) inkubiert und anschließend mit 20 µg/ml Propidiumiodid (PI) gefärbt. Für die Positivkontrolle wurden unbehandelte Zellen vor Zugabe von PI für 2 min bei 70°C inkubiert. Dargestellt ist der Durchschnitt der fluorometrisch gemessenen PI-Fluoreszenz bei einem Absorptionsmaximum von 488 nm und einem Emissionsmaximum von 590 nm 5 min nach Zugabe von PI. Die Messung erfolgte in Triplikaten, Fehlerbalken zeigen Standardfehler des Mittels, ungepaarter zweiseitiger t-Test,  $p \leq 0,5 = *$ ;  $p \leq 0,01 = **$ ;  $p \leq 0,001 = ***$ . Gezeigt ist ein repräsentatives Ergebnis von mehreren unabhängigen Experimenten ( $n=3$ ).

Wie in Abbildung 2.6-5 A und B zu sehen, führte die Inkubation von *E. coli* Zellen mit PcAMP1 zu einer vermehrten Aufnahme von Propidiumiodid in die Zelle, was in einer signifikant erhöhten PI-Fluoreszenz resultierte. Dabei konnte ein Anstieg der PI-Fluoreszenz mit steigender Konzentration des Peptids beobachtet werden. Die Behandlung von *E. coli* mit 10 µM PcAMP3 resultierte nicht in einer gesteigerten Aufnahme von Propidiumiodid. Bei der Erhöhung der Konzentration von PcAMP3 auf 20 µM konnte ein geringer Anstieg der PI-Fluoreszenz in den behandelten Zellen gemessen werden. Vergleicht man die Stärke der PI-Fluoreszenz, die nach der Behandlung der Zellen mit 20 µM His-PcAMP3 erhalten wurde mit der PI-Fluoreszenz nach der Behandlung mit His-PcAMP1, so war diese nur ein Drittel bzw. halb so stark (Abbildung 2.6-5 C). Als Positivkontrolle wurden Zellen verwendet, welche vor der Zugabe von PI für 2 min bei 70°C inkubiert wurden. Hier konnte aufgrund der

Schädigung der Plasmamembran durch die Hitze ein starker Anstieg der PI-Aufnahme detektiert werden.

### 2.6.3 Interaktion von antimikrobiellen Peptiden mit Lipiden

Da der Effekt von PcAMP1 auf die Membranpermeabilität auf eine Interaktion des Peptids mit der Plasmamembran von *E. coli* hindeutet, wurde im nächsten Schritt die spezifische Bindung der PcAMPs an verschiedene Lipide mithilfe eines Lipid-Protein-Interaktions-Assays untersucht. Dafür wurden PcAMP1 und PcAMP3 mit kommerziell verfügbaren Membranen, auf denen sich verschiedene biologisch relevante Lipide befinden, inkubiert und die Interaktion mithilfe des His-Tags der Peptide nachgewiesen. Die Positivkontrolle, welche aus der GST-fusionierten Pleckstrin Homologie-Domäne (PH-Domäne) von Phospholipase C besteht, zeigte, wie bereits beschrieben, eine spezifische Interaktion mit Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat (PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>) (Kavran *et al.* 1998) (Abbildung 2.6-6 A). Wie in Abbildung 2.6-6 B zu sehen, konnte für PcAMP1 eine spezifische Interaktion mit Phosphatidylinositol-4-Phosphat (PtdIns(4)P) gezeigt werden. Für PcAMP3 konnte trotz des intakten His-Tags keine Interaktion mit einem der 15 getesteten Lipide nachgewiesen werden (Abbildung 2.6-6 C, D).

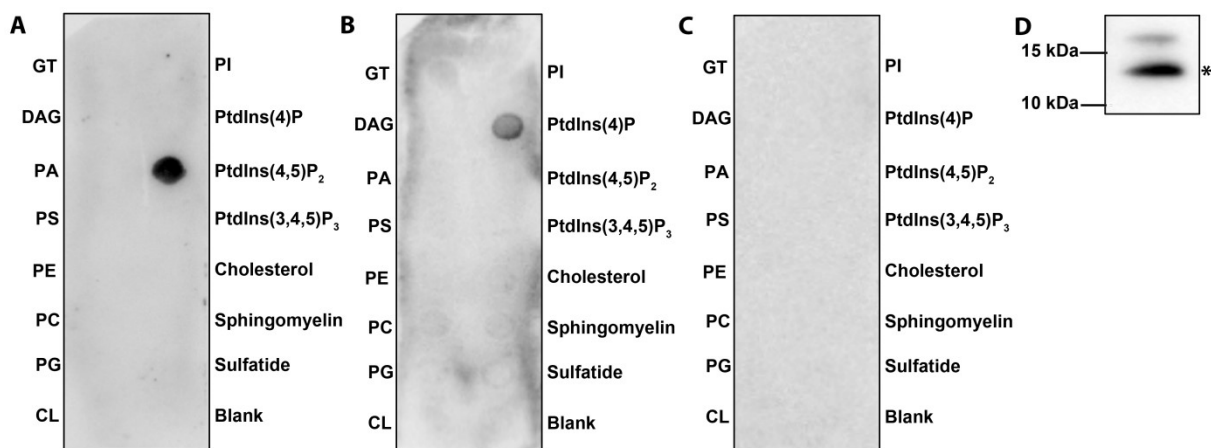


**Abbildung 2.6-6 Interaktion von PcAMPs mit Lipiden.** Dargestellt sind Membranen, mit jeweils 15 biologisch relevanten Lipiden. (A) Membran-Interaktions-Assay mit der GST-fusionierten Pleckstrin Homologie Domäne von Phospholipase C. Die Interaktion mit Lipiden wurde mithilfe eines anti-GST-Antikörpers nachgewiesen. (B) Membran-Interaktions-Assay mit His-PcAMP1 und (C) His-PcAMP3. Die Interaktion mit Lipiden wurde mithilfe eines anti-His-Antikörpers nachgewiesen. Jeder Tropfen enthält 100 pmol Lipid. Die Abkürzungen stehen für; GT, Glyceryl Tripalmitat; DAG, Diacylglycerol; PA, Phosphatidylsäure; PS, Phosphatidylserin; PE, Phosphatidylethanolamin; PC, Phosphatidylcholin; PG, Phosphatidylglycerol; CL, Cardiolipin; PI, Phosphatidylinositol; PtdIns(4)P, Phosphatidylinositol-4-Phosphat; PtdIns(4,5)P<sub>2</sub>, Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphat; PtdIns(3,4,5)P<sub>3</sub>, Phosphatidylinositol-4,5-Trisphosphat. (D) Nachweis von in (C) eingesetztem His-PcAMP3 mithilfe eines anti-His-Antikörpers, \*:His-PcAMP3 10,7 kDa. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse von n=2 unabhängig durchgeführten Experimenten.

## 2.7 Funktionale Klassifizierung von Importkandidaten

Betrachtet man die Daten, welche durch die MS-Analyse und die *in silico* Vorhersage gewonnen wurden, konnten insgesamt 433 Proteine identifiziert werden, welche als potentielle

Importkandidaten klassifiziert werden (Tabelle S3). 226 der 433 Proteine waren von unbekannter Funktion, während die restlichen 207 in diversen zellulären Prozessen beteiligt sind (Abbildung 2.7-1 A). Die größte Gruppe, mit 47 von 207 Proteinen, ist an der Verarbeitung von genetischer Information beteiligt. Darunter konnten 22 Zink-Finger Transkriptionsfaktoren, sowie mehrere DNA- und RNA-Helikasen sowie eine Poly-A-Polymerase identifiziert werden. Zudem scheinen viele Enzyme, welche eine Funktion in metabolischen Prozessen der Zelle haben, in die Chromatophoren importiert zu werden. Dabei sind 13 Proteine an dem AS-Metabolismus, 13 Proteine am Kohlenhydrat-, jeweils zwei Proteine am Lipid und dem Kofaktor-/Vitamin- und 9 Proteine am Nukleotid-Metabolismus beteiligt. Insgesamt neun Proteine spielen eine Rolle in der Photosynthese und der Anpassung an verschiedene Lichtverhältnisse sowie neun weitere Proteine während oxidativem Stress. Die verbliebenen sieben Proteine sind in den Transport sowie die Proteinfaltung involviert. Darunter befindet sich unter anderem das Protein Tic32, welches eine Komponente des TOC/TIC-Komplexes darstellt.

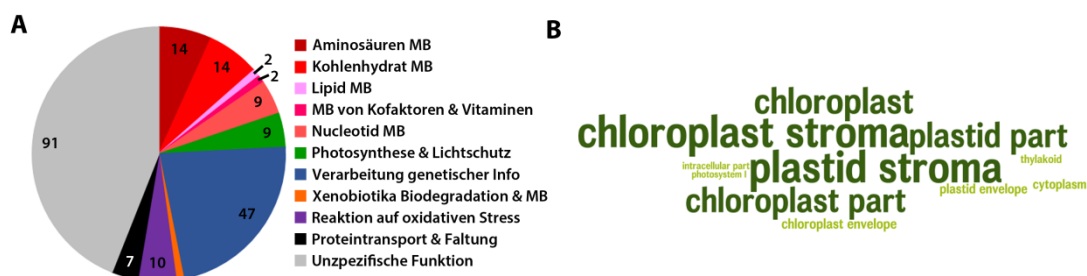


**Abbildung 2.7-1 Funktionale Analyse der experimentell bestimmten und der *in silico* vorhergesagten Importkandidaten.** (A) Funktionale Klassen der Importkandidaten. Für Details der Analyse siehe Tabelle S3. MB, Metabolismus. (B) *Word Cloud* (engl. für Wörter-Wolke) Darstellung der Untersuchung der Importkandidaten auf Gen-Ontologie Termini für zelluläre Komponenten. Alle Importkandidaten (siehe Tabelle S3) wurden gegen den Hintergrund aller Wirts-kodierten Proteine von *P. chromatophora* untersucht. Die Analyse wurde durchgeführt von Cornelia Mühlich, Phillips-Universität Marburg.

Interessanterweise zeigte die Blast2GO Zuordnung von GO-Termini eine Überrepräsentation von GO-Termini, welche im Zusammenhang mit Plastiden und Plastid-Kompartimenten steht (Abbildung 2.7-1 B).

## 2.8 Phylogenetischer Ursprung importierter Proteine

Um zu ermitteln, welchen phylogenetischen Ursprung die in die Chromatophoren importierten Proteine aufweisen, wurde die Liste der 433 MS-identifizierten und *in silico* vorhergesagten Import Kandidaten mit vorausgegangenen phylogenetischen Analysen des gesamten *P. chromatophora* Transkriptom Datensatzes (Nowack *et al.* 2016) abgeglichen. Interessanterweise sind nur 17 der Importkandidaten  $\alpha$ -cyanobakteriellen Ursprungs und sind vermutlich durch EGT entstanden. Acht der 17 Proteine sind an der Photosynthese sowie an der Photoprotektion beteiligt. Ein weiteres Beispiel ist das Enzym Cystein-Synthase A (CysK), welches die Bildung von L-Cystein aus O-Acetyl-L-Serin katalysiert. Dieses Enzym besitzt eine Chromatophoren-kodierte sowie drei Wirts-kodierte Isoformen (Abbildung 2.8-1), welche vermutlich durch eine Genmultiplikation nach dem Transferereignis entstanden sind, wie es

bereits für weitere Proteine mit HGT- oder EGT-Ursprung in *P. chromatophora* beschrieben wurde (Nowack *et al.* 2016). Zwei der drei Wirts-kodierten Isoformen konnten während der MS-Analyse mit jeweils einzigartigen Peptiden identifiziert werden, während die Chromatophoren-kodierte Kopie experimentell nicht gefunden wurde. Interessanterweise korreliert die subzelluläre Lokalisation der CysK-Isoformen mit den Eigenschaften der Proteinsequenzen. Während scaffold4337-m.41170, welches in der Chromatophorenfraktion angereichert ist, eine crTP-Sequenz nach der Genmultiplikation erworben hat, weist scaffold2205-m.25816, welches ausschließlich im Lysat gefunden wurde, keine N-terminale Verlängerung im Vergleich zu homologen CysK-Sequenzen auf. Stattdessen scheint diese Isoform eine Domäne mit Rossmann-Faltung im C-Terminus des Proteins erworben zu haben. Die Rossmann-Faltung ist eine Strukturdomäne, welche die Interaktion mit Nukleotiden ermöglicht und wird weder im Chromatophor, noch in cyanobakteriellen CysK-Proteinen gefunden. Daher bleibt die spezifische Funktion dieser Domäne in dem Wirts-kodierten CysK-Protein unbekannt.

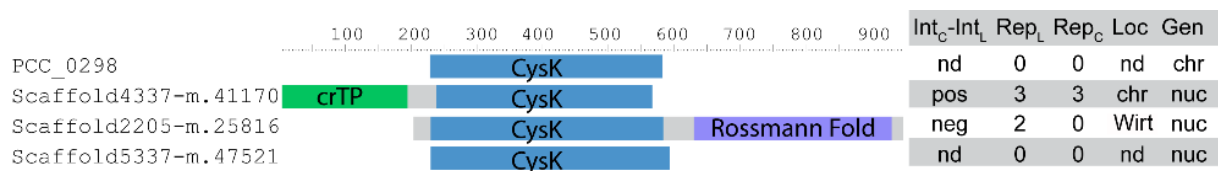


**Abbildung 2.8-1 Erwerb eines crTPs durch das CysK Protein.** Auf der linken Seite ist ein schematisches Alignment der AS der Chromatophoren- und Wirts-kodierten Isoformen der Cystein-Synthase A (CysK) cyanobakteriellen Ursprungs dargestellt. Auf der rechten Seite sind MS-Daten und Lokalisation der entsprechenden Isoformen von CysK gezeigt. Die Abkürzungen sind wie folgt: chr, Chromatophor; Int<sub>c</sub> und Int<sub>L</sub>, durchschnittliche Ionenintensitäten in Chromatophor- und Lysatfraktionen; Loc, durch MS-Analyse bestimmte Proteinlokalisierung; neg, negativer Wert; nuc, Nucleus; pos, positiver Wert; Rep<sub>c</sub> and Rep<sub>L</sub>, identifiziert in x Chromatophoren- oder Lysat-Replikaten.

Neben den Proteinen  $\alpha$ -cyanobakteriellen Ursprungs konnte 26 weiteren Proteinen ein bakterieller Ursprung zugeordnet werden. Diese wurden vermutlich durch horizontalen Gentransfer aus diversen Bakterien erworben (Nowack *et al.*, 2011; Nowack *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2017). Die verbliebenen 390 Importkandidaten sind von Wirts- oder unbekanntem Ursprung.

## 2.9 Subzelluläre Lokalisation importierter Proteine nach heterologer Expression in *N. benthamiana*

Um zu untersuchen, ob die crTP-Sequenz oder ein potentiell kryptisches Targetingpeptid innerhalb von kurzen importierten Proteinen eine Targeting Funktion im heterologen System einer Pflanzenzelle aufweist, wurden diese transient in *Nicotiana benthamiana* exprimiert. Dazu wurde das crTP eines Proteins, welches als Flavinreduktase annotiert ist (scaffold5513-m.48594, Sequenz 5 in Abbildung 2.5-2 B), sowie das kurze importierte Protein Psae (scaffold17097-m.100929) C-terminal mit YFP fusioniert. Nach Expression in *N. benthamiana* für 72 h erfolgte die Isolation der Protoplasten sowie die Untersuchung der Lokalisation mittels konfokaler Laser-Fluoreszenzmikroskopie.

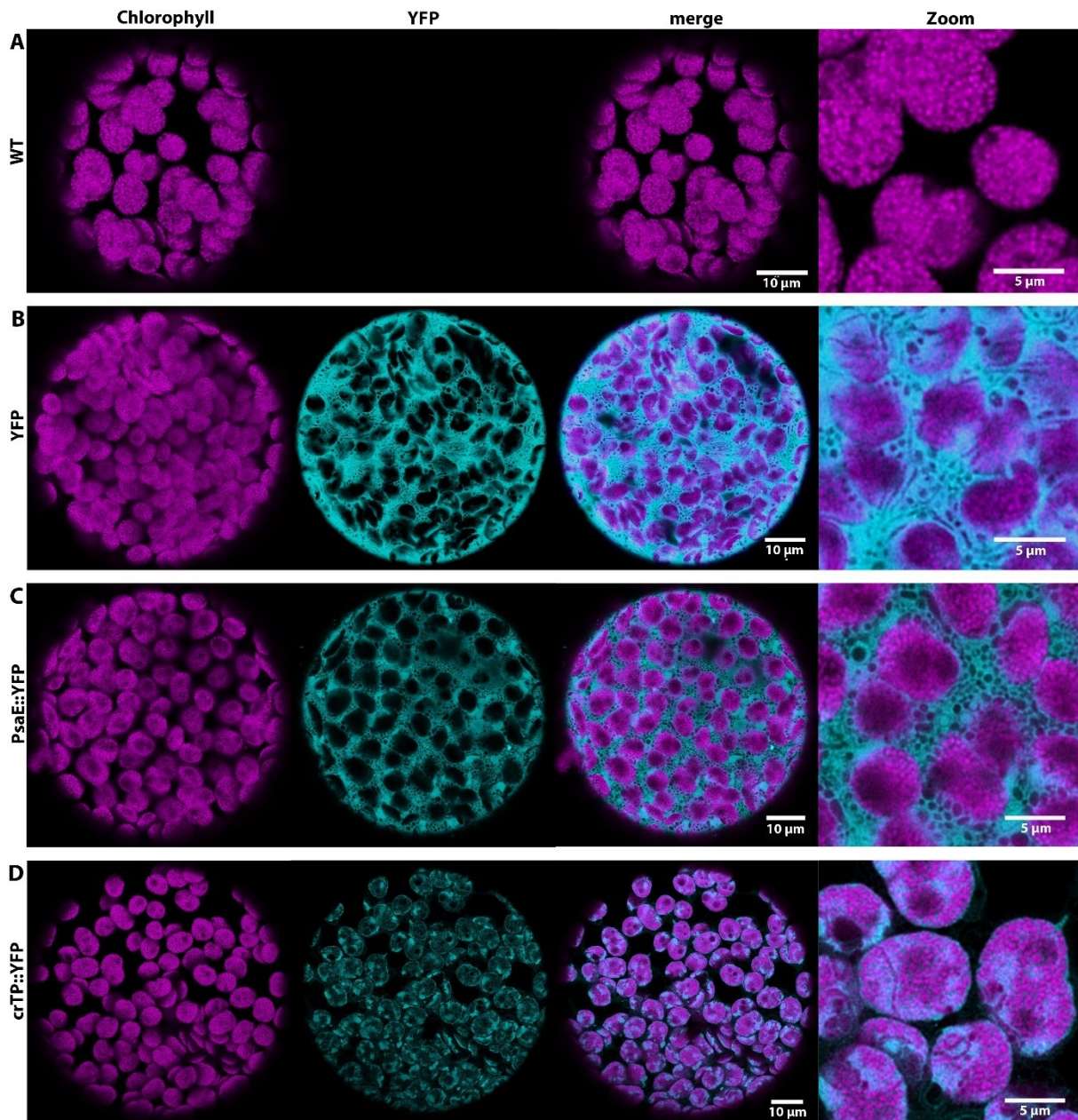


**Abbildung 2.9-1 Fusion mit *Paulinella chromatophora* crTP führt zum Import von YFP in die Plastiden von *Nicotiana benthamiana*.** (A) Wildtyp *N. benthamiana*. Transiente Expression von (B) YFP allein, (C) PsaE (scaffold17097-m.100929) und (D) dem crTP der Flavinreduktase (scaffold5513-m.48594) fusioniert mit dem N-terminus des gelb fluoreszierenden Proteins (YFP, engl. für yellow fluorescent protein). Die Konstrukte wurden für 72 h in *N. benthamiana* exprimiert. Anschließend wurden die Protoplasten isoliert und mittels konfokaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht. Gezeigt sind die Autofluoreszenz von Chlorophyll in magenta, die YFP-Fluoreszenz in cyan, die Überlagerung der beiden Fluoreszenzen (merge) sowie ein vergrößerter Ausschnitt des untersuchten Protoplasten. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis für jedes untersuchte Konstrukt.

Dabei konnte gezeigt werden, dass das PsaE::YFP-Fusionsprotein eine cytoplasmatische Lokalisation, ähnlich der von YFP, welches als Kontrolle exprimiert wurde, aufweist (Abbildung 2.9-1 B, C). Im Gegensatz dazu zeigte das crTP::YFP-Fusionsprotein eine Lokalisation in den Plastiden von *N. benthamiana*. Vergleicht man die Chlorophyll-Autofluoreszenz der Thylakoid-Grana-Stapel sowie das YFP-Signal von crTP::YFP, kann eine duale Lokalisation des Fusionsproteins innerhalb der Plastiden vermutet werden (Abbildung 2.9-1 D). Zum einen gibt es Hinweise auf eine stromale Lokalisation des

Proteins, die sich aus dem komplementären Muster der Chlorophyll-Autofluoreszenz und der YFP-Fluoreszenz ableitet. Zum anderen deutet das auf den Plastiden aufliegende YFP-Signal sowie die Ausbildung von Nasen- und Faden-artigen Strukturen (siehe Abbildung 2.9-1 D, Zoom) auf eine Lokalisation des Fusionsproteins in der äußeren Hüllmembran der Plastiden.

### 3 Diskussion

#### 3.1 Das Chromatophor-Proteomdatenset

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des Proteoms von Chromatophoren, den evolutionär jungen photosynthetischen Organellen der Alge *P. chromatophora*. Dabei konnten mithilfe der Massenspektrometrie insgesamt 422 Chromatophoren-kodierte Proteine in isolierten Chromatophoren identifiziert werden, was einer Abdeckung von 49% der 857 Chromatophoren-kodierten Proteine entspricht. Basierend auf diesen Zahlen kann vermutet werden, dass mithilfe der MS-Untersuchung etwa die Hälfte des gesamten Proteoms der Chromatophoren erfasst werden konnte. Betrachtet man die Chromatophoren-kodierten Proteine, welche durch die MS-Untersuchung mit hoher Konfidenz identifiziert wurden, entspricht die Zahl einem Viertel des gesamten Chromatophoren-Proteoms. Die Reinheit der isolierten Chromatophoren wurde durch die Abwesenheit von Markerproteinen für das Cytoskelett, das ER, die Mitochondrien und Peroxisomen bestätigt. Zudem wurden in den 100 kernkodierten Proteinen, die im Lysat die höchste Ionenintensitäten aufwiesen, nur zwei Proteine auch in isolierten Chromatophoren detektiert (siehe Tabelle S1, grün markiert). Dabei handelt es sich um eine  $\beta$ -Carboanhydrase sowie um Polyubiquitin. Beide Proteine waren in den Chromatophoren im Vergleich zum Lysat jedoch abgereichert. Dabei könnte zumindest für Polyubiquitin eine spezifische Interaktion mit der äußeren Membran der Chromatophoren möglich sein, denn in Mitochondrien und Plastiden konnte bereits gezeigt werden, dass die Polyubiquitinierung von Proteinen an der Regulation der Proteinzusammensetzung der jeweils äußeren Membran beteiligt ist (Alonso *et al.*, 2003; Ling *et al.*, 2012). Eine ähnliche Funktion von Ubiquitin könnte auch für die Chromatophoren möglich sein. Ob die in Chromatophoren identifizierte  $\beta$ -Carboanhydrase mit der äußeren Membran des Organells interagiert ist nicht klar. Das Protein konnte jedoch während erster MS-Untersuchungen von angereicherten Membranproteinen aus isolierten Chromatophoren identifiziert werden (Oberleitner, mündliche Mitteilung), was auf eine mögliche spezifische Interaktion hindeutet. Was für eine Funktion es dort hat, ist bisher jedoch nicht klar.

Da die Chromatophoren ein großes Volumen innerhalb der Zelle einnehmen (siehe Abbildung 2.2-1A), wurde eine moderate Anreicherung der detektierten Proteine (berechnet mit  $\text{Int}_C - \text{Int}_L > 0$ ) als ausreichend betrachtet um ein Wirts-kodiertes Protein als wahren Importkandidaten zu klassifizieren. Dabei konnten mithilfe dieses Kriteriums zwei Klassen von importierten Proteinen identifiziert werden: die kurzen und die langen Importkandidaten.

### 3.2 Lange importierte Proteine

Durch die MS-Untersuchung konnten 60 Proteine mit einer Länge von mehr als 268 AS als Importkandidaten identifiziert werden. Die meisten dieser Proteine spielen eine Rolle im primären Metabolismus der Zelle. Zudem konnte erstmals experimentell gezeigt werden, dass viele der Importkandidaten spezifisch Lücken in Chromatophoren-lokalisierten Biosynthesewegen auffüllen und somit zur Vervollständigung von chimären metabolischen Stoffwechselwegen des Chromatophors beitragen. Die Tatsache, dass alle HK langen Importkandidaten sowie die meisten der NK langen Importkandidaten eine konservierte Sequenz im N-terminalen Bereich des Proteins aufweisen, welche nicht in orthologen Proteinen in anderen Spezies vorhanden ist, deutet auf einen gemeinsamen Importmechanismus der Proteine hin. Die zehn Importkandidaten, die kein crTP aufweisen, könnten hingegen in einem crTP-unabhängigen Prozess in die Chromatophoren importiert werden. So ist zum Beispiel bekannt, dass die meisten Proteine der äußeren Plastidenmembran in diese integriert werden, obwohl sie kein absplittbares cTP aufweisen (Hofmann & Theg 2005). Jedoch wiesen nur insgesamt zwei der zehn Proteine eine Transmembrandomäne auf. Eine andere Möglichkeit besteht darin, dass diese Importkandidaten mit Proteinen der äußeren Chromatophorenmembran oder der Membran selbst interagieren und somit bei der Isolation der Organellen zusammen mit diesen aufgereinigt werden. Eine Möglichkeit, diese Proteine von den tatsächlichen Importkandidaten zu unterscheiden bestünde in der externen Biotinylierung der isolierten Chromatophoren oder dem extrazellulären Proteaseverdau. Beide Ansätze konnten während der Arbeit jedoch nicht umgesetzt werden. Die Biotinylierung von externen Proteinen resultierte auch in der Markierung von Matrixproteinen. Dies könnte daran liegen, dass die Integrität der Membran während der Isolation der Chromatophoren gestört wird, sodass sie durchlässig für das sonst Membran-impermeable EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin wird. Bereits bei früheren Untersuchungen der Ultrastruktur von isolierten Chromatophoren mithilfe der Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) konnte die Intaktheit der äußeren Chromatophorenmembran nicht mit Sicherheit bestimmt werden (Nowack, Dissertation 2009). Um diese Frage zu beantworten, könnten die Ultrastruktur der Chromatophoren, welche mit der in dieser Arbeit beschriebenen Methode isoliert wurden, ebenfalls mit TEM untersucht werden. Außerdem könnten Antikörper gegen Proteine der äußeren und inneren Chromatophorenmembran helfen, die Frage nach der Unversehrtheit der Membran zu beantworten. Auch der extrazelluläre Verdau isolierter Chromatophoren mit den Proteasen Thermolysin und Proteinase K konnte nicht erfolgreich etabliert werden, da es zu keinem Verdau von extern zugegeben Kontrollproteinen kam. Warum dies, trotz verschiedener untersuchter Bedingungen, der Fall ist, bleibt ungeklärt.

### 3.2.1 Importmechanismus langer Importkandidaten und Ursprung der crTPs

Durch Vergleich der crTP-Sequenzen mit öffentlichen Proteindatenbanken, konnten keine Sequenzähnlichkeiten oder konservierten Domänen identifiziert werden. Aus diesem Grund konnten bisher keine Hinweise auf einen potentiellen Ursprung der crTP-Sequenzen ermittelt werden. Für Transitpeptide, welche Präkursor-Proteine zu anderen Organellen leiten, wurde vorgeschlagen, dass sie aus beliebigen Sequenzen, welche transkribiert und translatiert wurden, entstanden sind. So konnte z. B. gezeigt werden, dass fast 3% von beliebig klonierten Sequenzen aus dem Genom von *E. coli* zum Targeting eines mitochondrialen Proteins in das Mitochondrium geführt haben, wenn diese statt des mTPs an den N-terminus des Proteins fusioniert wurden (Baker & Schatz 1987). Eine andere interessante Hypothese zum Ursprung von Transitpeptiden wurden erst kürzlich von Francis-André Wollman formuliert (Wollman 2016). Diese besagt, dass sich mTPs und cTPs möglicherweise aus AMPs entwickelt haben, welche die Wirtszelle zunächst zur Abwehr von bakteriellen Pathogenen produziert hat. Die Entwicklung eines Resistenzmechanismus des Bakteriums gegen die AMPs, durch den Import und die proteolytische Degradation der Proteine sowie die Fusion der AMP-Sequenzen an Wirtskodierte Gene durch die Reorganisation des Genoms des Wirts führten dabei zu der Entstehung von Fusionsproteinen, welche zu den sich evolvierenden Organellen geleitet werden konnten. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Tatsache, dass sowohl AMPs als auch TP's ähnliche Eigenschaften aufweisen, welche eine Interaktion mit der Zielmembran ermöglichen. So zeigen beide eine positive Ladung auf und sind in der Lage amphipathische  $\alpha$ -Helices in hydrophober Umgebung auszubilden. Ob die identifizierten crTPs aus *P. chromatophora* eine antimikrobielle Aktivität aufweisen, wurde nicht im Rahmen dieser Arbeit untersucht. Vergleicht man jedoch die Sequenzen der crTPs mit den potentiellen symbiotischen AMPs, welche in dieser Arbeit identifiziert wurden, kann keine Ähnlichkeit festgestellt werden. Da jedoch verschiedene Klassen von antimikrobiellen Peptiden unterschiedliche Sequenzeigenschaften aufweisen, kann eine antimikrobielle Aktivität der crTPs nicht ausgeschlossen werden.

Die Interpretation des crTPs als eine Sequenz, die das Targeting von Proteinen in das Chromatophor ermöglicht, basiert bisher ausschließlich auf der Korrelation der Lokalisation von Wirtskodierten Proteinen im Chromatophor und der Präsenz des crTPs im N-Terminus der entsprechenden Proteine. Dabei ist bisher unbekannt, welche Rolle das crTP bei dem Import der Proteine in das Chromatophor spielt. Zudem kann nicht mit Sicherheit bestimmt werden, ob das crTP nach dem Import der Proteine in das Chromatophor abgespalten wird, da die durch die MS-Untersuchung identifizierten Peptide sowohl aus dem Bereich des crTPs als auch aus dem konservierten Bereich der Proteine stammen. Auch ist nicht klar ob und welche zellulären Komponenten eine Rolle bei dem Import von langen Wirtskodierten Proteinen spielen. In Pflanzen sind molekulare Chaperone, wie die Hitzeschockproteine 70

(Hsp70), 90 (Hsp90) und 93 (Hsp93), sowie das Pflanzenhomolog von GroEL, Cpn60 an Import und Faltung der ankommenden Proteine innerhalb des Plastiden beteiligt (Kessler & Blobel 1996; Akita *et al.* 1997; Nielsen *et al.* 1997; Inoue *et al.* 2013). Ob molekulare Chaperone auch eine Rolle beim Import von Wirts-kodierten Proteinen in die Chromatophoren eine Rolle spielen ist bisher nicht klar. Die Proteine Hsp70 und Hsp93 wurden als Chaperone für den Import der kleinen Untereinheiten von PSI, PsaE und PsaK, vorgeschlagen (Mackiewicz *et al.*, 2012b). Homologe von beiden Proteinen sind auf dem Chromatophorengenom kodiert. Ein weiteres Chaperon, welches an dem Importprozess beteiligt sein könnte ist das Protein Hsp40, welches als Ko-Chaperon von Hsp70 (DnaJ in *E. coli*) fungieren könnte. Interessanterweise befindet sich eine Wirts-kodierte Form von Hsp40 unter den identifizierten Importkandidaten. Auch die Importmaschinerie, welche die Translokation der Proteine über die äußere und innere Chromatophorenmembran, sowie die Peptidoglycanschicht ermöglicht, bleibt bisher unbekannt. Da die genetische Modifikation von *P. chromatophora* noch nicht möglich ist, muss auf ein *in planta* System zurückgegriffen werden um Hinweise auf den Importmechanismus, sowie die beteiligten Komponenten zu erhalten. Erste Untersuchungen der Lokalisation nach heterologer Expression in *N. benthamiana* liefern Hinweise auf einen Import von crTP-fusionierten Fluoreszenzproteinen in die Plastiden der Tabakpflanze. Neben dem in dieser Arbeit untersuchten crTP von scaffold5513-m.48594 konnte der crTP-vermittelte Plastidenimport von Proteinen für zwei weitere crTPs bestätigt werden (scaffold2991-m.31974 und scaffold4793-m.44132, Hüren, Masterarbeit 2016). Dabei wies das crTP von scaffold2991-m.31974 (Sequenz 12 in Abb. 2.5-2 B) eine typische crTP-Sequenz auf, während das crTP von scaffold4793-m.44132 (Sequenz 24 in Abb. 2.5-2 B) verkürzt war und ausschließlich mit SVM und nicht mit HMM als Importkandidat vorhergesagt wurde. Diese Untersuchung deutet darauf hin, dass das Targeting zu Plastiden von *N. benthamiana* kein zufälliges Ereignis, sondern eine allgemeine Eigenschaft der crTPs ist. Obwohl gezeigt werden konnte, dass die Untersuchung in einem heterologen System nicht immer zu einer korrekten Lokalisation des untersuchten Proteins führt (Fuss *et al.*, 2013), suggeriert der Import der crTPs in Plastiden von *N. benthamiana* die Beteiligung gemeinsamer Komponenten im Chromatophor- und Plastidenimportmechanismus. Da die Länge und Sequenzeigenschaften von crTPs und cTPs sich jedoch stark voneinander unterscheiden, ist nicht klar ob die TOC/TIC-Maschinerie oder alternative Importwege, z.B. unter Beteiligung des Endomembransystems, den Import der crTPs vermitteln. Im Gegensatz dazu führte die heterologe Expression von PsaE in Fusion mit YFP zu einer cytoplasmatischen Lokalisation des Fusionsproteins in *N. benthamiana* Protoplasten. Dies deutet darauf hin, dass der *in planta* Importmechanismus für kurze Proteine entweder nicht funktional ist, oder der Import durch die Fusion des deutlich größeren YFP-Proteins an den C-Terminus des kurzen PsaE gestört wird.

### 3.2.2 *In silico* Vorhersage des Proteoms der Chromatophoren

Die Identifikation eines potentiellen N-terminalen Transitpeptids für die langen Importkandidaten in *P. chromatophora* ermöglichte die Entwicklung von Vorhersagemethoden mit deren Hilfe weitere Importkandidaten bestimmt und so eine Übersicht über weitere potentielle Chromatophoren-lokalisierte Proteine gewonnen werden konnten. Mithilfe von SVM (Grenzwert  $\geq 0.663$ ) und HMM (Grenzwert  $\geq$  zwei identifizierte Motive) konnten 291 Proteine als potentielle Importkandidaten vorhergesagt werden. Dabei zeigten die 291 vorhergesagten und die 209 MS-identifizierten Importkandidaten eine Überschneidung von 65 Proteinen. Während die kurzen Importkandidaten nicht vorhergesagt werden konnten, da sie kein crTP aufweisen, wurden 47 der 60 langen Importkandidaten identifiziert, was eine Sensitivität von 78% entspricht. Von den 13 Proteinen, die nicht identifiziert werden konnten weisen zehn kein crTP auf, während 3 ein sehr kurzes crTP besitzen, welches ausschließlich mit SVM identifiziert werden konnte. Zuletzt konnten mithilfe der *in silico* Vorhersage 18 der 62 Proteine identifiziert werden, für die nicht die vollständige Sequenzinformation der Transkripte vorhanden ist.

Wie bei den experimentell bestimmten Importkandidaten, konnte festgestellt werden, dass die vorhergesagten Proteine spezifisch Lücken in Chromatophoren-lokaliserten Biosynthesewegen und Prozessen auffüllen. Betrachtet man alle identifizierten Importkandidaten, so lässt sich feststellen, dass Wirts-kodierten Proteine am Metabolismus von AS, Kofaktoren und Nukleotiden, an Entgiftungsprozessen sowie dem Schutz gegen reaktive Sauerstoffspezies beteiligt sind. Die größte Gruppe besteht jedoch aus Proteinen, welche an der Prozessierung genetischer Information beteiligt sind. Hier konnten zahlreiche Importkandidaten, welche als Transkriptionsfaktoren annotiert sind, gefunden werden. Dies deutet darauf hin, dass die Kontrolle der Genexpression in Chromatophoren bereits, zumindest teilweise, von Wirts-kodierten Proteinen kontrolliert wird. Eine ähnliche Situation liegt in den heutigen Plastiden vor. Dort unterliegt die transkriptionale und posttranskriptionale Kontrolle von Plastiden-kodierten Proteinen sowohl importierten Wirts-kodierten Proteinen als auch der endogenen Genexpressionsmaschinerie der Plastiden (Allison 2000). Ob die als Transkriptionsfaktoren annotierten Importkandidaten nach dem Import in die Chromatophoren tatsächlich funktional sind, muss jedoch experimentell bestimmt werden. Ein weiterer interessanter Importkandidat ist das Homolog des pflanzlichen Tic32. Tic32 ist eine Komponente der TOC/TIC-Importmaschinerie in Plastiden und könnte auch in Chromatophoren an dem Import Wirts-kodierter Proteine beteiligt sein. Weitere experimentelle Untersuchungen sind jedoch notwendig um den genauen Importmechanismus zu entschlüsseln. Interessanterweise zeigen die Wirts-kodierten Importkandidaten eine klare Überrepräsentation von Plastiden-assoziierten GO-Termini, was auf eine konvergente Evolution der beiden photosynthetischen Organellen schließen lässt.

### 3.3 Kurze importierte Proteine

Neben den langen Wirts-kodierten Proteinen, welche in die Chromatophoren importiert werden, konnten 85 kurze Importkandidaten identifiziert werden. Diese sind alle kleiner als 90 AS und zeigen, im Gegensatz zu den langen Importkandidaten, keine gemeinsamen Sequenzmotive, welche den Import in die Chromatophoren vermitteln könnten. Dabei können die kurzen Importkandidaten grob in zwei funktionale Klassen unterteilt werden. Auf der einen Seite finden sich Proteine, welche vor allem an der Photosynthese oder der Photoprotektion beteiligt sind. Beispiele dafür sind die beiden PSI Untereinheiten PsaE und PsaK sowie vier *high light inducible* Proteine (HLP). Die größere Gruppe besteht jedoch aus Proteinen ohne Homologe in anderen Organismen. Stattdessen weisen diese Importkandidaten interessante Charakteristika auf, welche auf die potentielle Funktion der Proteine als AMPs hindeuten könnten. So besitzen zahlreiche Kandidaten Sequenzen mit aufeinanderfolgenden positiv geladenen AS sowie Cystein-Motive. AMPs spielen eine wichtige Rolle in der angeborenen Immunität und werden in zahlreichen, pro- und eukaryotischen, Organismen gefunden. AMPs können anhand der Sequenzeigenschaften und der Zusammensetzung der AS in verschiedene Kategorien unterteilt werden. Allen gemeinsam ist jedoch ihre antimikrobielle Wirkung gegen verschiedene eu- und prokaryotische Mikroorganismen. Dabei binden AMPs mittels elektrostatischer oder hydrophober Interaktionen an Membranen der Zielorganismen und bilden Poren, was zur Lyse der Zelle führt. Zusätzlich gibt es Hinweise, dass AMPs auch intrazelluläre Ziele aufweisen könnten und die Zelle z.B. durch die Inhibition der Translation oder der Transkription töten (Hale & Hancock 2007; Brogden 2005). Zunehmend rückt jedoch auch die Bedeutung symbiotischer AMPs in zahlreichen, phylogenetisch nicht verwandten Wirt-Endosymbiont-Interaktionen in den Fokus (Login *et al.*, 2011; Shigenobu and Stern, 2013; Maróti *et al.*, 2015). So exprimiert z.B. die Pflanze *Medicago truncatula* mehr als 700 Cystein-reiche Peptide in ihrem symbiotischen Organ (Graham *et al.*, 2004; Mergaert *et al.*, 2003; Silverstein *et al.*, 2007), welche zum Endosymbionten geleitet werden und ein breites Spektrum an *in vitro* antimikrobieller Aktivität aufweisen, den bakteriellen Endosymbionten *Sinorhizobium in vivo* jedoch nicht töten (Ordögh *et al.* 2014; Tiricz *et al.* 2013). Stattdessen inhibieren die NCRs (für *nodule specific, cystein-rich peptides*) die Teilung des Endosymbionten und spielen eine Rolle in der terminalen Differenzierung des Bakteriums, die es ihm ermöglicht anorganischen Stickstoff zu fixieren (Farkas *et al.*, 2014; Mergaert *et al.*, 2006; Van de Velde *et al.*, 2010). Andere Beispiele sind das Coleopteracin A (COLA) aus den *Sitophilus*-Käfern oder die Bacteriocyten-spezifischen Cystein-reichen (BCR) Proteine der Blattläuse, welche speziell in den Bacteriozyten, den Endosymbionten-tragenden Organellen, der Insekten exprimiert und zu den bakteriellen Endosymbionten geleitet werden (Shigenobu & Stern 2013; Login *et al.* 2011). Ob die kurzen Importkandidaten ohne Homologe in anderen Organismen antimikrobielle Peptide darstellen könnten, wird im Folgenden diskutiert.

### 3.3.1 Antimikrobielle Eigenschaften von kurzen Importkandidaten

Um die antimikrobielle Aktivität der kurzen Importkandidaten zu untersuchen, wurden vier Peptide mit unterschiedlichen Sequenzeigenschaften für eine Überexpression in *E. coli* ausgewählt. Dabei wiesen zwei Peptide, PcAMP1 und PcAMP2 eine insgesamt positive Ladung auf, während PcAMP3 neutral und PcAMP4 negativ geladen waren. Zudem enthielten alle ausgewählten Peptide außer PcAMP4 Cystein-Motive, während PcAMP2 und PcAMP3 zusätzlich Abschnitte mit jeweils 3-4 positiv geladenen AS in Folge aufwiesen. Für alle untersuchten Peptide konnten Bereiche mit  $\alpha$ -helikaler Konformation vorhergesagt werden, jedoch zeigten bekannte AMPs wie das Mellitin aus der Biene *Apis mellifera*  $\alpha$ -helikale Bereiche mit deutlich höherem hydrophobem Moment. Die hydrophoben Momente der untersuchten Peptide zeigten vergleichbare Werte wie Transmembrandomänen von Proteinen, jedoch mit einer insgesamt geringeren Hydrophobizität. Da Transmembrandomänen in biologische Membran inserieren, könnten die Werte auf eine mögliche Interaktion der untersuchten Peptide mit Membranen hindeuten.

Um die antimikrobielle Aktivität der vier Peptide zu testen, wurden diese nach der Überexpression mithilfe des His-Tags aufgereinigt und in verschiedenen Konzentrationen extern zu *E. coli* Zellen hinzugegeben. Dabei zeigten die positivgeladenen Peptide PcAMP1 und PcAMP2 einen starken wachstumshemmenden Effekt auf *E. coli*, wobei die minimale inhibitorische Konzentration bei 5 bzw. 10  $\mu$ M lag. Im Gegensatz dazu zeigte das neutralgeladene Peptid PcAMP3 einen geringeren Effekt mit einer höheren inhibitorischen Konzentration von 20  $\mu$ M, während das negativgeladene PcAMP4 in Konzentrationen bis 40  $\mu$ M keinen Effekt auf das Wachstum von *E. coli* hatte. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass, ähnlich wie in den NCR-Peptiden oder anderen AMPs, die antimikrobielle Aktivität vor allem auf der positiven Ladung der Peptide beruht (Dathe *et al.*, 2001; Giangaspero *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2008; Maróti *et al.*, 2015). Die erhöhte Aufnahme von Propidiumiodid nach Behandlung von *E. coli* mit PcAMP1 und mit höheren Konzentration von PcAMP3 könnte Hinweise auf einen potentiellen Wirkungsmechanismus der Peptide liefern. So wurden für die positiv geladenen NCR-Peptide aus *M. truncatula*, als auch für das Coleopteracin A (ColA) aus dem *Sitophilus*-Käfer eine Membran-permeabilisierende Wirkung gezeigt (Carro *et al.* 2015; Tircz *et al.* 2013). Einen ähnlichen antimikrobiellen Mechanismus könnte man sich auch für die *Paulinella*-kodierte AMPs vorstellen. Es ist bis jetzt jedoch nicht klar, ob die erhöhte PI-Aufnahme tatsächlich auf eine AMP-verursachte erhöhte Membranpermeabilität oder auf sekundäre Effekte, als Folge auf die Veränderungen in der Zelle, zurückzuführen sind.

Eine Interaktion der kationischen PcAMPs mit typischen negativ geladenen bakteriellen Lipiden, wie dem Phosphatidylglycerol oder dem Cardiolipin, konnte nicht nachgewiesen werden. Die äußere

Membran von gramnegativen Bakterien, wie *E. coli*, ist asymmetrisch aufgebaut. Dabei besteht die äußere Lipidschicht der äußeren Membran aus Lipopolysacchariden (LPS), während Phospholipide, wie das Phosphatidylglycerol, in der inneren Lipidschicht zu finden sind (Doerrler 2006). Daher ist es möglich, dass die antimikrobielle Aktivität der PcAMPs auf der Interaktion mit der LPS-Schicht beruht, wie es bereits für andere AMPs gezeigt werden konnte (Ding *et al.*, 2003; Majerle *et al.*, 2003). Eine andere Erklärung für die fehlende Interaktion der PcAMPs mit bakteriellen Lipiden könnte darin bestehen, dass mehrere unterschiedliche Lipide für die Bindung der PcAMPs benötigt werden. Hier wird man durch den durchgeführten Assay limitiert, da dieser nicht die Situation in biologischen Membranen widerspiegeln kann, denn hier kann immer nur die Interaktion mit jeweils einem einzigen Lipid untersucht werden. Die Lipidzusammensetzung der äußeren und inneren Membran von Cyanobakterien unterscheidet sich von der anderer gramnegativer Bakterien. Die innere Membran besteht hauptsächlich aus Glycoglycerolipiden wie dem Monogalactosyldiacylglycerol, Digalactosyldiacylglycerol und Sulfoquinovosyldiacylglycerol sowie dem Phospholipid Phosphatidylglycerol, während die äußere Membran zusätzlich das LPS enthält (Wada & Murata, 1998). Diese unterschiedliche Membranzusammensetzung könnte eine mögliche Erklärung für die fehlende antimikrobielle Aktivität der PcAMPs auf die untersuchten *S. elongatus* PCC 7942 Zellen liefern. Sollte die Interaktion der PcAMPs jedoch tatsächlich auf Komponenten der LPS beruhen, könnten Unterschiede in der Zusammensetzung eine mögliche Erklärung für die fehlende Aktivität liefern. So enthält das LPS von Cyanobakterien eine geringere Anzahl an Phosphatgruppen verglichen mit dem LPS anderer gramnegativer Bakterien (Schmidt *et al.* 1980). Diese sorgen unter anderem für die negative Ladung des LPS, welche für die elektrostatische Interaktion mit kationischen AMPs benötigt wird. Aufgrund der nahen Verwandtschaft zu den Chromatophoren, könnten jedoch auch höhere Konzentration der PcAMPs für eine antimikrobielle Wirkung benötigt werden. Welche Funktion die PcAMPs in der Zelle ausüben ist nicht bekannt, jedoch kommt es nicht zur Lyse der Organellen innerhalb der Wirtszelle, was auf eine erhöhte Resistenz gegenüber den PcAMPs hindeuten könnte. Welche intrazellulären Konzentrationen die PcAMPs aufweisen wurde nicht im Rahmen dieser Arbeit untersucht und muss experimentell bestimmt werden.

Zudem ist bisher nicht klar, welchen Effekt die PcAMPs auf die intrazellulären Chromatophoren aufweisen oder wie sich die Chromatophoren vor der antimikrobiellen Aktivität der Proteine schützen. So konnte in der *Medicago-Sinorhizobium*-Interaktion gezeigt werden, dass Peptidkonzentrationen von 1 bis 4  $\mu\text{M}$  nicht letal für den Endosymbionten sind, jedoch dessen Elongation und Genomamplifikation induzieren. Zudem konnte das bakterielle BacA Protein identifiziert werden, welches die Membranpermeabilisation und das Töten der Zelle durch NCR-Peptide *in vitro* reduziert (Haag *et al.* 2011). Wie genau die Zellen durch das Protein geschützt werden ist bis jetzt jedoch nicht klar (Kondorosi *et al.*, 2013; Alunni and Gourion, 2016). BacA-ähnliche Proteine werden in mehreren

pathogenen Organismen wie *Brucella abortus* und *Mycobacterium tuberculosis* gefunden, wo sie für eine anhaltende Infektion des Wirts benötigt werden (Domenech *et al.*, 2009; LeVier *et al.*, 2000). Das BacA Protein aus *S. meliloti* sowie das homologe Protein SbmA aus *E. coli* sind Transporter und bestehen aus einer TMD (LeVier & Walker 2001). Die genaue Funktion des Proteins ist nicht genau bekannt, es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Transporter diverse strukturell unterschiedliche Peptide internalisieren können (Ghosal *et al.*, 2013; Marlow *et al.*, 2009; Mattiuzzo *et al.*, 2007). Ob ähnliche Proteine im Chromatophor zu finden sind und das Organell vor der Aktivität der AMPs schützen können ist unklar und muss experimentell bestimmt werden.

### 3.3.2 Importmechanismus und potentielle Rolle kurzer Importkandidaten

Interessanterweise zeigt das positiv geladene Protein PcAMP1 eine Interaktion mit dem negativ geladenen Lipid PtdIns(4)P. Dabei scheint das Protein spezifisch an das Lipid zu binden, da keine Interaktion bei weiteren negativ geladenen Lipiden, wie dem Phosphatidylglycerol, Cardiolipin oder den anderen Phosphatidylinositol-Spezies, detektiert werden konnte. Obwohl zahlreiche weitere Untersuchungen notwendig sind, könnte diese Interaktion erste Hinweise auf einen potentiellen Importmechanismus der kurzen Wirts-kodierten Proteine in die Chromatophoren liefern. Die Untersuchung der Lokalisation von PsaE, welches ebenfalls zu den kurzen Importkandidaten gehört, lieferte bereits Hinweise auf eine mögliche Beteiligung des Golgi-Apparates bei dem Import der kleinen PSI-Untereinheit (Nowack & Grossman, 2012). Auch bei dem Import von AMPs könnte der Golgi-Apparat eine Rolle spielen, denn das Lipid PtdIns(4)P wird in Hefe vor allem in der Golgi-Membran, in geringeren Mengen auch in der Plasmamembran, gefunden (Balla & Balla, 2006; Cockcroft *et al.*, 1985). Im Golgi spielt es vor allem eine Rolle bei dem retrograden Transport vom Golgi zum ER und dem anterograden Transport vom Golgi zur Plasmamembran und wird dabei für die Formation von sekretorischen Vesikeln benötigt (Audhya *et al.*, 2000; Mizuno-Yamasaki *et al.*, 2010). Viele Proteine wurden als Interaktionspartner von PtdIns(4)P identifiziert. Diese können hauptsächlich in zwei Klassen unterteilt werden. Die erste Klasse besteht aus Lipid-Transfer-Proteinen, welche an dem nicht-vesikulärem Transport von Lipiden beteiligt sind. Die zweite Klasse beinhaltet Adaptor und Coat-Komplexe. In *P. chromatophora* könnte das Lipid mit der negativ geladenen Phosphatgruppe als erste Kontaktmöglichkeit von kationischen AMPs mit der Golgi-Membran dienen. So könnte die Interaktion der kationischen PcAMPs mit dem Lipid ein Signal darstellen, welches zur Translokation der Proteine in die Zisternen des Golgi dient, von wo aus sie weiter zu den Chromatophoren transportiert werden könnten. So konnte für einige kationische NCR-Peptide aus *M. truncatula* eine Translokation über die bakterielle Membran gezeigt werden, welche nicht in einer erhöhten Membranpermeabilität resultierte (Farkas *et al.* 2014). Ob der Golgi-Apparat tatsächlich an dem Transport von kurzen

Importkandidaten, inklusive der PcAMPs, beteiligt ist, muss im Weiteren experimentell bestimmt werden.

In Pflanzenzellen ist PtdIns(4)P das am meisten vorkommende Phosphatidylinositol-Molekül (Krinke *et al.* 2007; Munnik & Vermeer 2010) und wird unter anderem auch in der Plastidenmembran gefunden (Bovet *et al.*, 2001). Welche Rolle es dort spielt ist bisher nicht vollkommen klar, jedoch implizieren Untersuchungen aus dem Jahr 2015 eine Beteiligung von PtdIns(4)P an der negativen Regulation der Teilung von Plastiden (Okazaki *et al.*, 2015). Da PtdIns(4)P auch in der Plastidenmembran gefunden wird, könnte die Lokalisation des Lipids auch in den Membranen der Chromatophoren vermutet werden. Auch hier könnte es als erste Kontaktmöglichkeit der positiv geladenen PcAMPs mit der Organellenmembran dienen. So wurde für das symbiotische AMP CoLA aus den *Sitophilus*-Käfern eine Lokalisation des Proteins in der Membran des Endosymbionten gezeigt (Login *et al.* 2011). Auch diverse NCR-Peptide lokalisieren in der Membran, aber auch im Cytosol der Endosymbionten (Maróti *et al.*, 2015). Welche Funktion die symbiotischen AMPs im Endosymbionten ausüben und wie der Wirkungsmechanismus im Detail aussieht ist bisher nicht vollständig geklärt. Für das CoLA konnte gezeigt werden, dass es das Wachstum des Endosymbionten reguliert, indem es die Teilung der Zellen inhibiert (Login *et al.* 2011). Auch die NCR-Peptide sind an der Regulation der Teilung und der Differenzierung der bakteriellen Endosymbionten beteiligt. Dabei äußert sich deren Funktion vor allem in der Inhibierung der Zellteilung, der Größenzunahme der Endosymbionten und der Amplifizierung des bakteriellen Genoms (Mergaert *et al.*, 2006; Van de Velde *et al.*, 2010). Interessanterweise korrelieren diese Beobachtungen mit Daten aus Untersuchungen von nicht symbiotischen AMPs, in denen gezeigt werden konnte, dass zahlreiche AMPs das filamentöse Wachstum von Bakterien induzieren, was auf eine Funktion der Peptide bei der Cytokinese hindeutet (Chauhan *et al.*, 2006; Rosenberger *et al.*, 2004). Eine ähnliche Rolle könnte man sich auch für die antimikrobiellen Peptide aus *P. chromatophora* vorstellen. Hier scheint die Anzahl der Chromatophoren pro Zelle einer strengen Kontrolle zu unterliegen. Zudem sind die Chromatophoren deutlich größer als ihre nahverwandten cyanobakteriellen Spezies und es gibt Hinweise auf die Polyploidie des Chromatophorengenoms (Nowack *et al.* 2016). Ob diese Beobachtungen auf die Aktivität der PcAMPs zurückzuführen sind wurde nicht im Rahmen dieser Arbeit untersucht und muss experimentell bestimmt werden. Außerdem ist bisher nicht klar, ob das Phosphatidylinositol-4-Phosphat in der Chromatophorenmembran vorhanden ist und ob es zu einer Interaktion der Chromatophoren mit den PcAMPs kommt. Interessanterweise konnte für das antimikrobielle Peptid 5 der Erle *Alnus glutinosa* (Ag5) eine Beteiligung an der Freisetzung von Stickstoff-reichen Metaboliten (z.B. Glutamin und Glutaminsäure) aus den endosymbiotischen *Frankia*-Bakterien gezeigt werden (Carro *et al.* 2015). Auch die *Paulinella*-kodierte AMPs könnten eine ähnliche Funktion ausführen und so die fehlenden Metabolit-Transporter ersetzen. Sollten die PcAMPs Poren in die Chromatophorenmembran bilden,

müssten jedoch einige mechanistische Aspekte bedacht werden, denn die Bildung von Poren würde zu einem Verlust der Barrierefunktion und zu einer unkontrollierten Freisetzung von Metaboliten führen. Modellierungen der AMP-induzierten Freisetzung von Molekülen mithilfe von synthetischen Vesikeln zeigen jedoch ein langsames und transientes Ausströmen, anstelle einer schnellen und vollständigen Freisetzung. Diese Beobachtung wird mithilfe des *interfacial activity* Modells erklärt, bei dem von einer transienten Störung der Membran ausgegangen wird (Wimley 2010), welches das Überleben der Chromatophoren und einen kontrollierten Metabolitenaustausch erklären könnte (Mergaert *et al.*, 2017).

Obwohl nur die kationischen PcAMPs eine antimikrobielle Aktivität und eine Interaktion mit PtdIns(4)P aufweisen, zeigt die MS-Untersuchung des Chromatophoren-Proteoms, dass auch negativ und neutral geladene PcAMPs in den Chromatophoren gefunden werden. Wie diese Proteine in das Organell gelangen ist bisher nicht klar. Während positiv geladene Proteine mit der Membran interagieren und selbstständig über diese translozieren könnten, könnte die Translokation von neutral und negativ geladenen AMPs möglicherweise nur in Anwesenheit von kationischen AMPs stattfinden. Eine andere Möglichkeit könnte darin bestehen, dass die intrazellulären Chromatophoren andere Membraneigenschaften als die frei-lebenden *E. coli* Zellen aufweisen, welche ihnen die Aufnahme der PcAMPs ermöglichen. Wie die symbiotischen AMPs in anderen Systemen in die bakteriellen Endosymbionten gelangen ist bisher ebenfalls nicht vollständig geklärt. So verbleiben endosymbiotische *S. meliloti* Zellen in sogenannten Symbiosomen innerhalb von *M. truncatula* Zellen und sind somit von der eigenen Membran sowie der pflanzlichen Symbiosomenmembran umgeben. Zwar tragen die NCR-Proteine aus *M. truncatula* N-terminale Signalpeptide, welche die Proteine zum ER und anschließend zu der Membran der symbiotischen Organellen leiten könnten, wie die Proteine jedoch in die Membran und das Cytosol der Endosymbionten gelangen ist nicht geklärt.

### 3.4 Reorganisations-Prozess des Proteoms der Chromatophoren

Interessanterweise konnten nur für 17 der 433 Importkandidaten ein potentieller Ursprung durch EGT festgestellt werden, während die Mehrheit der Importkandidaten, mit 390 Proteinen, vom Wirt abstammen scheinen oder der phylogenetische Ursprung nicht klar zu bestimmen ist (Nowack *et al.*, 2016; Nowack *et al.*, 2008; Nowack *et al.*, 2011). Dies deutet darauf hin, dass der Re-Import von Genprodukten, von zuvor aus dem Endosymbionten transferierten Genen, nur eine vergleichsweise geringe Rolle in der frühen Integration des Organells in das System der Wirtszelle spielt. Stattdessen scheint der Import von Wirts-kodierten Proteinen die vom Chromatophor verlorenen Funktionen zu ersetzen oder neue Funktionen hinzuzufügen. 26 weiteren Importkandidaten konnte ein Ursprung durch horizontalen Gentransfer aus diversen Bakterien zugeordnet werden. Dieses Ergebnis unterstützt die bereits zuvor postulierte Hypothese, welche die Fixierung von horizontal transferierten

Genen von Beutebakterien erklären könnte. Diese besagt, dass die Reduktion des Chromatophorengenoms während einer mixotrophen evolutionären Phase, die Fixierung von bestimmten HGT-Genen begünstigt haben könnte. Dabei wurden vor allem Gene fixiert, welche die Kompensation von bereits verlorenen Funktionen des Chromatophoren ermöglichten (Nowack *et al.*, 2016). Zudem wurden mehrere Situationen identifiziert, bei denen sowohl ein Wirts- als auch ein Chromatophoren-kodiertes Protein, welches die gleiche enzymatische Funktion aufweist, im Chromatophor lokalisiert. Eine solche Konstellation würde es einer der Kopien erlauben, Mutationen anzuhäufen und schließlich verloren zu gehen. Solche Situationen wurden als Intermediat des Gentransfers postuliert (Doolittle 1998) und könnte zur weiteren Reduktion des Chromatophorengenoms führen. Betrachtet man das Beispiel des cyanobakteriellen CysK-Proteins, so wird deutlich, dass nicht jedes transferierte Protein die Information erhält, welche das Re-Targeting in das Chromatophor ermöglicht. Stattdessen können der Gentransfer sowie die Reorganisation des Wirtsgenoms zum Erwerb von neuen funktionalen Domänen führen. Ein Beispiel dafür ist die neu erworbene Domäne mit Rossmann-Faltung im C-Terminus des CysK-Proteins.

### 3.5 Elemente der parallelen Evolution in anderen endosymbiotischen Interaktionen

Die Integration von Chromatophoren in die Wirtszelle zeigt viele Parallelen zu der Integration von nicht-photosynthetischen Endosymbionten, welche in diversen Eukaryoten gefunden werden (Dubilier *et al.*, 2008; Moya *et al.*, 2008; Nowack and Melkonian, 2010). So kann in vielen Endosymbionten, wie auch in den Chromatophoren, eine starke Reduktion des Genoms beobachtet werden. Diese kann dabei so massiv sein, dass sie der Reduktion des Genoms in Mitochondrien und Plastiden ähnelt (McCutcheon & Moran 2011). Ein Beispiel dafür ist das Genom von *Candidatus Tremblaya princeps*, welches aus nur 138927 Basenpaaren und 121 Protein-kodierenden Sequenzen besteht (McCutcheon & von Dohlen 2011). Ähnlich wie in *P. chromatophora*, scheinen Wirts-kodierte Proteine für den Verlust von Genen aus dem Endosymbionten zu kompensieren (McCutcheon & von Dohlen 2011; Hansen & Moran 2011). Einige dieser Wirts-kodierten Gene scheinen ihren Ursprung im horizontalen Gentransfer aus diversen Bakterien zu haben. So konnten im Genom der Erbsenlaus, welche das Gammaproteobakterium *Buchnera aphidicola* als Endosymbionten beherbergt, zwölf Gene/Genfragmente bakteriellen Ursprungs identifiziert werden. Sieben dieser zwölf Gene werden in den Bakteriozyten der Erbsenlaus stark exprimiert, was auf eine Rolle in der Symbiose hindeutet (Nikoh *et al.* 2010). Umfangreicher endosymbiotischer Gentransfer scheint hingegen keine nennenswerte Rolle bei der Integration der Endosymbionten zu spielen. So konnten im Kerngenom in der Erbsenlaus nur zwei nicht-funktionale Pseudogene, welche ihren Ursprung im endosymbiotischen Gentransfer haben könnten, identifiziert werden (Nikoh *et al.* 2010). Anders als in *P. chromatophora*, lieferte die massenspektrometrische Untersuchung des Proteoms von *B. aphidicola* zunächst keinen Hinweis auf

den Austausch von Proteinen zwischen den zwei Interaktionspartnern (Poliakov *et al.* 2011). Bei näheren Immunoblot- und Immunomikroskopie-Untersuchungen mit spezifischen Antikörpern konnte jedoch der Import eines 21 kDa großen Proteins mit bakteriellem Ursprung in den Endosymbionten *Buchnera* gezeigt werden (Nakabachi *et al.* 2014). Neben dem Import dieses kleinen Proteins mit bisher unbekannter Funktion, konnte bisher nur der bereits beschriebene Import von symbiotischen AMPs in bakterielle Endosymbionten gezeigt werden. Dabei bleibt das Ausmaß des Proteinimportes, um genauer zu sein, der Import von größeren Proteinen, sowie der Importmechanismus in allen untersuchten Systemen bisher unbekannt. Jedoch legen diese Untersuchungen, sowie die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass die Kompensation von Endosymbiont-kodierten Proteinen durch den Import Wirts-kodierter Proteine mit diversen phylogenetischen Ursprüngen ein weitreichendes Phänomen darstellen könnte.

### 3.6 Ausblick

In dieser Arbeit konnte der massive Import von Wirts-kodierten Proteinen in die evolutionär jungen Organellen der Alge *P. chromatophora* gezeigt werden. Dabei konnten die importierten Proteine in zwei Klassen unterteilt werden: die kurzen und die langen Importkandidaten. Während die langen Importkandidaten ein putatives Chromatophoren-Transitpeptid besitzen, zeigen die kurzen Importkandidaten keine gemeinsamen Sequenzmotive, welche auf die Präsenz eines Targetingsignals hindeutet. Wie die Wirts-kodierten Proteine jedoch in die Chromatophoren importiert werden ist bisher nicht klar und sollte in weiterführenden Experimenten untersucht werden.

Um den Import Wirts-kodierter Proteine besser zu verstehen, sollten die am Import beteiligten Komponenten identifiziert werden. Erste Hinweise auf die beteiligten Transporter könnte die Untersuchung des Proteoms der äußeren und inneren Chromatophorenmembran liefern. Hier besteht die Schwierigkeit jedoch darin, genügend Ausgangsmaterial für die Untersuchung zu erhalten. Dafür sollten die äußere und die innere Chromatophorenmembran von den Thylakoidmembranen getrennt werden, was nur durch eine hohe Ausgangsbiomasse des eingesetzten Materials erreicht werden kann. Die Menge der isolierten Membranen wird jedoch durch das langsame Wachstum von *P. chromatophora* limitiert. Eine andere Möglichkeit besteht darin ein Hefe-Zwei-Hybrid-Screening mit einer cDNA-Bibliothek von *P. chromatophora* durchzuführen, bei der potentielle crTP-Interaktionspartner identifiziert werden könnten. Es könnte auch auf das System der Pflanze zurückgegriffen werden um erste Hinweise auf die am Import beteiligten Komponenten zu erhalten. Erste Untersuchungen der Lokalisation zeigten den crTP-vermittelten Import von Proteinen in die Plastiden von *N. benthamiana*, was auf gemeinsame Komponenten in der Chromatophor- und Plastidenimportmaschinerie hindeutet. Wie genau der Import stattfinden, ob der TOC/TIC-Apparat oder das Endomembransystem am Import beteiligt sind, ist nicht klar. Um die Beteiligung des ER und

des Golgi-Apparates zu untersuchen könnte die Retention des untersuchten Proteins während der Expression in *N. benthamiana* in jeweils beiden Organellen veranlasst werden. Dies könnte durch die Fusion eines ER-Retentionssignals an das Protein oder den Einsatz von Brefeldin A, welches die Formation von sekretorischen Vesikeln am Golgi inhibiert, erreicht werden. Um die Beteiligung des TOC/TIC-Apparates beim Import von Proteinen zu untersuchen, werden häufig Kompetitionsassays mit dem Präkursor der kleinen Untereinheit von RuBisCO in *in vitro* Import Assays herangezogen (Tranel *et al.*, 1995; Tu *et al.*, 2004). Ähnliche Untersuchungen könnten durchgeführt werden, um den Mechanismus des crTP-Importes in die Plastiden von *N. benthamiana* zu entschlüsseln.

Erste Hinweise auf den Import von kurzen Importkandidaten, insbesondere der potentiellen kationischen antimikrobiellen Peptide, könnte die Interaktion der Proteine mit dem Lipid Phosphatidylinositol-4-Phosphat geliefert haben. Ob das Lipid auch in der Chromatophorenmembran vorhanden ist und ob die PcAMPs tatsächlich Poren in der Membran bilden, konnte im Rahmen dieser Arbeit nicht untersucht werden. Im ersten Schritt könnte hier die Lipidzusammensetzung der inneren und äußeren Chromatophorenmembran mithilfe der MS bestimmt werden. Dies könnte als Grundlage für weiterführende Experimente mit *giant unilamellar* Vesikeln (GUV) dienen, mit deren Hilfe die Interaktion der PcAMPs mit Membranen genauer charakterisiert werden kann. Sollte es zu der Bildung von Poren und zur Freisetzung von Molekülen durch die PcAMPs kommen, kann des Weiteren der Durchmesser der entstandenen Poren durch die Inkorporation von fluoreszierenden Partikeln mit unterschiedlichen Größen während der Herstellung von GUVs und der anschließenden Detektion der Molekül-Freisetzung bestimmt werden. Um die vorgeschlagenen Versuche durchführen zu können, sollten die untersuchten PcAMPs mit einem Fluorophor markiert werden, damit die Membraninteraktion mithilfe eines Fluoreszenzmikroskops untersucht werden kann. Dafür könnten z.B. FITC-fusionierte Proteine synthetisch hergestellt werden, wobei drauf geachtet werden sollte, dass die generierten Proteine eine Löslichkeit in wässrigen Lösungen aufweisen. Von einer Markierung der Proteine mit N-Hydroxysuccinimid (NHS)-konjugierten Fluorophoren sollte abgesehen werden, da diese an primäre Amine, wie sie in der Seitenkette von Lysin vorkommen, binden. Durch die Konjugation könnte es zur Maskierung von positiven Ladungen kommen, auf denen die Interaktion der kationischen PcAMPs mit negativ geladenen Membrankomponenten vermutlich beruht.

## 4 Material und Methoden

### 4.1 Material

#### 4.1.1 Chemikalien

Alle in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen Ambion, Amersham, Applichem GmbH, BioRad, Biozym Scientific GmbH, Carl Roth, Difco, Duchefa, GE Healthcare, Invitrogen (Life Technologies), Merck, Roche, Serva, Sigma-Aldrich, Thermo Fisher Scientific und VWR bezogen.

#### 4.1.2 Kulturmedien

##### 4.1.2.1 Kultivierung von *Escherichia coli*

Die Kultivierung von *E. coli* erfolgte in LB-Flüssigmedium und auf LB-Festmedium.

**Tabelle 4.1-1 Zusammensetzung des LB-Mediums für die Kultivierung von *E. coli***

| Zusätze     | LB-Flüssigmedium | LB-Festmedium |
|-------------|------------------|---------------|
| Trypton     | 10 g             | 10 g          |
| Hefeextrakt | 5 g              | 5 g           |
| NaCl        | 5 g              | 5 g           |
| Bacto Agar  | -                | 20 g          |

Nach dem Lösen der Zusätze in 1L H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> wurde das Medium bei 121 °C autoklaviert. Vor der Zugabe eines Antibiotikums zur Herstellung eines Selektionsmediums wurde das Medium zunächst auf ca. 50°C abgekühlt.

Antibiotika-Endkonzentrationen:

- Ampicillin: 100 µg/ml
- Spectinomycin: 50 µg/ml
- Chloramphenicol: 25 µg/ml

##### 4.1.2.2 Kultivierung von *Paulinella chromatophora*

Die Kultivierung von *P. chromatophora* erfolgte in WARIS-H-Flüssigmedium (McFadden & Melkonian, 1986), welches durch die Zugabe von 1,5 mM Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub> modifiziert wurde.

Tabelle 4.1-2 Zusammensetzung des Mediums für die Kultivierung von *P. chromatophora*

| Zusatz                                           | Konzentration in Medium |
|--------------------------------------------------|-------------------------|
| KNO <sub>3</sub>                                 | 1 mM                    |
| MgSO <sub>4</sub>                                | 81,1 mM                 |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 0,15 mM                 |
| Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>                | 0,42 mM                 |
| HEPES                                            | 1 mM                    |
| P-II-Metalle                                     |                         |
| EDTA (Triplex III)                               | 8,06 µM                 |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                   | 18,43 µM                |
| MnCl <sub>2</sub>                                | 0,73 µM                 |
| ZnSO <sub>4</sub>                                | 73 nM                   |
| CoCl <sub>2</sub>                                | 16.8 nM                 |
| Fe-EDTA                                          |                         |
| EDTA (Triplex II)                                | 17,86 µM                |
| FeSO <sub>4</sub>                                | 17.9 µM                 |
| Vitamine                                         |                         |
| Vitamin B12                                      | 0,15 nM                 |
| Biotin                                           | 4,10 nM                 |
| Thiamin-HCL                                      | 0.30 µM                 |
| Niacinamide                                      | 0,80 µM                 |
| Erdextrakt                                       | 10 ml/l                 |
| Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub>                 | 1,5 mM                  |

Nach dem Lösen der Komponenten in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> wurde das Medium durch die Zugabe von HCl auf einen pH von 7,0 eingestellt. Das Medium wurden vor Verwendung bei 121 °C autoklaviert.

#### 4.1.2.3 Kultivierung von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Kultivierung von *A. tumefaciens* erfolgte in YEB-Flüssigmedium und auf YEB-Festmedium.

Tabelle 4.1-3 Zusammensetzung des YEB-Mediums für die Kultivierung von *A. tumefaciens*

| Zusätze            | YEB-Flüssigmedium | YEB-Festmedium |
|--------------------|-------------------|----------------|
| Hefeextrakt        | 1 g               | 1 g            |
| Rindfleischextrakt | 5 g               | 5 g            |
| Pepton             | 5 g               | 5 g            |
| Saccharose         | 5 g               | 5 g            |
| MgSO <sub>4</sub>  | 0,5 g             | 0,5 g          |
| Bacto Agar         | -                 | 20 g           |

Nach dem Lösen der Zusätze in 1L H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> wurden die Medien bei 121 °C autoklaviert. Vor der Zugabe eines Antibiotikums zur Herstellung eines Selektionsmediums wurde das Medium zunächst auf ca. 50°C abgekühlt.

Antibiotika-Endkonzentrationen:

- Rifampicin: 150 µg/ml
- Gentamicin: 50 µg/ml
- Kanamycin: 50 µg/ml
- Spectinomycin: 100 µg/ml

#### 4.1.2.4 Kultivierung von *Synechococcus elongatus*

Die Kultivierung von *S. elongatus* erfolgte in BG11-Flüssigmedium und auf BG11-Festmedium.

| Zusätze                                                | BG11-Flüssigmedium | BG11-Festmedium |
|--------------------------------------------------------|--------------------|-----------------|
| CaCl <sub>2</sub> x2 H <sub>2</sub> O                  | 36 mg              | 36 mg           |
| Zitronensäure                                          | 6 mg               | 6 mg            |
| NaNO <sub>3</sub>                                      | 1,5 g              | 1,5 g           |
| MgSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O                 | 75 mg              | 75 mg           |
| 0,25M Na <sub>2</sub> -EDTA (pH 8)                     | 5,6 µl             | 5,6 µl          |
| Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>                        | 20 mg              | 20 mg           |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 3 H <sub>2</sub> O   | 30 mg              | 30 mg           |
| Spurenelemente                                         |                    |                 |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                         | 2,86 g             | 2,86 g          |
| MnCl <sub>2</sub> x 4 H <sub>2</sub> O                 | 1,81 g             | 1,81 g          |
| ZnSO <sub>4</sub> x 7 H <sub>2</sub> O                 | 0,222 g            | 0,222 g         |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> x 2 H <sub>2</sub> O  | 0,390 g            | 0,390 g         |
| Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O | 0,049 g            | 0,049 g         |
| 1M TES-Puffer (pH 8,0)                                 | 10 ml              | 10 ml           |
| Bacto Agar                                             | -                  | 10,5 g          |

Nach dem Lösen der Zusätze in 1L H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> wurden die Medien bei 121 °C autoklaviert. Anschließend wurden 2ml/l Ammoniumeisen(III)-citrat und 0,4 ml/l CuSO<sub>4</sub> hinzugegeben.

#### 4.1.3 Enzyme und molekularbiologische Kits

Die folgende Tabelle führt alle verwendeten Enzyme auf.

Tabelle 4.1-4 In dieser Studie verwendete Enzyme

| Enzym                     | Verwendungszweck                            | Hersteller                                |
|---------------------------|---------------------------------------------|-------------------------------------------|
| DNase                     | Unspezifische Restriktion von DNA-Molekülen | Thermo Scientific                         |
| Lysozym                   | Verdau bakterieller Zellwand                | Sigma Aldrich                             |
| Phusion DNA Polymerase    | Amplifikation von DNA-Molekülen             | New England Biolabs oder Laborpräparation |
| Restriktionsendonukleasen | Spezifische Restriktion von DNA-Molekülen   | New England Biolabs                       |

|                |                                                       |                     |
|----------------|-------------------------------------------------------|---------------------|
| T4 DNA Ligase  | Ligation von DNA-Molekülen                            | New England Biolabs |
| T5 Exonuklease | Gibson-Klonierung                                     | New England Biolabs |
| Taq DNA Ligase | Gibson-Klonierung                                     | New England Biolabs |
| Thermolysin    | Verdau externer Proteine nach Chromatophorenisolation | Promega             |
| Proteinase K   | Verdau externer Proteine nach Chromatophorenisolation | Roche Diagnostics   |
| Enterokinase   | Abspaltung des His-Tags von heterologen Proteinen     | ABM                 |

Die folgende Tabelle führt alle verwendeten molekularbiologischen Kits auf.

**Tabelle 4.1-5 In dieser Studie verwendete molekularbiologischen Kits**

| Molekularbiologisches Kit                 | Verwendungszweck                               | Hersteller        |
|-------------------------------------------|------------------------------------------------|-------------------|
| Mix2Seq Kit                               | Sequenzierung                                  | Eurofins          |
| Plasmid Mini Kit                          | Aufreinigung von Plasmiden                     | Qiagen            |
| QIAquick Gel Extraction Kit               | Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen | Qiagen            |
| RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit | Synthese von cDNA                              | Thermo Scientific |
| RNeasy MinElute Cleanup Kit               | Aufreinigung von isolierter RNA                | Qiagen            |

#### 4.1.4 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Metabion GmbH (Martinsried, Deutschland) synthetisiert. In Tabelle 4.1-6 sind die Oligonukleotide angegeben, die für Klonierungen und Sequenzierungen verwendet wurden.

**Tabelle 4.1-6 In dieser Arbeit verwendete Oligonukleotide**

| Bezeichnung         | Sequenz 5'-3'                     | Verwendungszweck                                |
|---------------------|-----------------------------------|-------------------------------------------------|
| Fwd_scaf24369_NdeI  | CACATATGTCTCTGTACGACCCTATCCTG     | Klonierung von scaffold24369-m.123655 in pET19b |
| Rev_scaf24369_BamHI | CAGGATCCTTAGAACAGGCCAAACCTCTTC    |                                                 |
| Fwd_scaf28115_NdeI  | CACATATGGTGGTTTCCAGAGGGGACCC      | Klonierung von scaffold28115-m.133819 in pET19b |
| Rev_scaf28115_BamHI | CAGGATCCTTAGATGCCTGTGAGAATGAAGGAC |                                                 |

|                         |                                                 |                                                                 |
|-------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| Fwd_scaf21477_NdeI      | CACATATGGGCACACACGCTGGTCGA                      | Klonierung von scaffold21477-m.115224 in pET19b                 |
| Rev_scaf21477_BamHI     | CAGGATCCTTAGACCGACTCTCCTTCTAGGTCTG              |                                                                 |
| Rev_scaf21477_XhoI      | CACTCGAGGACCGACTCTCCTTCTAGGTCTGC                | Klonierung von scaffold21477-m.115224 in pET21a                 |
| Fwd_scaf41490_NdeI      | CACATATGCCTCAAGTCACCATCAGGG                     | Klonierung von scaffold41490-m.164156 in pET19b                 |
| Rev_scaf41490_BamHI     | CAGGATCCTTAATTTTCGATGTGATATTCGTAG               |                                                                 |
| Rev-Nterm-scaf5513-pUBC | CATACTAGTTGGATATCTCGA<br>GCCCGGGTTGTCTTGGTAGTAC | Klonierung des crTPs von scaffold5513-m.48594 in pUBC-YFP       |
| Fwd-Cterm-scaf5513-pUBC | TGAGTTTTTCTGATTAACACATGGCAGTGCAATCG<br>GCCTC    |                                                                 |
| Fwd-PsaE-pUBC           | TGAGTTTTTCTGATTAACACATGGTCGGCCGTGGA<br>GATAAAG  | Klonierung von PsaE (scaffold17097-m.100929) in pUBC-YFP        |
| Rev-PsaE-pUBC           | CATACTAGTTGGATATCTCGAGGGGGCAGACAGCT<br>CGGACTC  |                                                                 |
| Fwd-UBQ10               | CTTCGATTTGTGATTCTATC                            | Forwärts-Oligonukleotid zur Sequenzierung von pUBC-Konstrukten  |
| Rev-YFP                 | CGTTTACGTCGCCGTCCAGC                            | Rückwärts-Oligonukleotid zur Sequenzierung von pUBC-Konstrukten |
| T7                      | TAATACGACTCACTATAGGG                            | Sequenzierung von pET19b und pET21b                             |

#### 4.1.5 Plasmide

Die Tabelle führt die verwendeten und in dieser Arbeit generierten Plasmide auf.

Tabelle 4.1-7 In dieser Arbeit verwendete und hergestellte Plasmide

| Name   | GPN Name | Beschreibung                                                                     | Selektion | Organismus     | Hersteller |
|--------|----------|----------------------------------------------------------------------------------|-----------|----------------|------------|
| pET19b | GPN002   | IPTG-induzierbare Expression rekombinanter Proteine mit N-terminalem His-Tag und | Amp       | <i>E. coli</i> | Novagen    |

|                           |        |                                                                                                                                  |      |                                         |                             |
|---------------------------|--------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|-----------------------------------------|-----------------------------|
|                           |        | Enterokinaseschnittstelle in <i>E. coli</i> .                                                                                    |      |                                         |                             |
| pET19b-scaf24369-m.123655 | GPN003 | IPTG-induzierbare Expression von scaffold24369-m.123655 mit N-terminalem His-Tag und Enterokinaseschnittstelle in <i>E. coli</i> | Amp  | <i>E. coli</i>                          | Diese Arbeit                |
| pET19b-scaf28115-m.133819 | GPN004 | IPTG-induzierbare Expression von scaffold28115-m.133819 mit N-terminalem His-Tag und Enterokinaseschnittstelle in <i>E. coli</i> | Amp  | <i>E. coli</i>                          | Diese Arbeit                |
| pET19b-scaf21477-m.115224 | GPN005 | IPTG-induzierbare Expression von scaffold21477-m.115224 mit N-terminalem His-Tag und Enterokinaseschnittstelle in <i>E. coli</i> | Amp  | <i>E. coli</i>                          | Diese Arbeit                |
| pET19b-scaf41490-m.164156 | GPN007 | IPTG-induzierbare Expression von scaffold41490-m.164156 mit N-terminalem His-Tag und Enterokinaseschnittstelle in <i>E. coli</i> | Amp  | <i>E. coli</i>                          | Diese Arbeit                |
| pUBC-YFP                  |        | Konstitutive Expression von Proteinen mit C-terminalem YFP-Tag in <i>A. tumefaciens</i>                                          | Spec | <i>E. coli</i><br><i>A. tumefaciens</i> | (Grefen <i>et al.</i> 2010) |
| pUBC-YFP-expr.            | GPN008 | Konstitutive Expression von YFP nach der Entfernung der Gateway-Kasette aus pUBC-YFP in <i>A. tumefaciens</i>                    | Spec | <i>E. coli</i><br><i>A. tumefaciens</i> | Diese Arbeit                |
| pUBC-PsaE-YFP             | GPN009 | Konstitutive Expression von <i>P. chromatophora</i> PsaE mit C-                                                                  | Spec | <i>E. coli</i>                          | Diese Arbeit                |

|                                                |        |                                                                                                                                                         |      |                                             |                 |
|------------------------------------------------|--------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|---------------------------------------------|-----------------|
|                                                |        | terminalem YFP-Tag in<br><i>A. tumefaciens</i>                                                                                                          |      | <i>A. tumefaciens</i>                       |                 |
| pUBC-crTP-<br>scaffold5513<br>-m.48594-<br>YFP | GPN012 | Konstitutive Expression des<br>crTP von <i>P. chromatophora</i><br>scaffold5513-m.48594 mit C-<br>terminalem YFP-Tag in <i>A.</i><br><i>tumefaciens</i> | Spec | <i>E. coli</i><br><br><i>A. tumefaciens</i> | Diese<br>Arbeit |
| pUBC-YFP-<br>expr.                             | GPN008 | Konstitutive Expression von<br>YFP in <i>A. tumefaciens</i>                                                                                             | Spec | <i>E. coli</i><br><br><i>A. tumefaciens</i> | Diese<br>Arbeit |
| pET21a                                         | GPN054 | IPTG-induzierbare Expression<br>von rekombinanten Proteinen<br>mit C-terminalem His-Tag in <i>E.</i><br><i>coli</i>                                     | Amp  | <i>E. coli</i>                              | Novagen         |
| pET21a-<br>scaffold2147<br>7-m.115224          | GPN057 | Expression von<br>Scaffold21477-m.115224<br>mit C-terminalem His-Tag in<br><i>E. coli</i>                                                               | Amp  | <i>E. coli</i>                              | Diese<br>Arbeit |

#### 4.1.6 Stämme

Die Tabelle führt die in dieser Arbeit verwendete Stämme von Mikroorganismen auf.

Tabelle 4.1-8 In dieser Arbeit verwendete Stämme

| Stamm                                  | Relevanter Genotyp                                                                                                                                                                                                        | Resistenz    | Bezugsquelle                                                  |
|----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|---------------------------------------------------------------|
| <b><i>Paulinella chromatophora</i></b> |                                                                                                                                                                                                                           |              |                                                               |
| CCAC0185<br>nicht axenisch             | -                                                                                                                                                                                                                         | -            | Culture Collection of<br>Algae (CCAC),<br>Universität zu Köln |
| <b><i>Escherichia coli</i></b>         |                                                                                                                                                                                                                           |              |                                                               |
| Top10                                  | F– <i>mcrA</i> $\Delta$ ( <i>mrr-hsdRMS-<br/>mcrBC</i> ) $\Phi$ 80/ <i>lacZ</i> $\Delta$ M15<br><i><math>\Delta</math>lacX74 recA1 araD139<br/><math>\Delta</math>(ara leu) 7697 galU galK rpsL<br/>(StrR) endA1 nupG</i> | Streptomycin | Invitrogen                                                    |

|                                         |                                                                                                                                              |                |                                                                    |
|-----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------|--------------------------------------------------------------------|
| Rosetta (DE3) pLysS                     | F <sup>-</sup> <i>ompT hsdS<sub>B</sub>(r<sub>B</sub><sup>-</sup> m<sub>B</sub><sup>-</sup>) gal dcm</i> (DE3) pLysSRARE (Cam <sup>R</sup> ) | Cm             | Merck                                                              |
| <b><i>Agrobacterium tumefaciens</i></b> |                                                                                                                                              |                |                                                                    |
| GV3101 p19                              | -                                                                                                                                            | Rif, Gent, Kan | Biochemie der Pflanzen, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf     |
| <b><i>Synechococcus elongatus</i></b>   |                                                                                                                                              |                |                                                                    |
| PCC7942                                 | -                                                                                                                                            | -              | Synthetische Mikrobiologie, Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf |

## 4.2 Methoden

### 4.2.1 Mikrobiologische Methoden

#### 4.2.1.1 Mikrobiologische Methoden mit *Paulinella chromatophora*

##### Kultivierung von *P. chromatophora*

*P. chromatophora*-Kulturen wurden in WARIS-H Medium, modifiziert durch die Zugabe von 1,5 mM Na<sub>2</sub>SiO<sub>3</sub>, kultiviert. Die Kultivierung erfolgte in Fernbachkolben bei 17°C, einem 14/12 Licht-/Dunkel-Zyklus und einer Lichtintensität von 20 µE (Leuchtstoffröhre MASTER TL-D Super 80 36W/840, Philipps).

#### 4.2.1.2 Mikrobiologische Methoden mit *Escherichia coli*

##### Kultivierung von *E. coli*

*E. coli*-Kulturen wurden in LB-Flüssigmedium und auf LB-Festmedium kultiviert. Die Kulturen wurden in Flüssigmedium in Kolben schüttelnd oder in Reagenzgläsern auf dem Drehrad bei 110 UPM inkubiert. Alle Kulturen wurden mit Einzelkolonien von Selektionsplatten inokuliert. Die Inkubation erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 37 °C.

##### Bestimmung der Zelldichte von *E. coli*-Kulturen

Die Zelldichte von *E. coli*-Flüssigkulturen wurde photometrisch mit einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit zwischen der Zelldichte und der gemessenen OD<sub>600</sub> sicherzustellen wurden die Kulturen so verdünnt,

dass der gemessene Wert der OD<sub>600</sub> zwischen 0,2 und 0,8 lag. Als Blindwert wurde die OD<sub>600</sub> des zur Kultivierung verwendeten LB-Mediums gemessen.

### **Transformation von *E. coli*-Zellen mit Plasmid-DNA**

Für die Transformation wurden 50 µl chemisch-kompetenter *E. coli* TOP10-Zellen für 5-10 min auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe von 1-10 µl Plasmid-DNA (5-50 ng) oder 10 µl eines Ligationansatzes wurden die Zellen für weitere 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock für 45 sec bei 42°C, wurde der Ansatz erneut für 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 200 µl LB-Flüssigmedium hinzugegeben und die Zellen für 30-60 min bei 37 °C schüttelnd inkubiert um den Aufbau der Resistenz zu ermöglichen. Der Transformationsansatz wurde auf festem LB-Selektionsmedium ausplattiert und die Platten bei 37°C über Nacht inkubiert.

#### **4.2.1.3 Mikrobiologische Methoden mit *Agrobacterium tumefaciens***

##### **Kultivierung von *A. tumefaciens***

*A. tumefaciens*-Kulturen wurden in YEB-Flüssigmedium und auf YEB-Festmedium kultiviert. Die Kulturen wurden in Flüssigmedium in Reagenzgläsern auf dem Drehrad bei 110 Upm inkubiert. Alle Kulturen wurden mit Einzelkolonien von Selektionsplatten inokuliert. Die Inkubation erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 28 °C.

##### **Bestimmung der Zelldichte von *A. tumefaciens*-Kulturen**

Die Zelldichte von *A. tumefaciens*-Flüssigkulturen wurde photometrisch mit einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei einer Wellenlänge von 600 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit zwischen der Zelldichte und der gemessenen OD<sub>600</sub> sicherzustellen wurden die Kulturen so verdünnt, dass der gemessene Wert der OD<sub>600</sub> zwischen 0,2 und 0,8 lag. Als Blindwert wurde die OD<sub>600</sub> des zur Kultivierung verwendeten YEB-Mediums gemessen.

##### **Transformation von *A. tumefaciens*-Zellen mit Plasmid-DNA**

Für die Transformation wurden 500 µl kompetenter *A. tumefaciens* GV3101 p19-Zellen für 5-10 min auf Eis aufgetaut. Nach der Zugabe von 1-3 µg Plasmid-DNA wurden die Zellen für 15-30 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde für 5 min in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend für 5 min bei 37°C inkubiert. Nach der Zugabe von 1 ml YEB-Flüssigmedium, wurde der Ansatz für 2-4 h schüttelnd bei 28°C inkubiert um den Aufbau der Resistenz zu ermöglichen. Die Zellen wurden für 3 min bei 3000 g und RT pelletiert und in 20 µl YEB-Flüssigmedium resuspendiert. Der

Transformationsansatz wurde auf festem YEB-Selektionsmedium ausplattiert und die Platten bei 28°C für 48-72 h inkubiert.

#### 4.2.1.4 Mikrobiologische Methoden mit *Synechococcus elongatus*

##### **Kultivierung von *S. elongatus***

*S. elongatus*-Kulturen wurden in BG11-Flüssigmedium und auf BG11-Festmedium kultiviert. Die Kulturen wurden in Flüssigmedium in Erlenmeyerkolben bei 150 UPM und einer Dauerbelichtung mit weißem Licht bei 40  $\mu$ E kultiviert. Die Inkubation erfolgte unter aeroben Bedingungen bei 30 °C.

##### **Bestimmung der Zelldichte von *S. elongatus*-Kulturen**

Die Zelldichte von *S. elongatus*-Flüssigkulturen wurde photometrisch mit einem Novospec II Photometer (Pharmacia Biotech) bei einer Wellenlänge von 750 nm bestimmt. Um eine lineare Abhängigkeit zwischen der Zelldichte und der gemessenen OD<sub>750</sub> sicherzustellen wurden die Kulturen so verdünnt, dass der gemessene Wert der OD<sub>750</sub> zwischen 0,2 und 0,8 lag. Als Blindwert wurde die OD<sub>750</sub> des zur Kultivierung verwendeten BG11-Mediums gemessen.

#### 4.2.2 Molekularbiologische Methoden

##### 4.2.2.1 Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration

Die Bestimmung der Nukleinsäurekonzentration erfolgte unter Verwendung des spektralen Photometers *NanoDrop 2000c*. Dabei wurde die Absorption der Nukleinsäure-Probe (1  $\mu$ l) bei 260 nm gemessen, wobei OD<sub>260</sub> = 1 einer Konzentration von 50  $\mu$ g/ml doppelsträngiger DNA bei einer Schichtdicke von 1 cm entspricht. Die Reinheit der gemessenen Nukleinsäure ergibt sich aus dem Quotienten der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm. Dieser sollte bei einem Wert zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

##### 4.2.2.2 Synthese von cDNA aus *P. chromatophora*

##### **Isolation von RNA aus *P. chromatophora***

Für die Isolation von RNA aus *P. chromatophora* wurden die Zellen zunächst für 5 min bei 200 g pelletiert. Das Pellet wurde gewogen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Anschließend wurde das Pellet durch die Zugabe und mehrmaligem auf- und abpipettieren von *TRI Reagent* (Sigma Aldrich, 1 ml pro 100 mg Pellet) aufgetaut. Die Zellen wurden durch mehrmaliges Aufziehen durch eine Spritze mit einer 23G Kanüle aufgebrochen und für 5-10 min bei RT inkubiert. Nach der Zugabe von 200  $\mu$ l

Chloroform pro 1 ml eingesetztem *TRI Reagent* wurde der Ansatz gut durchmischt und für weitere 5-15 min auf RT inkubiert. Das Auftrennen der Phasen erfolgte durch die Zentrifugation für 10 min bei 12000 g und 4°C. Die obere wässrige Phase enthält die RNA und wurde vorsichtig in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Gesamt-RNA wurde mit 500 µl Isopropanol pro 1 ml eingesetztem *TRI Reagent* für 10 min bei RT gefällt. Die gefällte RNA wurde für 10 min bei 12000 g und 4°C pelletiert und das Pellet zweimal mit 75% Ethanol (Verdünnung mit Diethyldicarbonat-behandeltem Wasser (DEPC-H<sub>2</sub>O)) für 5 min bei 12000 g und 4°C gewaschen. Das trockene RNA-Pellet wurde in DEPC-H<sub>2</sub>O oder RNase-freiem Wasser aufgenommen und die Konzentration bestimmt.

Anschließend wurde verbliebene DNA durch eine Behandlung mit DNase für 30 min bei 37°C entfernt und die RNA mithilfe des RNeasy MinElute Cleanup Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers aufgereinigt.

### Synthese von cDNA

Die Synthese der cDNA aus der aufgereinigten RNA erfolgte mithilfe des *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kits* (Thermo Scientific). Dabei wurden Oligo dT<sub>18</sub>-Oligonukleotide als Primer für die *first strand synthesis* verwendet und die Synthese nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

#### 4.2.2.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Amplifikation von DNA-Fragmenten eingesetzt. Für die Herstellung von DNA-Fragmenten, welche daraufhin als Insert für Klonierungen eingesetzt wurden, wurde die Phusion-DNA-Polymerase der Firma NEB eingesetzt. Zur Amplifikation von Fragmenten, welche nicht weiterverarbeitet wurden (zum Beispiel bei der Verifizierung von Klonen) wurde eine im Labor exprimierte und aufgereinigte Phusion-DNA-Polymerase eingesetzt. Das Volumen für PCR-Ansätze betrug 25 µl oder 50 µl. Reaktionen wurden in einem PTC-200 Peltier Thermal Cycler (MJ Research) oder einem SensoQuest Labcycler (SensoQuest) nach Angaben des Polymerase-Herstellers durchgeführt. Das PCR-Programm wurde abhängig von der Größe des zu amplifizierenden Fragments oder dem Verwendungszweck modifiziert. Eine Standard PCR-Reaktion ist im Folgenden gezeigt:

#### Standard PCR-Reaktions Ansatz:

- 10-100 ng Matrizen-DNA
- 1x Phusion-HF-Reaktionspuffer (NEB)
- 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>
- 0,2 mM dNTPs
- 1 mM Oligonukleotid 1
- 1 mM Oligonukleotid 2
- 1 U Phusion-DNA-Polymerase

#### 4.2.2.4 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA wurde diese zunächst mithilfe des *Plasmid Mini Kits* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

#### Über-Nacht Sequenzierung durch die Firma Eurofins Genomics

750-1500 ng Plasmid-DNA wurden mit 20 pmol des entsprechenden Oligonukleotids im bereitgestellten Reaktionsgefäß vermischt und zur Sequenzierung abgeschickt. Die nachfolgende Auswertung der Rohdaten erfolgte mit der Software BioEdit.

#### Sequenzierung durch die Firma GATC

400-500 ng Plasmid-DNA wurden mit 25 pmol des entsprechenden Oligonukleotids vermischt und zum Sequenzieren an die Firma GATC geschickt. Die Rohdaten wurden mithilfe der Software BioEdit ausgewertet.

### 4.2.3 Proteinbiochemische Methoden

#### 4.2.3.1 Bestimmung der Proteinkonzentration mithilfe des Bradford-Assays

Um die Proteinkonzentration von extrahierten Proteinen und Zelllysaten zu bestimmen wurde die Bradford-Methode angewendet (Bradford 1976). Dabei wurden 5 µl Proteinlösung mit 250 µl Bradfordlösung (BioRad) für 5 min bei RT inkubiert und die Absorption bei 595 nm mithilfe des Infinite M200 Plattenphotometers (Tecan) gemessen. Als Referenz wurde die Absorption von BSA-Lösungen mit bekannten Konzentrationen (0–1 mg/ml in H<sub>2</sub>O) bestimmt.

#### 4.2.3.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Um Proteine nach ihrem molekularen Gewicht aufzutrennen wurden kommerziell verfügbare 4-12% Bolt Bis-Tris Plus-Gele (Invitrogen) verwendet. Dafür wurden Proben mit 5x Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert, auf das Gel geladen und in MES-SDS-Laufpuffer bei 180 V separiert, bis eine angemessene Auftrennung der Proteine erreicht wurde.

##### 1x MES-SDS-Laufpuffer:

50 mM MES  
50 mM Tris  
10 mM EDTA  
0,1 % SDS  
In H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

##### 5x Probenpuffer:

0,2 M Tris-HCl pH 6,8  
10 % (v/v) SDS  
10 mM β-Mercaptoethanol  
20 % (v/v) Glycerin  
0,05 % (w/v) Bromphenolblau  
In H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

### Coomassie-Färbung aufgetrennter Proteine

Coomassie-Brillant-Blau (CBB)-Färbung wurde zur Visualisierung von aufgetrennten Proteinen verwendet. Dafür wurden Gele nach der Auftrennung der Proteine für 1 h bei RT mit Coomassie-Färbelösung auf einem Schüttler inkubiert und mit H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde das Gel für ca. 4 h in Entfärbelösung inkubiert, mit H<sub>2</sub>O gewaschen und analysiert.

#### Coomassie-Färbelösung:

0,05 % Coomassie-Brillant-Blau R250  
40 % (v/v) Methanol  
10 % (v/v) Essigsäure  
In H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### Coomassie-Entfärbelösung:

40 % (v/v) Methanol  
10 % (v/v) Essigsäure  
In H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

### 4.2.3.3 Transfer und Detektion von denaturierten Proteinen auf Membranen

#### Westernblot

Nach der Auftrennung von Proteinen durch SDS-PAGE wurden diese mithilfe der Semidry-Westernblot-Methode auf Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membranen (Amersham Hybond, GE Healthcare) transferiert. Dafür wurde die Membran zunächst für 1 min in Methanol aktiviert und anschließend in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> und Anodenpuffer 2 gewaschen. Zwei Whatman-Papiere wurden mit Anodenpuffer 1 getränkt und auf die Anode der Westernblotkammer (Biometra) platziert. Auf diese wurde ein in Anodenpuffer 2 getränktes Whatman-Papier, gefolgt von der aktivierten Membran, dem Polyacrylamidgel und drei in Kathodenpuffer getränkten Whatman-Papieren gelegt. Der Stapel wurde mit der Kathode abgedeckt und der Transfer bei 60 mA pro Gel für 1 h durchgeführt.

#### Anodenpuffer 1:

300 mM Tris-HCl (pH10.4)  
15 % (v/v) Methanol  
In H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### Anodenpuffer 2:

30 mM Tris-HCl (pH 10.4)  
15% (v/v) Methanol  
In H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### Kathodenpuffer:

25 mM Tris-HCl (pH 9.4)  
15 % (v/v) Methanol  
40 mM ε-Aminocapronsäure  
In H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

### Detektion immobilisierter Proteine

Um immobilisierte Proteine auf PVDF-Membranen zu detektieren, wurde eine Antikörperfärbung durchgeführt. Dafür wurde die Membran zunächst für 30-60 min in Blockierpuffer inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper hinzugegeben und die Membran entweder für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Nach dreimaligem Waschen der Membran für 10 min mit TBST oder PBST (je nach eingesetztem Antikörper, siehe Tabelle 4.2-1), wurde ein HRP-konjugierter Sekundärantikörper hinzugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 10 min mit TBST oder PBST gewaschen, das HRP-Substrat Luminata<sup>TM</sup> Classico (Millipore) hinzugegeben und die Chemilumineszenz mithilfe des LAS4000 (GE Healthcare) detektiert.

**TBS (/TBST):**

20 mM Tris-HCl  
136 mM NaCl 2  
In H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, pH 7,6

Für TBST wurden 0,05 % (v/v) Tween-20 hinzugefügt

**TBST-Blockierpuffer:**

TBST + 5% Magermilchpulver

**PBS(/PBST):**

137 mM NaCl  
2.7 mM KCl  
10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, pH 7,4

Für PBST wurden 0,05 % (v/v) Tween-20 hinzugefügt

**PBST-Blockierpuffer**

PBST + 3% BSA

**Tabelle 4.2-1 Verwendete Primär- und Sekundärantikörper**

| Antikörper       | Ursprungsorganismus | Hersteller          | Verdünnung | Verdünnung in       |
|------------------|---------------------|---------------------|------------|---------------------|
| α-His            | Maus                | Sigma Aldrich       | 1:2000     | TBST-Blockierpuffer |
| α-Maus-HRP       | Pferd               | New England Biolabs | 1:2000     | TBST-Blockierpuffer |
| Streptavidin-HRP | -                   | Thermo Scientific   | 1:10000    | PBST-Blockierpuffer |

#### 4.2.3.4 Expression von heterologen Proteinen in *E. coli*

Um heterologe Proteine in *E. coli* zu exprimieren, wurde der *E. coli* Stamm Rosetta (DE3) pLysS verwendet und mit einem *E. coli*-Expressionsplasmid transformiert. Dieser Stamm ist ein Derivat des Stammes BL21 und wird für eine verbesserte Expression von eukaryotischen Proteinen eingesetzt, da er zusätzlich sechs tRNAs enthält, welche einen limitierenden Faktor in *E. coli* darstellen. Einzelne, verifizierte Kolonien wurden in LB-Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotika inokuliert und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die OD<sub>600</sub> der Kultur wurde bestimmt und eine neue Kultur auf eine OD<sub>600</sub> = 0,1 in LB-Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotika inokuliert. Die Kultur wurde bei 37°C bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,5-0,7 inkubiert und die Expression durch die Zugabe von 0,5 mM Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Um den Zeitpunkt der höchsten Proteinexpression zu bestimmen, wurden Proben nach 0, 1, 2, 3, 4 und 20 h entnommen. Um Proteine aus diesen Proben zu extrahieren, wurden die Zellen für 5 min bei 8000 g und 4°C pelletiert, das Pellet in Probenpuffer (siehe Kapitel 4.2.3.2) resuspendiert und für 10 min bei 95°C denaturiert. Anschließend wurde die Lösung für 10 min bei max. UMP und 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein neues

Reaktionsgefäß überführt und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung oder Westernblot untersucht.

Zum Zeitpunkt mit der höchsten Proteinexpression wurde die gesamte Kultur bei 5000 g und 4°C für 20 min geerntet und das Pellet bis zur weiteren Verarbeitung bei -20°C eingefroren.

#### 4.2.3.5 Ni<sup>2+</sup>-NTA-Aufreinigung von His-fusionierten Proteinen aus *E. coli*

Die Aufreinigung von heterolog exprimierten, His-fusionierten Proteinen erfolgte bei 4°C. Um His-fusionierte Proteine aus *E. coli* aufzureinigen, wurden die Zellen zunächst lysiert. Dafür wurde das Pellet in Lysepuffer gelöst (2-5 ml pro 1 g Pellet). 1 mg/ml Lysozym (Sigma Aldrich) wurden hinzugegeben und die Suspension für 30 min bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Anschließend wurden 5 µg/ml DNase (Thermo Scientific) zugegeben und die Lösung für weitere 15 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden sechsmal für jeweils 30 sec durch Ultraschall aufgeschlossen (Sonifier Cell Disruptor B15, Branson; Einstellungen: Tastgrad: 80 %; Leistung: 6), wobei das Lysat zwischen den Zyklen für jeweils 30 sec auf Eis abgekühlt wurde. Um das Lysat zu klären, wurde die Lösung für 30 min bei 10000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt.

Die Aufreinigung His-fusionierter Proteine erfolgte mit Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix (Protino®, Macherey Nagel). 2 ml Matrix wurden in eine leere Säule gefüllt und zweimal mit jeweils 10 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde die Matrix mit 10 ml Lysepuffer equilibriert und das Lysat hinzugegeben. Die Lösung wurde zunächst für 30 min bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert um die Bindung des Proteins an die Matrix zu ermöglichen. Nach der Inkubation wurde die Matrix mit verschiedenen Konzentrationen Imidazol (50 mM, 100 mM und 250 mM) gewaschen und das gebundene Protein mit 250 mM Imidazol eluiert. Proben aller Fraktionen wurden während der Aufreinigung gesammelt und mittels SDS-PAGE und Coomassie-Färbung oder Westernblot untersucht.

#### Lysepuffer:

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
300 mM NaCl  
10 mM Imidazol  
In H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, pH 8.0

#### Wasch-/Elutionspuffer

50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
300 mM NaCl  
50 mM, 100 mM oder 250 mM Imidazol  
In H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, pH 8.0

#### Austausch des Puffers nach Proteinaufreinigung

Um das Imidazol aus den Proben zu entfernen und den Puffer gegen einen gewünschten Puffer auszutauschen wurden PD-10 Säulen (GE Healthcare) nach Angaben des Herstellers verwendet.

#### Konzentrierung aufgereinigter Proteine

Um die Konzentration der isolierten Proteine zu erhöhen wurden Amicon Ultra Zentrifugalfilter mit einer Ausschlußgröße von 3 kDa (Merck) nach Angaben des Herstellers verwendet.

### Enterokinaserestriktion isolierter Proteine

Da die Proteine, welche von dem Expressionsvektor pET19b exprimiert wurden eine Schnittstelle für die Protease Enterokinase zwischen dem His-Tag und dem Protein enthalten, wurde die Protease eingesetzt um diesen zu entfernen. Die Restriktion wurde in Enterokinase-Reaktionspuffer durchgeführt. Dafür wurde das isolierte Proteine auf 0,4-0,5 µg/µl aufkonzentriert und 1U/µl Enterokinase (ABM) hinzugegeben. Die Restriktion erfolgte für 24 h bei 4°C. Da die Enterokinase einen His-Tag aufweist, wurden das unverdaute Protein und die Enterokinase mithilfe der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Aufreinigung entfernt. Dafür wurden 100 µl Ni<sup>2+</sup>-NTA-Matrix in ein Reaktionsgefäß gegeben und zweimal mit jeweils 300 µl H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub> und zweimal mit jeweils 300 µl Enterokinase-Reaktionspuffer gewaschen und für 3 min bei 3500 UPM und 4°C pelletiert. Anschließend wurde die Proteinlösung zu der Matrix hinzugegeben und das Reaktionsgefäß für 30 min bei 4°C auf einem Drehrad inkubiert. Die Matrix wurde erneut pelletiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser enthält das verdaute Proteine und wurde durch SDS-PAGE und Westernblot untersucht.

#### Enterokinase-Reaktionspuffer:

20 mM Tris HCl  
50 mM NaCl  
2 mM CaCl<sub>2</sub>  
In H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, pH 8.0

## 4.2.4 Untersuchung des Proteoms von Chromatophoren

### 4.2.4.1 Isolation von Chromatophoren aus *P. chromatophora*

Alle Schritte der Isolation erfolgten bei 4°C oder auf Eis unter Verwendung des cOmplete EDTA-freien Proteaseinhibitor Cocktails (Roche). Für die Isolation von intakten Chromatophoren wurden *P. chromatophora* Zellen im exponentiellen Wachstumsstadium für 5 min bei 200 g geerntet und das Pellet dreimal mit Isolationspuffer gewaschen. Um tote und beschädigte Zellen zu entfernen, wurde das Pellet in 1 ml 20% Percoll (verdünnt mit Isolationspuffer) resuspendiert und auf einen diskontinuierlichen Percollgradienten, bestehend aus 2 ml 80% Percoll, 1,5 ml 60 % Percoll und 1 ml 40% Percoll, geladen. Nach der Zentrifugation für 15 min bei 750 g wurde das Pellet erneut dreimal mit Isolationspuffer gewaschen. Die Zellen wurden in frischem Isolationspuffer aufgenommen und mithilfe des Cell Disruptors (Constant Systems) bei 0,5 kBar aufgeschlossen. Das so hergestellte Lysat kann für weitere Untersuchungen bei -80°C aufbewahrt werden. Die aufgeschlossenen Zellen wurden für 10 min bei 2500 g pelletiert, das Pellet in 1 ml 20% Percoll resuspendiert und auf einen weiteren Percoll-Gradienten geladen. Nach der Zentrifugation für 15 min bei 750 g bildeten die intakten Chromatophoren eine Bande in der 60%/80% Interphase. Diese wurden vorsichtig entnommen und dreimal in Isolationspuffer gewaschen und anschließend für 10 min bei 20000 g pelletiert um das

verbleibende Percoll zu entfernen. Um die Reinheit der Chromatophorenfraktion zu erhöhen, wurde das Chromatophoren-Pellet in 1 ml 20% Percoll resuspendiert und erneut mithilfe eines frischen Percoll-Gradienten (Zusammensetzung und Zentrifugationsbedingungen wie oben) aufgetrennt. Anschließend wurden die Chromatophoren erneut dreimal mit Isolationspuffer gewaschen. Das so gewonnene Chromatophorenpellet kann entweder direkt weiterverarbeitet werden oder bei -80°C aufbewahrt werden.

### **Isolationspuffer:**

50mM HEPES pH 7,5  
2 mM EGTA  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
250 mM Saccharose  
125mM NaCl  
In H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### **4.2.4.2 Extrazelluläre Restriktion isolierter Chromatophoren**

Isolierte Chromatophoren wurden dreimal für 10 min bei 10000 g und 4°C mit Reaktionspuffer gewaschen und mithilfe der Neubauer-improved Zählkammer (Marienfeld) gezählt. Ca.  $3 \cdot 10^6$  Chromatophoren wurden auf eine finale Konzentration von  $1 \cdot 10^7$  Chromatophoren/ml in Reaktionspuffer resuspendiert und die Proteasen Thermolysin (Promega) oder Proteinase K (Roche) hinzugegeben. Die Reaktionen wurden für 30 min auf Eis und im Dunkeln inkubiert und anschließend durch die Zugabe von 5 mM EDTA terminiert. Die Protease-behandelten Chromatophoren wurden für 10 min bei 20000 g und 4°C pelletiert und das Pellet bis zur weiteren Untersuchung bei -80°C aufbewahrt.

### **Reaktionspuffer:**

50 mM HEPES pH 7,5  
2 mM MgCl<sub>2</sub>  
250 mM Saccharose  
125mM NaCl  
In H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>

#### **4.2.4.3 Biotin-Markierung isolierter Chromatophoren**

Isolierte Chromatophoren wurden dreimal für 10 min bei 10000 g und 4°C mit PBS gewaschen und mithilfe der Neubauer-improved Zählkammer (Marienfeld) gezählt. Ca.  $1 \cdot 10^6$  Chromatophoren wurden auf eine finale Konzentration von  $1 \cdot 10^7$  Chromatophoren/ml in PBS resuspendiert und 2 mM EZ-Link Sulfo-NHS-LC-LC-Biotin (Thermo Scientific) hinzugegeben. Die Reaktionen wurden für 30 min auf Eis und im Dunkeln inkubiert und die Chromatophoren über einen erneuten Percoll-Gradienten (siehe Kapitel 4.2.4.1) aufgereinigt um das nicht gebundene Biotin zu entfernen. Nach dem Gradienten

wurden die Chromatophoren zweimal mit PBS + 100 mM Glycin gewaschen um das immer noch verbliebene Biotin zu binden. Anschließend wurden die Chromatophoren zweimal mit PBS gewaschen und das Pellet bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung aufbewahrt.

### **PBS:**

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>

1.8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

In H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, pH 7,4

#### **4.2.4.4 Extraktion von Proteinen mithilfe der Trichloressigsäure (TCA)-Methode**

Proteine aus ganzen *Paulinella chromatophora* Zellen oder aus isolierten Chromatophoren wurden durch die Präzipitation mit 10% TCA für 30 min auf Eis extrahiert. Die präzipitierten Proteine wurden für 10 min bei 21000 g und 4°C pelletiert und das Pellet zweimal mit eiskaltem Aceton gewaschen. Die so extrahierten Proteine wurden in 0,1 M NaOH resuspendiert und bis zur weiteren Verarbeitung bei -80°C aufbewahrt.

#### **4.2.4.5 Massenspektrometrische-Untersuchung und Identifikation von Proteinen**

Die MS-Untersuchung wurde durch Prof. Dr. Kai Stühler und Dr. Gereon Poschmann im biologisch-medizinischen Forschungszentrum (BMFZ) an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf durchgeführt. Proben für die MS-Untersuchung wurden kurz (4 mm Laufdistanz) mithilfe von SDS-PAGE über ein 4-12% Polyacrylamidgel aufgetrennt, mit Silbernitrat gefärbt und wie in (Poschmann *et al.* 2014) beschrieben vorbereitet. Kurz: reduzierte und alkylierte Proteine wurden über Nacht in 50 mM Ammoniumhydrogencarbonat und 0,1 µg Trypsin (Serva) verdaut. Die resultierenden Peptide wurden mit 1:1 (v/v) 0,1% TCA / Acetonitril extrahiert und das Acetonitril durch Vakuumkonzentrierung entfernt. 500 ng Peptid wurden in 0,1% TCA rekonstituiert, mithilfe des Ultimate 3000 Rapid Separation Flüssigchromatographie-Systems (Thermo Scientific) aufgetrennt und über eine Säule (PepMap100, 3 µm C18 Partikelgröße, Porengröße 100 Å, innerer Durchmesser 75 µm, 2 cm Länge, Thermo Scientific) bei einer Fließrate von 4 µl/min aufkonzentriert, wobei 0,1% (v/v) TCA als mobile Phase verwendet wurde. Nach 10 min wurden die Peptide mithilfe einer analytischen Säule (Acclaim PepMapRSLC, 2 µm C18 Partikelgröße, 100 Å Porengröße, 75 µm innerer Durchmesser, 25 cm Länge, Thermo Scientific) bei 60°C für 2 h separiert. Dabei wurde ein Gradient aus 4 bis 40 % Lösungsmittel (0.1% (v/v) Ameisensäure, 84% (v/v) Acetonitril in Wasser) bei einer Fließrate von 300 nl/min verwendet.

Separierte Proteine wurden anschließend mithilfe einer Nano-Elektrospray-Ionisationsquelle in ein QExactive Plus High Resolution Hybrid Quadrupole Orbitrap Massenspektrometer (Thermo Scientific) injiziert. Das Massenspektrometer wurde im positiven Modus betrieben, die Kapillarentemperatur auf

250°C und die Voltzahl der Quelle auf 1,4 kV gesetzt. Vollständige Scans wurden im *Orbitrap Analyzer* im Erfassungsprofil mit einer Auflösung von 70000 aufgenommen, wobei die Reichweite bei 300 bis 2000 m/z mit einer maximalen Ionenzeit von 80 ms lag und der Wert der automatischen Verstärkungsregelung auf 3000000 eingestellt wurde. Bis zu zehn zwei- und dreifach geladene Vorläuferione wurden durch das eingebaute Quadrupole innerhalb eines 2 m/z Isolationsfensters isoliert, durch eine hochenergetische Kollisions-Aufspaltung fragmentiert und die Fragmente in einem Orbitrap mit einer maximalen Ionenzeit von 60 ms und einem Wert für die automatische Verstärkungsregelung von 100000 analysiert. Die Auflösung wurde auf 17500 eingestellt, die verfügbare Reichweite lag bei 200 bis 2000 m/z und die Spektren wurde im Schwerpunktmodus aufgenommen. Bereits fragmentierte Vorläufer wurden für die nächsten 100 sec von der Analyse ausgeschlossen.

Die Datenbanksuche und Proteinquantifikation wurden mithilfe der Software MaxQuant, Version 1.5.3.8 (Max-Planck-Institut für Biochemie, Planegg, Deutschland) mit Standardparametern durchgeführt. Ein Proteindatenset, bestehend aus 60975 Einträgen (translatiertes *P. chromatophora* Transkriptom mit Ausnahme der Transkripte, welche vom Chromatophoren stammen (Nowack *et al.*, 2016), einschließlich der translatierten offenen Leseraster des Chromatophorengensoms (Nowack *et al.*, 2008)), wurde für die Identifikation der Spektren verwendet. Peptide und Proteine wurden bei einer *False Discovery Rate* von 1% identifiziert, wobei die Trypsinspaltungsspezifität und ein Maximum von zwei versäumten Spaltstellen als Parameter für den Trypsinverdau eingestellt wurden. Die N-terminale Acetylierung und Methioninoxidation wurden als variabel, die Carbamidomethylierung an Cysteinen als ständige Modifikation betrachtet. Die Massentoleranz der Vorläufer wurden zunächst auf 20 ppm und beim zweiten Durchgang, nach der Kalibrierung auf 4,5 ppm eingestellt, während die Massentoleranz für Fragmentspektren bei 20 ppm lag. Markierungsfreie Quantifizierung wurde durch Standardparameter ermöglicht.

### 4.2.5 *In silico* Vorhersage von potentiellen Importkandidaten

Die Vorhersagen von potentiellen Importkandidaten wurden durch Prof. Dr. Stefan Rensing und Dr. Cornelia Mühlich, Zellbiologie der Pflanzen, Philipps Universität in Marburg durchgeführt.

#### 4.2.5.1 *Support Vector Maschine* (SVM) zur Vorhersage von Importkandidaten

Die Vorhersage von langen Importkandidaten wurde nach (Fuss *et al.* 2013) durchgeführt. Dabei wurden die ersten 260 AS der 24 langen Importkandidaten aus Abbildung 2.5-2 als Region, welche das potentielle Importsignal beinhaltet, benutzt und ein Grenzwert definiert, welcher die Unterscheidung von importierten und nicht-importierten Proteinen ermöglicht. Dazu wurden eine n-fache Kreuzvalidierung (KV), mit  $n$  = Größe des Trainingssets, durchgeführt. Mit diesen Werten wurde eine

Grenzwertoptimierungskurve erstellt um einen Grenzwert für die Unterscheidung der zwei Gruppen von Proteinen zu berechnen, während die Sensitivität (Sens.) und die Spezifität (Spez.) optimiert wurden (am nächsten an der Sensitivität von 1 und der Spezifität von 0). Fünf SVM-Modelle (siehe Tabelle 4.2-2) zeigten eine Spezifität und Sensitivität von 1,0 für ein Testset, bestehend aus 10 Proteinen, wobei insgesamt 46 Proteine, von denen die Hälfte aus importierten und die andere Hälfte aus nicht-importierten Proteinen besteht, für das Training benutzt wurden (siehe Tabelle S1). Die Proteineigenschaften, welche für die Vorhersage genutzt wurden und die Motive, die zuvor im crTP-Alignment festgestellt wurden, zeigten eine Überschneidung. Aus diesen fünf Modellen wurde das Modell, welches die beste Leistung für die HK langen Importkandidaten zeigte (alle Proteine, außer einem wurden vorhergesagt, dieses war zu kurz für eine Vorhersage durch das SVM Modell), für die weiteren Vorhersagen ausgewählt (Tabelle 4.2-2, grün unterlegt).

**Tabelle 4.2-2 Die fünf bestem SVM-Modelle.** Die Tabelle zeigt die Algorithmen, welche für die Auswahl der Parameter benutzt wurden: *loo* – Leav-One-Out-Kreuzvalidierung (KV): jede Sequenz wird einmal für das Testen des Parametersets benutzt, während die restlichen Sequenzen für das Training benutzt werden; *randss* – random subsampling: ein fünftel der Sequenzen wird für das Testen verwendet, hundert Wiederholungen; *bootstrap* – bootstrapping: so häufig aus dem Trainingsset mit Ersatz aus dem Set herausgezogen wie es Sequenzen in dem Set gibt und als Training genutzt um Parameter zu bestimmen, hundertmal wiederholt um einen Durchschnitt zu erhalten. Zudem sind Algorithmen gezeigt, welche für die Auswahl der Eigenschaften benutzt wurden: AUC 100x 5-fach KV – beste Eigenschaften werden durch die sequenzielle Vorwärtsselektion ausgewählt und eine 5-fache Kreuzvalidierung wird für jedes Set durchgeführt, das Set an Eigenschaften, welches zum besten AUC führt wird für das finale Modell ausgewählt und der Grenzwert berechnet, indem der nächste Punkt zur Sensitivität = 1 und Spezifität = 0 in der Grenzwertoptimierungskurve bestimmt wird; AUC n-fach KV – ähnlich zu AUC 100x 5-fold KV mit  $n$  = Größe des Testdatensets; Top-10 – Top zehn Eigenschaften mit dem höchsten Matthews-Korrelationskoeffizienten (MKK) werden als Eigenschaftenset ausgewählt, während der Grenzwert auf 0,5 eingestellt ist; Top-10 n-fach KV – ähnlich wie Top-10, aber der Grenzwert wird mit einer Grenzwertoptimierungskurve mit n-fach KV, wobei  $n$  = Größe des Trainingssets. # verwendete Eigenschaften ist die Anzahl an Eigenschaften, die für das finale Modell genutzt wurden. Die in grün unterlegte Zeile zeigt die Informationen für das Modell, welches in Kombination mit der Hidden Markov Methode für die finalen Vorhersagen verwendet wurde.

| Algorithmus<br>Parameter-<br>Auswahl | Algorithmus<br>Eigenschaften-<br>Auswahl | Grenzwert      | # verwendete<br>Eigenschaften | Sensitivität | Spezifität |
|--------------------------------------|------------------------------------------|----------------|-------------------------------|--------------|------------|
| loo                                  | AUC 100x 5-fach KV                       | 0.662993835738 | 20                            | 1.0          | 1.0        |
| randss                               | Top-10                                   | 0.5            | 10                            | 1.0          | 1.0        |
| randss                               | Top-10 n-fach KV                         | 0.521076582858 | 10                            | 1.0          | 1.0        |
| randss                               | AUC n-fach KV                            | 0.476778208359 | 4                             | 1.0          | 1.0        |
| bootstrap                            | AUC n-fach KV                            | 0.597613036535 | 3                             | 1.0          | 1.0        |

Um das optimale Set an Eigenschaften für die N-terminale Region eines Proteins, welche für die Vorhersagen verwendet werden können, zu erhalten, wurden zuvor die top n-Eigenschaften gemäß dem Matthews Kolleraltionskoeffizienzen (MKK) verwendet (Fuss *et al.* 2013). Hier wurde zusätzlich das schrittweise Regressionsverfahren mit Vorwärtsselektion verwendet. Jedes Paramaterset wurde entweder durch die 5-fache Kreuzvalidierung oder eine n-fache Kreuzvalidierung des Bereiches unterhalb der Grenzwertoptimierungskurve evaluiert.

**Tabelle 4.2-3 Top 10 Eigenschaften mit dem höchsten Matthews Kollateralisationskoeffizienzen (MKK) für alle ausgewählten, getesteten Parameter.** Der MKK reicht von -1 bis 1, wobei ein höherer Wert mit der Fähigkeit, perfekt zwischen den zwei Klassen von Proteinen zu unterscheiden, korreliert. *Randss*, *loo*, und *bootstrap* wurden bereits weiter oben definiert; *nfold* ist eine n-fache KV mit n=5. Abkürzungen: Ala, Alanin; AROM, aromatische Aminosäurereste; BTTN,  $\beta$ -Schleife; HYPB, hydrophobe Region; NEGR, negativgeladener Aminosäurerest; POLR, polarer Aminosäurerest; POSR, positivgeladener Aminosäurerest; Pro, Prolin; RDCL, Random Coil; SMLR, kleiner Aminosäurerest; TNYR, sehr kleiner Aminosäurerest; UCHR, ungeladen.

| Für die Vorhersage verwendeter Algorithmus | HYPB        | UCHR        | Pro         | BTTN       | POLR        | POSR        |
|--------------------------------------------|-------------|-------------|-------------|------------|-------------|-------------|
| <b>randss</b>                              | 0.91887     | 0.81979     | 0.77124     | 0.68869    | 0.82471     | 0.84294     |
| <b>nfold</b>                               | 0.96330     | 0.92660     | 0.88585     | 0.80407    | 0.91822     | 0.92660     |
| <b>loo</b>                                 | 0.71429     | 0.66186     | 0.61562     | 0.58032    | 0.66186     | 0.63275     |
| <b>bootstrap</b>                           | 0.89113     | 0.76902     | 0.71495     | 0.61808    | 0.77577     | 0.75828     |
|                                            | <b>AROM</b> | <b>NEGR</b> | <b>TNYR</b> | <b>Ala</b> | <b>RDCL</b> | <b>SMLR</b> |
| <b>randss</b>                              | 0.65974     | 0.66291     | 0.63921     |            | 0.63872     |             |
| <b>nfold</b>                               | 0.84482     | 0.79987     | 0.81245     | 0.80825    |             |             |
| <b>loo</b>                                 | 0.55224     | 0.57133     |             | 0.54041    | 0.57237     |             |
| <b>bootstrap</b>                           |             |             | 0.57162     | 0.56520    | 0.57262     | 0.59508     |

#### 4.2.5.2 Hidden Markov-Modell (HMM) zur Vorhersage von Importkandidaten

Mithilfe des Alignments der crTPs der 24 HK langen Importkandidaten, sowie den am besten abschneidenden Eigenschaften, welche mithilfe von SVM vorhergesagt wurden, konnten sieben Bereiche innerhalb der crTPs manuell definiert und mithilfe von HMMER3 (<http://hmmer.org/>) unter Verwendung der Standardparameter in Hidden Markov-Modelle konvertiert werden. Anschließend wurde das Tool *hmmsearch* verwendet, um in einer Liste von 28 langen Importkandidaten (siehe Tabelle S1) nach den definierten Motiven zu suchen. Dafür wurde die Größe der Datenbank auf die Größe des Proteoms von *P. chromatophora*, der E-Wert auf 10000 eingestellt und die Einstellung max. Parameter wurde verwendet um so viele Ergebnisse, wie möglich für die sieben Motive zu erhalten. Durch manuelle Inspektion der minimalen und maximalen erzielten Werte wurde ein Grenzwert für jedes Motiv definiert und anschließend für die Suche nach den sieben Motiven in der gesamten Proteindatenbank von *P. chromatophora* verwendet. Untersuchung der antimikrobiellen Eigenschaften von kurzen Importkandidaten

#### 4.2.5.3 Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität

Für die Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität der PcAMPs auf *E. coli*, wurden *E. coli* Rosetta pLysS in 5 ml LB-Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotika inokuliert und über Nacht bei 37°C auf dem Rad inkubiert. Die OD<sub>600</sub> der Kultur wurde bestimmt und eine neue Kultur auf eine OD<sub>600</sub> = 0,1 inokuliert und bis zur frühen exponentiellen Phase (OD<sub>600</sub> = 0,5-0,6) bei 37°C inkubiert. Zellen wurden bei 8000 g für 5 min geerntet, mit 10 mM K-Phosphat-Puffer pH7 gewaschen und in frischem 10 mM K-Phosphat-Puffer pH7 resuspendiert. Zellen (finale OD<sub>600</sub> = 0,1) wurden mit verschiedenen Konzentrationen des exprimierten und aufgereinigten Proteins (in 10 mM K-Phosphat-Puffer pH7, siehe Kapitel 4.2.3.4 und 4.2.3.5) gemischt und bei 37°C inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, seriell von 10<sup>-1</sup> bis 10<sup>-5</sup> verdünnt und jeweils 5 µl auf LB-Platten getropft. Die Platten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert.

Für die Untersuchung der antimikrobiellen Aktivität der PcAMPs auf *S. elongatus*, wurden *S. elongatus* PCC 7942 in 30 ml BG11-Flüssigmedium inokuliert und für 4 Tage bei 30°C und Dauerbelichtung inkubiert. Die OD<sub>750</sub> der Kultur wurde bestimmt und eine neue Kultur auf eine OD<sub>750</sub> = 0,2 inokuliert und bis zu einer OD<sub>750</sub> = 0,4 bei 30°C und Dauerbelichtung inkubiert. Zellen wurden bei 5000 UPM für 5 min geerntet, mit 10 mM K-Phosphat-Puffer pH7 gewaschen und in frischem 10 mM K-Phosphat-Puffer pH7 resuspendiert. Zellen (finale OD<sub>750</sub> = 0,3) wurden mit verschiedenen Konzentrationen des exprimierten und aufgereinigten Proteins (in 10 mM K-Phosphat-Puffer pH7, siehe Kapitel 4.2.3.4 und 4.2.3.5) gemischt und bei 30°C und Dauerbelichtung inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden Proben entnommen, seriell von 3\*10<sup>-1</sup> bis 3\*10<sup>-5</sup> verdünnt und jeweils 5 µl auf BG11-Platten getropft. Die Platten wurden bei 30°C und Dauerbelichtung inkubiert, wobei das Wachstum der Zellen täglich detektiert wurde.

#### 4.2.5.4 Untersuchung der Propidiumiodidaufnahme

*E. coli* Rosetta pLysS wurde in 5 ml LB-Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotika inokuliert und über Nacht bei 37°C auf dem Rad inkubiert. Die OD<sub>600</sub> der Kultur wurde bestimmt und eine neue Kultur auf eine OD<sub>600</sub> = 0,1 inokuliert und bis zur frühen exponentiellen Phase (OD<sub>600</sub> = 0,5-0,6) bei 37°C inkubiert. Zellen wurden bei 8000 g für 5 min geerntet, mit 10 mM K-Phosphat-Puffer pH7 gewaschen und in frischem 10 mM K-Phosphat-Puffer pH7 resuspendiert. Zellen (finale OD<sub>600</sub> = 1) wurden mit verschiedenen Konzentrationen des exprimierten und aufgereinigten Proteins (in 10 mM K-Phosphat-Puffer pH7, siehe Kapitel 4.2.3.4 und 4.2.3.5) gemischt und bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen für 5 min bei 8000 g pelletiert und dreimal mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde in 200 µl PBS resuspendiert und in dunkle 96-Well Mikrotiterplatten mit durchsichtigem Boden (Artikel-Nr.: 655087, Greiner Bio-One, Deutschland) überführt. Die OD<sub>600</sub> wurde mithilfe des Infinite M200 Plattenphotometers (Tecan, Schweiz) gemessen. Anschließend wurden 20 µg/ml Propidiumiodid

hinzugegeben und die Fluoreszenz nach 5 min Inkubation bei einem Absorptionsmaximum von 488 nm und einem Emissionsmaximum von 590 nm gemessen.

#### 4.2.5.5 Untersuchung der Lipidinteraktion

Die Untersuchung der Interaktion der potentiellen AMPs mit Lipiden wurde mithilfe von kommerziell verfügbaren Membranen, welche 15 biologisch relevante Lipide beinhalten (Echelon), nach Angaben des Herstellers getestet. Kurz: die Membran wurde für 30 min bei RT in Blockierpuffer inkubiert. Blockierpuffer wurde verworfen und 2 µg/ml Peptid in Blockierpuffer wurden hinzugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde dreimal mit 5 ml TBST für jeweils 5-10 min gewaschen. Anschließend wurde der Waschpuffer verworfen, der Primärantikörper, verdünnt in Blockierpuffer, hinzugegeben und die Membran über Nacht bei 4°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut dreimal mit 5 ml TBST für jeweils 5-10 min gewaschen, der Sekundärantikörper, verdünnt in Blockierpuffer hinzugegeben und die Membran für 1 h bei RT inkubiert. Die Membran wurde dreimal mit 5 ml TBST für jeweils 5-10 min gewaschen, das HRP-Substrat Luminata™ Classico (Millipore) hinzugegeben und die Chemilumineszenz mithilfe des LAS4000 (GE Healthcare) detektiert.

##### TBS (/TBST):

20 mM Tris-HCl  
136 mM NaCl  
in H<sub>2</sub>O<sub>bid.</sub>, pH 7.6

##### Blockierpuffer:

TBST + 4% Magermilchpulver

Für TBST wurden 0,1 % (v/v) Tween-20 hinzugefügt

Tabelle 4.2-4 Für die Untersuchung der Lipidinteraktion verwendete Antikörper

| Antikörper | Ursprungsorganismus | Hersteller          | Verdünnung |
|------------|---------------------|---------------------|------------|
| α-His      | Maus                | Sigma Aldrich       | 1:2000     |
| α-GST      | Maus                | Sigma Aldrich       | 1:2000     |
| α-Maus-HRP | Pferd               | New England Biolabs | 1:2000     |

#### 4.2.6 Untersuchung der Lokalisation von Importkandidaten in *N. benthamiana*

##### 4.2.6.1 Heterologe Expression rekombinanter Importkandidaten in *N. benthamiana*

Um die Lokalisation von kurzen Importkandidaten sowie dem crTP von langen Importkandidaten in einem heterologen Pflanzensystem zu untersuchen, wurden die vollständige Sequenz von PsAE (scaffold 17097-m.100929) sowie die ersten 200 AS, welche das crTP von einem Wirts-kodierten Importkandidaten, welcher als Flavinreduktase annotiert ist (scaffold5513-m.48594) von *P. chromatophora*-cDNA amplifiziert. Beide Sequenzen wurden in den Pflanzenexpressionsvektor pUBC-YFP (Grefen *et al.* 2010) kloniert um C-terminale YFP-Fusionsproteine unter der Kontrolle des Ubiquitin-Promotors herzustellen. Zusätzlich wurde ein YFP-exprimierender Vektor durch die

Entfernung der Gateway-Kassette aus pUBC-YFP generiert. *Agrobacterium tumefaciens* GV3103 p19 wurde mit den verifizierten Vektoren transformiert und positive Klone auf YEB-Platten mit 150 µg/ml Rifampicin, 50 µg/ml Gentamicin, 50 µg/ml Kanamycin, and 100 µg/ml Spectinomycin selektiert. Positive Klone wurden in jeweils 10 ml YEB-Flüssigmedium mit den gleichen Konzentrationen an Antibiotika inokuliert und über Nacht bei 28°C auf einem Drehrad inkubiert. Kulturen mit einer  $OD_{600} = 0,5-0,7$  wurden für 3 min bei 3000 g pelletiert und das Pellet mit einer finalen  $OD_{600} = 0,5$  in Aktivierungspuffer resuspendiert. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden ca. 2 ml der Suspension verwendet, um mithilfe einer Spritze die Rückseite von *Nicotiana benthamiana* Blättern zu infiltrieren. Infiltrierte Pflanzen wurden für 72 h in einer Pflanzenkammer bei 21°C und  $85 \mu E m^{-2} s^{-1}$  (12h/12h Licht-/Dunkel-Zyklus) inkubiert.

**Aktivierungspuffer:**

10 mM MES pH 5,6  
10 mM  $MgCl_2$   
150 µM Acetosyringon  
In  $H_2O_{bid.}$

**4.2.6.2 Isolation von Protoplasten aus *N. benthamiana***

Protoplasten aus infiltrierten *N. benthamiana* Pflanzen wurden nach (Waadt & Kudla 2008) isoliert. Dabei wurden Blätter abgetrennt, in 1x1cm Stücke geschnitten und für 30 min bei RT in 500 mM Mannitol inkubiert. Das Pflanzenmaterial wurde anschließend mit einer protoplastierenden Lösung Vakuum-infiltriert und für 2 bis 4 h bei 28°C und leichtem Schütteln inkubiert. Isolierte Protoplasten wurden mithilfe einer abgeschnittenen 1 ml-Spitze in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit dem 0,5-fachen Volumen an 200 mM  $CaCl_2$  vermischt und für 5 min bei 100 g pelletiert. Das Pellet wurden zunächst vorsichtig mit 0.5 ml 500 mM Mannitol und 1 ml 200 mM  $CaCl_2$  und anschließend mit 1 ml 500 mM Mannitol und 0,5 ml 200 mM  $CaCl_2$  gewaschen und in W5-Puffer resuspendiert. Die isolierten Protoplasten wurden sofort fluoreszenzmikroskopisch analysiert.

**Proplastierende Lösung:**

1 % Cellulase R-10  
0,2 % Macerozym R-10  
0,4 M Mannitol  
20 mM KCl  
20 mM MES pH 5,6  
10 mM  $CaCl_2$   
1 % (w/v) BSA  
In  $H_2O_{bid.}$

**W5-Puffer:**

154 mM NaCl  
125 mM  $CaCl_2$   
5 mM KCl  
2 mM MES pH5,6  
In  $H_2O_{bid.}$

**4.2.6.3 Fluoreszenzmikroskopische Untersuchung isolierter Protoplasten**

Die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung isolierter Protoplasten wurde durch Dr. Sebastian Hänsch, Center for Advanced Imaging an der Heinrich-Heine-Universität in Düsseldorf durchgeführt.

Isolierte Protoplasten wurden mit einem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop (TCS SP8 STED 3X, Leica Microsystems), ausgestattet mit einem HC PL APO CS2 100x Objektiv (NA 1.4) bei einer Scangeschwindigkeit von 600-700 Hz untersucht. Eine Laser-Anregungswellenlänge von 488 nm wurde verwendet. Für die Detektion des emittierten YFP-Fluoreszenzsignals wurde der Detektionsbereich des Hybrid-Detektors auf 498-548 nm und das Zeit-Gating auf 0,5-0,6 ns eingestellt. Um Strukturen der Plastiden zu identifizieren wurde ein weiterer Hybrid-Detektor einer spektralen Reichweite von 649-687 nm ohne ein Zeit-Gating verwendet. Rohmessungen wurden mithilfe der LASX Erweiterung HyVolution2 von Leica/SVI (Scientific Volume Imaging) mit Standardparametern dekonvolviert.

## 4.2.7 Computerprogramme und bioinformatische Analysemethoden

### 4.2.7.1 Computerprogramme

Für die Erstellung und Bearbeitung der Sequenzen von Plasmiden wurde das Programm Serial Cloner ([http://serialbasics.free.fr/Serial\\_Cloner.html](http://serialbasics.free.fr/Serial_Cloner.html)) verwendet. Ferner wurden mit diesem Programm Klonierungsstrategien und Oligonukleotide entworfen.

Die Analyse von Nukleinsäure- und Proteinsequenzen erfolgte mit BioEdit, Sequenz-Alignments wurden mit ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) erstellt.

Die Erstellung von Graphen sowie die statistischen Auswertungen wurden mit dem Programm GraphPad Prism 5 (Version 5.04; GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA) durchgeführt.

Für die Erstellung und Bearbeitung der Abbildungen wurden die Programme Adobe Illustrator Version CS6 und Adobe Photoshop Version CS4 verwendet.

### 4.2.7.2 Bioinformatische Untersuchung der Importkandidaten

Die Nettoladung der crTPs bei pH7 wurde mithilfe von PepCalc (<http://pepcalc.com/>) ermittelt. Die Vorhersage von Transmembrandomänen erfolgte mit TMHMM Server v. 2.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>), während Signal- und Transitpeptide mit TargetP Server v. 1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>, (Nielsen *et al.*, 1997)) vorhergesagt wurden. Die Hydrophobizität und das hydrophobe Moment von Sequenzbereichen innerhalb des crTPs wurden mit HeliQuest vorhergesagt (<http://heliquet.ipmc.cnrs.fr/>, (Gautier *et al.*, 2008)). Die Neigung  $\alpha$ -Helices auszubilden wurde mit NetSurfP (Z-Wert  $\geq 0,5$ ) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetSurfP/>, Petersen *et al.*, 2009) untersucht. KO-Nummern wurden mithilfe des BlastKOALA-Tools aus Kyoto Enzyklopädie für Gene und Genome (KEGG) (<http://www.kegg.jp/blastkoala/>) zugewiesen.

Die folgenden bioinformatischen Untersuchungen wurden durch Dr. Cornelia Mühlich, Zellbiologie der Pflanzen an der Philipps Universität in Marburg durchgeführt: Um Gen-Ontologie-Annotationen zu

bestimmen, wurden alle *P. chromatophora* Proteine gegen die NCBI-Datenbank (Stand: 08.03.2016) geblastet. Dabei wurde Tera-BlastP ([www.timelogic.com](http://www.timelogic.com)) mit einem E-Grenzwert von 0,1 verwendet. Um die Proteine mit DO-Termini zu assoziieren wurde das Blast-Ergebnis b2g4pipe v2.5 (Conesa & Götz 2008) zugeführt. Um die P-Werte zu berechnen, nutzte die GO-Verzerrungsanalyse den exakten Test (Widiez *et al.* 2014). Multiple Test-korrigierte (Benjamini & Hochberg 1995) q-Werte wurden in R mit der Funktion `p.adjust` (R Development Core Team, 2008) berechnet. Word-Cloud-Visualisierung wurde mithilfe des online Tools WORDLE (<http://www.wordle.net>) erstellt. Dabei ist die Größe des Wortes proportional zu dem  $-\log_{10}(\text{q-Wert})$ ; überrepräsentierte GO-Termini wurden in dunkelgrün ( $q \leq 0,0001$ ) oder hellgrün ( $q > 0,0001$ ) dargestellt, während unterrepräsentierte GO-Termini in dunkelrot ( $q \leq 0,0001$ ) oder hellrot ( $q > 0,0001$ ) gezeigt sind.

## 5 Literaturverzeichnis

- Afonin, S., Grage, S. L., Ieronimo, M., Wadhwani, P., & Ulrich, A. S. (2008).** Temperature-dependent transmembrane insertion of the amphiphilic peptide PGLa in lipid bilayers observed by solid state <sup>19</sup>F NMR spectroscopy. *Journal of the American Chemical Society*, 130(49), 16512–16514.
- Akita, M., Nielsen, E., & Keegstra, K. (1997).** Identification of protein transport complexes in the chloroplastic envelope membranes via chemical cross-linking. *The Journal of Cell Biology*, 136(5), 983–994.
- Allen, J. F. (1993).** Control of gene expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes. *Journal of Theoretical Biology*, 165(4), 609–631.
- Allison, L. A. (2000).** The role of sigma factors in plastid transcription. *Biochimie*, 82(6–7), 537–548.
- Alonso, J. M. et al. (2003).** Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 301(5633), 653–657.
- Altmann, R. (1890).** *Die Elementarorganismen und ihre Beziehungen zu den Zellen*. Verlag von Veit & Co. Leipzig
- Alunni, B., & Gourion, B. (2016).** Terminal bacteroid differentiation in the legume–rhizobium symbiosis: nodule-specific cysteine-rich peptides and beyond. *New Phytologist*, 211(2), 411–417.
- Archibald, J. M. (2007).** Nucleomorph genomes: structure, function, origin and evolution. *BioEssays*, 29(4), 392–402.
- Archibald, J. M. (2009).** The puzzle of plastid evolution. *Current Biology*, 19(2), R81–R88.
- Archibald, J. M., & Keeling, P. J. (2002).** Recycled plastids: a “green movement” in eukaryotic evolution. *Trends in Genetics : TIG*, 18(11), 577–584.
- Aronsson, H., Boij, P., Patel, R., Wardle, A., Töpel, M., & Jarvis, P. (2007).** Toc64/OEP64 is not essential for the efficient import of proteins into chloroplasts in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 52(1), 53–68.
- Audhya, A., Foti, M., & Emr, S. D. (2000).** Distinct roles for the yeast phosphatidylinositol 4-kinases, Stt4p and Pik1p, in secretion, cell growth, and organelle membrane dynamics. *Molecular Biology of the Cell*, 11(8), 2673–2689.
- Baker, A., & Schatz, G. (1987).** Sequences from a prokaryotic genome or the mouse dihydrofolate

- reductase gene can restore the import of a truncated precursor protein into yeast mitochondria. *Biochemistry*, 84, 3117–3121.
- Balla, A., & Balla, T. (2006).** Phosphatidylinositol 4-kinases: old enzymes with emerging functions. *Trends in Cell Biology*, 16(7), 351–361.
- Benjamini, Y., & Hochberg, Y. (1995).** Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)*, 57(1), 289–300
- Bodył, A., Mackiewicz, P., & Stiller, J. W. (2009).** Comparative genomic studies suggest that the cyanobacterial endosymbionts of the amoeba *Paulinella chromatophora* possess an import apparatus for nuclear-encoded proteins. *Plant Biology*, 12(4), 639–649.
- Bölter, B., Soll, J., Schulz, A., Hinnah, S., & Wagner, R. (1998).** Origin of a chloroplast protein importer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(26), 15831–15836.
- Bonen, L., & Doolittle, W. F. (1975).** On the prokaryotic nature of red algal chloroplasts, 72(6), 2310–2314.
- Bovet, L., Müller, M. O., & Siegenthaler, P. A. (2001).** Three distinct lipid kinase activities are present in spinach chloroplast envelope membranes: Phosphatidylinositol phosphorylation is sensitive to wortmannin and not dependent on chloroplast ATP. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 289(1), 269–275.
- Bradford, M. M. (1976).** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72, 248–254.
- Brogden, K. A. (2005).** Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews Microbiology*, 3(3), 238–250.
- Bruce, B. D. (2000).** Chloroplast transit peptides: structure, function and evolution. *Trends in Cell Biology*, 10(10), 440–447.
- Bruce, B. D. (2001).** The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1541(1–2), 2–21.
- Bürck, J., Roth, S., Wadhwani, P., Afonin, S., Kanithasen, N., Strandberg, E., & Ulrich, A. S. (2008).** Conformation and membrane orientation of amphiphilic helical peptides by oriented circular dichroism. *Biophysical Journal*, 95(8), 3872–3881.

- Carro, L., Pujic, P., Alloisio, N., Fournier, P., Boubakri, H., Hay, A. E., Poly, F., François, P., Hoher, V., Mergaert, P., Balmand, S., Rey, M., Heddi, A., Normand, P. (2015).** *Alnus* peptides modify membrane porosity and induce the release of nitrogen-rich metabolites from nitrogen-fixing *Frankia*. *The ISME Journal*, 9(8), 1723–1733.
- Cavalier-Smith, T. (2000).** Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends in Plant Science*, 5(4), 174–182.
- Cavalier-Smith, T. (2003).** Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae). *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 358(1429), 109–134.
- Cavalier-Smith, T., & Chao, E. E.-Y. (2003).** Phylogeny and classification of phylum cercozoa (Protozoa). *Protist*, 154(3–4), 341–358.
- Chauhan, A., Madiraju, M. V. V. S., Fol, M., Lofton, H., Maloney, E., Reynolds, R., & Rajagopalan, M. (2006).** *Mycobacterium tuberculosis* cells growing in macrophages are filamentous and deficient in FtsZ rings. *Journal of Bacteriology*, 188(5), 1856–1865.
- Cline, K., Werner-Washburne, M., Andrews, J., & Keegstra, K. (1984).** Thermolysin is a suitable protease for probing the surface of intact pea chloroplasts. *Plant Physiology*, 75(3), 675–678.
- Cockcroft, S., Taylor, J. A., & Judah, J. D. (1985).** Subcellular localisation of inositol lipid kinases in rat liver. *Biochimica et Biophysica Acta*, 845(2), 163–1670.
- Conesa, A., & Götz, S. (2008).** Blast2GO: A comprehensive suite for functional analysis in plant genomics. *International Journal of Plant Genomics*, 2008, 1–12.
- Coutinho, F., Tschoeke, D. A., Thompson, F., & Thompson, C. (2016).** Comparative genomics of *Synechococcus* and proposal of the new genus *Parasynechococcus*. *PeerJ*, 4: e1522.
- Dathe, M., Nikolenko, H., Meyer, J., Beyermann, M., & Bienert, M. (2001).** Optimization of the antimicrobial activity of magainin peptides by modification of charge. *FEBS Letters*, 501(2–3), 146–150.
- Delaye, L., Valadez-Cano, C., & Pérez-Zamorano, B. (2016).** How Really Ancient Is *Paulinella* Chromatophora? *PLoS Currents*. 8: ecurrents.tol.e68a099364bb1a1e129a17b4e06b0c6b.
- Ding, L., Yang, L., Weiss, T. M., Waring, A. J., Lehrer, R. I., & Huang, H. W. (2003).** Interaction of antimicrobial peptides with lipopolysaccharides. *Biochemistry*, 42(42), 12251–12259.

- Doerrler, W. T. (2006).** Lipid trafficking to the outer membrane of Gram-negative bacteria. *Molecular Microbiology*, 60(3), 542–552.
- Domenech, P., Kobayashi, H., LeVier, K., Walker, G. C., & Barry, C. E. (2009).** BacA, an ABC transporter involved in maintenance of chronic murine infections with *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Bacteriology*, 191(2), 477–485.
- Doolittle, W. F. (1998).** You are what you eat: a gene transfer ratchet could account for bacterial genes in eukaryotic nuclear genomes. *Trends in Genetics : TIG*, 14(8), 307–311.
- Dubilier, N., Bergin, C., & Lott, C. (2008).** Symbiotic diversity in marine animals: the art of harnessing chemosynthesis. *Nature Reviews Microbiology*, 6(10), 725–740.
- Duy, D., Soll, J., & Philippar, K. (2007).** Solute channels of the outer membrane: from bacteria to chloroplasts. *Biological Chemistry*, 388(9), 879–889.
- Eisenberg, D., Schwarz, E., Komaromy, M., & Wall, R. (1984).** Analysis of membrane and surface protein sequences with the hydrophobic moment plot. *Journal of Molecular Biology*, 179(1), 125–142.
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., Brunak, S., & von Heijne, G. (2000).** Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence. *Journal of Molecular Biology*, 300(4), 1005–1016.
- Farkas, A., Maróti, G., Durgó, H., Györgypál, Z., Lima, R. M., Medzihradszky, K. F., Kereszt, A., Mergaert, P., Kondorosi, É. (2014).** *Medicago truncatula* symbiotic peptide NCR247 contributes to bacteroid differentiation through multiple mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 111(14), 5183–5188.
- Fellerer, C., Schweiger, R., Schöngruber, K., Soll, J., & Schwenkert, S. (2011).** Cytosolic HSP90 cochaperones HOP and FKBP interact with freshly synthesized chloroplast preproteins of *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 4(6), 1133–1145.
- Fuss, J., Liegmann, O., Krause, K., & Rensing, S. A. (2013).** Green targeting predictor and ambiguous targeting predictor 2: the pitfalls of plant protein targeting prediction and of transient protein expression in heterologous systems. *New Phytologist*, 200(4), 1022–1033.
- Garg, S. G., & Gould, S. B. (2016).** The role of charge in protein targeting evolution. *Trends in Cell Biology*, 26(12), 894–905.
- Gautier, R., Douguet, D., Antonny, B., & Drin, G. (2008).** HELIQUEST: a web server to screen sequences with specific  $\alpha$ -helical properties. *Bioinformatics*, 24(18), 2101–2102.

- Ghosal, A., Vitali, A., Stach, J. E. M., & Nielsen, P. E. (2013).** Role of SbmA in the uptake of peptide nucleic acid (PNA)-peptide conjugates in *E. coli*. *ACS Chemical Biology*, 8(2), 360–367.
- Giangaspero, A., Sandri, L., & Tossi, A. (2001).** Amphipathic alpha helical antimicrobial peptides. *European Journal of Biochemistry*, 268(21), 5589–600.
- Gilson, P. R., Su, V., Slamovits, C. H., Reith, M. E., Keeling, P. J., & McFadden, G. I. (2006).** Complete nucleotide sequence of the chlorarachniophyte nucleomorph: Nature's smallest nucleus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(25), 9566–9571.
- Giovannoni, S. J., Turner, S., Olsen, G. J., Barns, S., Lane, D. J., & Pace, N. R. (1988).** Evolutionary relationships among cyanobacteria and green chloroplasts. *Journal of Bacteriology*, 170(8), 3584–3592.
- Golden, S. S., Nalty, M. S., & Cho, D. S. (1989).** Genetic relationship of two highly studied *Synechococcus* strains designated *Anacystis nidulans*. *Journal of Bacteriology*, 171(1), 24–29.
- Gould, S. B., Waller, R. F., & McFadden, G. I. (2008).** Plastid evolution. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 491–517.
- Graham, M. A., Silverstein, K. A. T., Cannon, S. B., & VandenBosch, K. A. (2004).** Computational identification and characterization of novel genes from legumes. *PLANT PHYSIOLOGY*, 135(3), 1179–1197.
- Grefen, C., Donald, N., Hashimoto, K., Kudla, J., Schumacher, K., & Blatt, M. R. (2010).** A ubiquitin-10 promoter-based vector set for fluorescent protein tagging facilitates temporal stability and native protein distribution in transient and stable expression studies. *The Plant Journal*, 64(2), 355–365.
- Haag, A. F., Baloban, M., Sani, M., Kerscher, B., Pierre, O., Farkas, A., Longhi, R., Boncompagni, E., Hérouart, D., Dall'angelo, S., Kondorosi, E., Zanda, M., Mergaert, P., Ferguson, G. P. (2011).** Protection of *Sinorhizobium* against host cysteine-rich antimicrobial peptides is critical for symbiosis. *PLoS Biology*, 9(10), e1001169.
- Hale, J. D., & Hancock, R. E. (2007).** Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Expert Review of Anti-Infective Therapy*, 5(6), 951–959.
- Hansen, A. K., & Moran, N. A. (2011).** Aphid genome expression reveals host-symbiont cooperation in the production of amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(7), 2849–2854.

- Hofmann, N. R., & Theg, S. M. (2005).** Chloroplast outer membrane protein targeting and insertion. *Trends in Plant Science*, 10(9), 450–457.
- Hoogenraad, H. (1927).** Zur Kenntnis der Fortpflanzung von *Paulinella chromatophora*. *Zool. Anz.*, 72, 140–150.
- Hueren, V., (2017).** Mechanistic aspects of the protein import into the chromatophores of *Paulinella chromatophora*. Masterarbeit. Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Inoue, H., Li, M., & Schnell, D. J. (2013).** An essential role for chloroplast heat shock protein 90 (Hsp90C) in protein import into chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(8), 3173–3178.
- Jiang, Z., Vasil, A. I., Hale, J. D., Hancock, R. E. W., Vasil, M. L., & Hodges, R. S. (2008).** Effects of net charge and the number of positively charged residues on the biological activity of amphipathic  $\alpha$ -helical cationic antimicrobial peptides. *Biopolymers*, 90(3), 369–383.
- Karcher, D., Köster, D., Schadach, A., Klevesath, A., & Bock, R. (2009).** The *Chlamydomonas* chloroplast HLP protein is required for nucleoid organization and genome maintenance. *Molecular Plant*, 2(6), 1223–1232.
- Kasmati, A. R., Töpel, M., Khan, N. Z., Patel, R., Ling, Q., Karim, S., Aronsson, H., Jarvis, P. (2013).** Evolutionary, molecular and genetic analyses of Tic22 homologues in *Arabidopsis thaliana* chloroplasts. *PLoS ONE*, 8(5), e63863.
- Kavran, J. M., Klein, D. E., Lee, A., Falasca, M., Isakoff, S. J., Skolnik, E. Y., & Lemmon, M. A. (1998).** Specificity and promiscuity in phosphoinositide binding by pleckstrin homology domains. *The Journal of Biological Chemistry*, 273(46), 30497–508.
- Keeling, P. J. (2010).** The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 365(1541), 729–748.
- Keeling, P. J., & Palmer, J. D. (2008).** Horizontal gene transfer in eukaryotic evolution. *Nature Reviews Genetics*, 9(8), 605–618.
- Kessler, F., & Blobel, G. (1996).** Interaction of the protein import and folding machineries of the chloroplast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(15), 7684–7689.
- Kessler, F., & Schnell, D. (2009).** Chloroplast biogenesis: diversity and regulation of the protein import apparatus. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(4), 494–500.

- Kies, L., & Kremer, B. P. (1990).** Phylum Glaucocystophyta pp. 152-166 in *Handbook of Protoctista*. Margulis, L., Corliss, J. O., Melkonian, M., and Chapman, D. J., eds. Jones & Bartlett, Boston.
- Kilian, O., & Kroth, P. G. (2004).** Identification and characterization of a new conserved motif within the presequence of proteins targeted into complex diatom plastids. *The Plant Journal*, 41(2), 175–183.
- Kim, S., & Park, M. G. (2016).** *Paulinella longichromatophora* sp. nov., a new marine photosynthetic testate amoeba containing a chromatophore. *Protist*, 167(1), 1–12.
- Kleine, T., Maier, U. G., & Leister, D. (2009).** DNA transfer from organelles to the nucleus: The idiosyncratic genetics of endosymbiosis. *Annual Review of Plant Biology*, 60(1), 115–138.
- Kobayashi, T., Takahara, M., Miyagishima, S., Kuroiwa, H., Sasaki, N., Ohta, N., Matsuzaki, M., Kuroiwa, T. (2002).** Detection and localization of a chloroplast-encoded HU-like protein that organizes chloroplast nucleoids. *The Plant Cell*, 14(7), 1579–1589.
- Kondorosi, E., Mergaert, P., & Kereszt, A. (2013).** A paradigm for endosymbiotic life: cell differentiation of *Rhizobium* bacteria provoked by host plant factors. *Annual Review of Microbiology*, 67(1), 611–628.
- Kouranov, A., Chen, X., Fuks, B., & Schnell, D. J. (1998).** Tic20 and Tic22 are new components of the protein import apparatus at the chloroplast inner envelope membrane. *The Journal of Cell Biology*, 143(4), 991–1002.
- Kouranov, A., & Schnell, D. J. (1997).** Analysis of the interactions of preproteins with the import machinery over the course of protein import into chloroplasts. *The Journal of Cell Biology*, 139(7), 1677–1685.
- Krinke, O., Ruelland, E., Valentova, O., Vergnolle, C., Renou, J.-P., Taconnat, L., Flemr, M., Burketová, L., Zachowski, A. (2007).** Phosphatidylinositol 4-Kinase activation is an early response to salicylic acid in *Arabidopsis* suspension cells. *Plant Physiology*, 144(3), 1347–1359.
- Lamberti, G., Gügel, I. L., Meurer, J., Soll, J., & Schwenkert, S. (2011).** The cytosolic kinases STY8, STY17, and STY46 are involved in chloroplast differentiation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 157(1), 70–85.
- Lauterborn, R. (1895).** Protozoenstudien. *Z. Wiss. Zool.*, 59, 537–547.
- LeVier, K., Phillips, R. W., Grippe, V. K., Roop, R. M., & Walker, G. C. (2000).** Similar requirements of a plant symbiont and a mammalian pathogen for prolonged intracellular survival. *Science*, 287(5462), 2492–2493.

- LeVier, K., & Walker, G. C. (2001).** Genetic analysis of the *Sinorhizobium meliloti* BacA protein: Differential effects of mutations on phenotypes. *Journal of Bacteriology*, 183(21), 6444–6453.
- Lhee, D., Yang, E. C., Kim, J. I., Nakayama, T., Zuccarello, G., Andersen, R. A., & Yoon, H. S. (2017).** Diversity of the photosynthetic *Paulinella* species, with the description of *Paulinella micropora* sp. nov. and the chromatophore genome sequence for strain KR01. *Protist*, 168(2), 155–170.
- Ling, Q., Huang, W., Baldwin, A., & Jarvis, P. (2012).** Chloroplast biogenesis is regulated by direct action of the ubiquitin-proteasome system. *Science*, 338(6107), 655–659.
- Login, F. H., Balmand, S., Vallier, A., Vincent-Monegat, C., Vigneron, A., Weiss-Gayet, M., Rochat, D., Heddi, A. (2011).** Antimicrobial peptides keep insect endosymbionts under control. *Science*, 334(6054), 362–365.
- Mackiewicz, P., Bodył, A., & Gagat, P. (2012a).** Possible import routes of proteins into the cyanobacterial endosymbionts/plastids of *Paulinella chromatophora*. *Theory in Biosciences*, 131(1), 1–18.
- Mackiewicz, P., Bodył, A., & Gagat, P. (2012b).** Protein import into the photosynthetic organelles of *Paulinella chromatophora* and its implications for primary plastid endosymbiosis. *Symbiosis*, 58(1–3), 99–107.
- Maier, U. G., Zauner, S., & Hempel, F. (2015).** Protein import into complex plastids: Cellular organization of higher complexity. *European Journal of Cell Biology*, 94(7–9), 340–348.
- Majerle, A., Kidriq, J., & Jerala, R. (2003).** Enhancement of antibacterial and lipopolysaccharide binding activities of a human lactoferrin peptide fragment by the addition of acyl chain. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 51, 1159–1165.
- Maple, J., & Møller, S. G. (2007).** Plastid division: evolution, mechanism and complexity. *Annals of Botany*, 99(4), 565–579.
- Margulis, L. (1971).** Symbiosis and evolution. *Scientific American*, 225(2), 48–57.
- Marin, B., Nowack, E. C., Glöckner, G., & Melkonian, M. (2007).** The ancestor of the *Paulinella* chromatophore obtained a carboxysomal operon by horizontal gene transfer from a Nitrococcus-like  $\gamma$ -proteobacterium. *BMC Evolutionary Biology*, 7(7).
- Marin, B., Nowack, E. C. M., & Melkonian, M. (2005a).** A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis. *Protist*, 156(4), 425–432.

- Marlow, V. L., Haag, A. F., Kobayashi, H., Fletcher, V., Scocchi, M., Walker, G. C., & Ferguson, G. P. (2009).** Essential role for the BacA protein in the uptake of a truncated eukaryotic peptide in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 191(5), 1519–1527.
- Maróti, G., Downie, J. A., & Kondorosi, É. (2015).** Plant cysteine-rich peptides that inhibit pathogen growth and control rhizobial differentiation in legume nodules. *Current Opinion in Plant Biology*, 26, 57–63.
- Martin, W., & Herrmann, R. G. (1998).** Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens, and why? *Plant Physiology*, 118(1).
- Mattiuzzo, M., Bandiera, A., Gennaro, R., Benincasa, M., Pacor, S., Antcheva, N., & Scocchi, M. (2007).** Role of the *Escherichia coli* SbmA in the antimicrobial activity of proline-rich peptides. *Molecular Microbiology*, 66(1), 151–163.
- May, T., & Soll, J. (2000).** 14-3-3 proteins form a guidance complex with chloroplast precursor proteins in plants. *The Plant Cell*, 12(1), 53–64.
- McCutcheon, J. P., & Moran, N. A. (2011).** Extreme genome reduction in symbiotic bacteria. *Nature Publishing Group*, 10, 13-26.
- McCutcheon, J. P., & von Dohlen, C. D. (2011).** An interdependent metabolic patchwork in the nested symbiosis of mealybugs. *Current Biology : CB*, 21(16), 1366–1372.
- McFadden, G. I. (2001).** Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *Journal of Phycology*, 37(6), 951–959.
- McFadden, G. I., & Melkonian, M. (1986).** Use of Hepes buffer for microalgal culture media and fixation for electron microscopy. *Phycologia*, 25(4), 551–557.
- Melkonian, M., & Mollenhauer, D. (2005).** Robert Lauterborn (1869-1952) and his *Paulinella chromatophora*. *Protist*, 156(2), 253–262.
- Mereschkowsky, K. S. (1905).** Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biolog. Centralbl*, 25(18), 593–604.
- Mergaert, P., Kikuchi, Y., Shigenobu, S., & Nowack, E. C. M. (2017).** Metabolic integration of bacterial endosymbionts through antimicrobial peptides. *Trends in Microbiology*. 25(9). 703-712.

- Mergaert, P., Nikovics, K., Kelemen, Z., Maunoury, N., Vaubert, D., Kondorosi, A., & Kondorosi, E. (2003).** A novel family in *Medicago truncatula* consisting of more than 300 nodule-specific genes coding for small, secreted polypeptides with conserved cysteine motifs. *Plant Physiology*, 132(1), 161–173.
- Mergaert, P., Uchiumi, T., Alunni, B., Evanno, G., Cheron, A., Catrice, O., Mausset, A. E., Barloy-Hubler, F., Galibert, F., Kondorosi, A., Kondorosi, E. (2006).** Eukaryotic control on bacterial cell cycle and differentiation in the *Rhizobium*-legume symbiosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(13), 5230–5235.
- Mizuno-Yamasaki, E., Medkova, M., Coleman, J., & Novick, P. (2010).** Phosphatidylinositol 4-phosphate controls both membrane recruitment and a regulatory switch of the Rab GEF Sec2p. *Developmental Cell*, 18(5), 828–840.
- Moreira, D., von der Heyden, S., Bass, D., López-García, P., Chao, E., & Cavalier-Smith, T. (2007).** Global eukaryote phylogeny: Combined small- and large-subunit ribosomal DNA trees support monophyly of Rhizaria, Retaria and Excavata. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 44(1), 255–266.
- Moya, A., Peretó, J., Gil, R., & Latorre, A. (2008).** Learning how to live together: genomic insights into prokaryote–animal symbioses. *Nature Reviews Genetics*, 9(3), 218–229.
- Munnik, T., & Vermeer, J. E. M. (2010).** Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositol phosphate signalling in plants. *Plant, Cell & Environment*, 33(4), 655–669.
- Nakabachi, A., Ishida, K., Hongoh, Y., Ohkuma, M., & Miyagishima, S. (2014).** *Aphid* gene of bacterial origin encodes a protein transported to an obligate endosymbiont. *Current Biology*, 24(14), R640–R641.
- Nass, M. M. K., & Nass, S. (1963).** Intramitochondrial Fibers with DNA Characteristics. *The Journal of Cell Biology*, 19(3). 593-611
- Nielsen, E., Akita, M., Davila-Aponte, J., & Keegstra, K. (1997).** Stable association of chloroplastic precursors with protein translocation complexes that contain proteins from both envelope membranes and a stromal Hsp100 molecular chaperone. *The EMBO Journal*, 16(5), 935–946.
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., & von Heijne, G. (1997).** Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites. *Protein Engineering*, 10(1), 1–6.
- Nikoh, N., McCutcheon, J. P., Kudo, T., Miyagishima, S., Moran, N. A., & Nakabachi, A. (2010).** Bacterial genes in the *Aphid* genome: absence of functional gene transfer from *Buchnera* to its

- host. *PLoS Genetics*, 6(2), e1000827.
- Nowack, E. C. M. (2014).** *Paulinella chromatophora* – rethinking the transition from endosymbiont to organelle. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae*, 83(4), 387–397.
- Nowack, E. C. M., & Grossman, A. R. (2012).** Trafficking of protein into the recently established photosynthetic organelles of *Paulinella chromatophora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(14), 5340–5345.
- Nowack, E. C. M., & Melkonian, M. (2010).** Endosymbiotic associations within protists. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 365(1541), 699–712.
- Nowack, E. C. M., Melkonian, M., & Glöckner, G. (2008).** Chromatophore genome sequence of *Paulinella* sheds light on acquisition of photosynthesis by eukaryotes. *Current Biology*, 18(6), 410–418.
- Nowack, E. C. M., Price, D. C., Bhattacharya, D., Singer, A., Melkonian, M., & Grossman, A. R. (2016).** Gene transfers from diverse bacteria compensate for reductive genome evolution in the chromatophore of *Paulinella chromatophora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 113(43), 12214–12219.
- Nowack, E. C. M., Vogel, H., Groth, M., Grossman, A. R., Melkonian, M., & Glockner, G. (2011).** Endosymbiotic gene transfer and transcriptional regulation of transferred genes in *Paulinella chromatophora*. *Molecular Biology and Evolution*, 28(1), 407–422.
- Nowack, E., Price, D., Bhattacharya, D., Singer, A., Melkonian, M., & Grossman, A. (2016).** Gene transfers from diverse bacteria compensate for reductive genome evolution in the chromatophore of *Paulinella chromatophora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(43), 12214–12219.
- Nowack, E. C. M., (2008).** *Paulinella chromatophora* – a model for the acquisition of photosynthesis by eukaryotes. Dissertation. Universität zu Köln.
- Oh, Y. J., & Hwang, I. (2015).** Targeting and biogenesis of transporters and channels in chloroplast envelope membranes: Unsolved questions. *Cell Calcium*, 58(1), 122–130.
- Okazaki, K., Miyagishima, S., & Wada, H. (2015).** Phosphatidylinositol 4-phosphate negatively regulates chloroplast division in **Arabidopsis**. *The Plant Cell*, 27(3), 663–674.
- Ordögh, L., Vörös, A., Nagy, I., Kondorosi, E., Kereszt, A. (2014).** Symbiotic plant peptides eliminate

- Candida albicans* both in vitro and in an epithelial infection model and inhibit the proliferation of immortalized human cells. *BioMed Research International*, 2014, 320796.
- Parfrey, L. W., Lahr, D. J. G., Knoll, A. H., & Katz, L. A. (2011).** Estimating the timing of early eukaryotic diversification with multigene molecular clocks. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(33), 13624–13629.
- Petersen, B., Petersen, T., Andersen, P., Nielsen, M., & Lundegaard, C. (2009).** A generic method for assignment of reliability scores applied to solvent accessibility predictions. *BMC Structural Biology*, 9(51).
- Pfalz, J., & Pfannschmidt, T. (2013).** Essential nucleoid proteins in early chloroplast development. *Trends in Plant Science*, 18(4), 186–194.
- Poliakov, A., Russell, C. W., Ponnala, L., Hoops, H. J., Sun, Q., Douglas, A. E., & van Wijk, K. J. (2011).** Large-scale label-free quantitative proteomics of the pea aphid-*Buchnera* symbiosis. *Molecular & Cellular Proteomics : MCP*, 10(6), M110.007039.
- Poschmann, G., Seyfarth, K., Besong Agbo, D., Klafki, H.-W., Rozman, J., Wurst, W., Wiltfang, J., Meyer, H. E., Klingenspor, M., Stühler, K. (2014).** High-fat diet induced isoform changes of the Parkinson's disease protein DJ-1. *Journal of Proteome Research*, 13(5), 2339–2351.
- Qbadou, S., Becker, T., Mirus, O., Tews, I., Soll, J., & Schleiff, E. (2006).** The molecular chaperone Hsp90 delivers precursor proteins to the chloroplast import receptor Toc64. *The EMBO Journal*, 25(9), 1836–1847.
- Reumann, S., Inoue, K., & Keegstra, K. (2005).** Evolution of the general protein import pathway of plastids. *Molecular Membrane Biology*, 22(1–2), 73–86.
- Reumann, & Keegstra. (1999).** The endosymbiotic origin of the protein import machinery of chloroplastic envelope membranes. *Trends in Plant Science*, 4(8), 302–307
- Richly, E., & Leister, D. (2004).** An improved prediction of chloroplast proteins reveals diversities and commonalities in the chloroplast proteomes of *Arabidopsis* and rice. *Gene*, 329, 11–16.
- Ris, H., & Plaut, W. (1962).** Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *The Journal of Cell Biology*, 13(3). 383-391
- Rosenberger, C. M., Gallo, R. L., & Finlay, B. B. (2004).** Interplay between antibacterial effectors: a macrophage antimicrobial peptide impairs intracellular *Salmonella* replication. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(8), 2422–2427.

- Rudolf, M., Machettira, A. B., Groß, L. E., Weber, K. L., Bolte, K., Bionda, T., Sommer, M. S., Maier, U. G., Weber, A. P., Schleiff, E., Tripp, J. (2013). *In vivo* function of Tic22, a protein import component of the intermembrane space of chloroplasts. *Molecular Plant*, 6(3), 817–829.
- Sachs, J. (1882). *Vorlesungen über Pflanzen-Physiologie*. Verlag W. Engelmann, Leipzig.
- Sagan, L. (1967). On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology*, 14(3), 255–274.
- Schimper, A. F. W. (1883). Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner und Farbkörper. *Bot. Ztg.*, 41, 105–114.
- Schleiff, E., Jelic, M., & Soll, J. (2003). A GTP-driven motor moves proteins across the outer envelope of chloroplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(8), 4604–4609.
- Schleiff, E., & Klösken, R. B. (2001). Without a little help from “my” friends: direct insertion of proteins into chloroplast membranes? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1541(1–2), 22–33.
- Schleiff, E., Soll, J., Kuchler, M., Kühlbrandt, W., & Harrer, R. (2003). Characterization of the translocon of the outer envelope of chloroplasts. *The Journal of Cell Biology*, 160(4), 541–551.
- Schmidt, W., Drews, G., Weckesser, J., & Mayer, H. (1980). Lipopolysaccharides in four strains of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis*. *Archives of Microbiology*, 127(3), 217–222.
- Schnell, D. J., Kessler, F., & Blobel, G. (1994). Isolation of components of the chloroplast protein import machinery. *Science (New York, N.Y.)*, 266(5187), 1007–1012.
- Shigenobu, S., & Stern, D. L. (2013). *Aphids* evolved novel secreted proteins for symbiosis with bacterial endosymbiont. *Proceedings. Biological Sciences*, 280(1750), 20121952.
- Silverstein, K. A. T., Moskal, W. A., Wu, H. C., Underwood, B. A., Graham, M. A., Town, C. D., & VandenBosch, K. A. (2007). Small cysteine-rich peptides resembling antimicrobial peptides have been under-predicted in plants. *The Plant Journal*, 51(2), 262–280.
- Singer, A., Poschmann, G., Mühlich, C., Valadez-Cano, C., Hänsch, S., Hüren, V., Rensin S. A., Stühler K., Nowack, E. C. M. (2017). Massive protein import into the early-evolutionary-stage photosynthetic organelle of the amoeba *Paulinella chromatophora*. *Current Biology*, 27(18), 2763–2773.
- Sjuts, I., Soll, J., & Bölter, B. (2017). Import of soluble proteins into chloroplasts and potential regulatory mechanisms. *Frontiers in Plant Science*, 8, 168.

- Stackebrandt, E., Murray, R. G. E., & Truper, H. G. (1988).** Proteobacteria classis nov., a name for the phylogenetic taxon that includes the “purple bacteria and their relatives.” *International Journal of Systematic Bacteriology*, 38(3), 321–325.
- Steiner, J. M., Yusa, F., Pompe, J. A., & Löffelhardt, W. (2005).** Homologous protein import machineries in chloroplasts and cyanelles. *The Plant Journal*, 44(4), 646–652.
- Stengel, A., Benz, J. P., Buchanan, B. B., Soll, J., & Bölder, B. (2009).** Preprotein import into chloroplasts via the Toc and Tic complexes is regulated by redox signals in *Pisum sativum*. *Molecular Plant*, 2(6), 1181–1197.
- Stengel, A., Benz, P., Balsera, M., Soll, J., & Bölder, B. (2008).** TIC62 redox-regulated translocon composition and dynamics. *Journal of Biological Chemistry*, 283(11), 6656–6667.
- Tiricz, H., Szucs, A., Farkas, A., Pap, B., Lima, R. M., Maroti, G., Kondorosi, É., Kereszt, A. (2013).** Antimicrobial nodule-specific cysteine-rich peptides induce membrane depolarization-associated changes in the transcriptome of *Sinorhizobium meliloti*. *Applied and Environmental Microbiology*, 79(21), 6737–6746.
- Tranel, P. J., Froehlich, J., Goyal, A., & Keegstra, K. (1995).** A component of the chloroplastic protein import apparatus is targeted to the outer envelope membrane via a novel pathway. *The EMBO Journal*, 14(11), 2436–2446.
- Tremouilhac, P., Strandberg, E., Wadhvani, P., & Ulrich, A. S. (2006).** Synergistic transmembrane alignment of the antimicrobial heterodimer PGLa/Magainin. *Journal of Biological Chemistry*, 281(43), 32089–32094.
- Tu, S.-L., Chen, L.-J., Smith, M. D., Su, Y.-S., Schnell, D. J., & Li, H.-M. (2004).** Import pathways of chloroplast interior proteins and the outer-membrane protein OEP14 converge at Toc75. *The Plant Cell*, 16(8), 2078–88.
- Van de Velde, W., Zehirov, G., Szatmari, A., Debreczeny, M., Ishihara, H., Kevei, Z., Farkas, A., Mikulass, K., Nagy, A., Tiricz, H., Satiat-Jeunemaître, B., Alunni, B., Bourge, M., Kucho, K., Abe, M., Kereszt, A., Maroti, G., Uchiumi, T., É., Mergaert, P. (2010).** Plant peptides govern terminal differentiation of bacteria in symbiosis. *Science*, 327(5969), 1122–1126.
- Villarejo, A., Burén, S., Larsson, S., Déjardin, A., Monné, M., Rudhe, C., Karlsson, J., Jansson, S., Lerouge, P., Rolland, N., von Heijne, G., Grebe, M., Bako, L., Samuelsson, G. (2005).** Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast. *Nature Cell Biology*, 7(12), 1224–1231.

- Waadt, R., & Kudla, J. (2008).** *In planta* visualization of protein interactions using bimolecular fluorescence complementation (BiFC). *CSH Protocols*, 2008, pdb.prot4995.
- Wada, H., Murata, N. (1998).** Membrane Lipids in Cyanobacteria. In: Paul-André S., Norio M. (eds) *Lipids in Photosynthesis: Structure, Function and Genetics. Advances in Photosynthesis and Respiration*, vol 6. Springer, Dordrecht
- Widiez, T., Symeonidi, A., Luo, C., Lam, E., Lawton, M., & Rensing, S. A. (2014).** The chromatin landscape of the moss *Physcomitrella patens* and its dynamics during development and drought stress. *The Plant Journal*, 79(1), 67–81.
- Wimley, W. C. (2010).** Describing the mechanism of antimicrobial peptide action with the interfacial activity model. *ACS Chemical Biology*, 5(10), 905–917.
- Wollman, F.-A. (2016).** An antimicrobial origin of transit peptides accounts for early endosymbiotic events. *Traffic*, 17(12), 1322–1328.
- Yang, D., Oyaizu, Y., Oyaizu, H., Olsent, G. J., & Woese, C. R. (1985).** Mitochondrial origins. *Evolution*, 82, 4443–4447.
- Yoon, H. S., Reyes-Prieto, A., Melkonian, M., & Bhattacharya, D. (2006).** Minimal plastid genome evolution in the *Paulinella* endosymbiont. *Current Biology*, 16(17), R670–R672.
- Yu, S.-W., Wang, Y., Frydenlund, D. S., Ottersen, O. P., Dawson, V. L., & Dawson, T. M. (2009).** Outer mitochondrial membrane localization of apoptosis-inducing factor: mechanistic implications for release. *ASN Neuro*, 1(5). e00021
- Zhang, R., Nowack, E. C. M., Price, D. C., Bhattacharya, D., & Grossman, A. R. (2017).** Impact of light intensity and quality on chromatophore and nuclear gene expression in *Paulinella chromatophora*, an amoeba with nascent photosynthetic organelles. *The Plant Journal*, 90(2), 221–234.

## 6 Ergänzende Daten

Auf dem beiliegenden Datenträger befinden sich ergänzende Excel-Tabellen. Diese wurden in (Singer *et al.* 2017) publiziert. Außerdem befindet sich eine elektronische Version dieser Arbeit auf dem Datenträger.

**Tabelle S1 Übersicht über die MS-identifizierten Proteine.** Die Tabelle zeigt alle Proteine, die in gesamten Zelllysaten und den isolierten Chromatophoren identifiziert wurden. Die Tabelle beinhaltet die Anzahl der (einzigen) Peptide, die innerhalb eines Proteins identifiziert wurden, durchschnittliche Ionenintensitäten, sowie die Standardabweichung (SD) für Proteine, die in Zelllysaten ( $Int_L$ ) und den isolierten Chromatophoren ( $Int_C$ ) identifiziert wurden, die Differenz zwischen den durchschnittlichen Ionenintensitäten in den isolierten Chromatophoren und den Zelllysaten ( $Int_C - Int_L$ ), in wie vielen der untersuchten Proben das Protein identifiziert wurde und ob es als Importkandidat und als Protein, welches mit hoher Konfidenz (HK Protein) identifiziert wurde, betrachtet wird. Zudem zeigt die Tabelle zusätzliche Informationen zu der Größe der Proteine und ob die Vollängen (VL) Information für das Transkript vorhanden ist. Diese wird durch die Präsenz einer *spliced leader* (SL) Sequenz am 5'-Ende des Transkripts oder eines vorgeschalteten Stoppcodons im gleichen Leseraster wie das Start-Methionin, sowie eines Stoppcodons im 3'-terminalen Ende des Transkripts bestätigt. Außerdem zeigt die Tabelle, ob das identifizierte Protein in die Klasse der kurzen (K) oder langen (L) Proteine einsortiert ist, die Präsenz eines Chromatophor-Transitpeptids (crTP), welche Proteine für das Training und welche als Testsatenset für die *in silico*-Vorhersage mittels SVM und HMM genutzt wurden und welche MS-identifizierten Proteine durch SVM&HMM\_2 als Importkandidaten vorhergesagt wurden. Zudem zeigt die Tabelle die Identität der in Abbildung 2.5-2 und 2.5-3 dargestellten Sequenzen und welche Proteine einen EGT- oder HGT-Ursprung haben. Die Annotation der kurzen Importkandidaten erfolgte mittels Blast2Go mit einer E-Wert-Grenze von  $1.0E-6$  und wurde manuell korrigiert.

**Tabelle S2 Vorhergesagte Importkandidaten.** Die Tabelle führt alle Proteine auf, welche mithilfe der *support vector machine* (nur SVM) mit einem Grenzwert von 0,663, mit dem Hidden Markov Modell (nur HMM) mit mindestens zwei identifizierten Motiven oder mit beiden Modellen identifiziert wurden. Zudem zeigt es ist die Präsenz einer *spliced leader* (SL) Sequenz am 5'-Ende des Transkripts, die Annotation des besten Blasthits, sowie den SVM-Wert und die Anzahl der HMM-identifizierten Motive. Die Präsenz eines Chromatophor-Transitpeptids (crTP) wurde manuell durch das Alignment der N-terminalen Sequenzen der vorhergesagten Proteine bestätigt. Außerdem werden Proteine, welche während der MS-Untersuchung als Importkandidaten identifiziert wurden, aufgeführt.

**Tabelle S3 Übersicht über potentielle Importkandidaten.** Die Liste beinhaltet alle 207 Wirts-kodierten Proteine, welche während der MS-Untersuchung als Importkandidaten identifiziert wurden und die 291 *in silico* vorhergesagten Importkandidaten, für die die Präsenz eines Chromatophoren-Transitpeptids (crTP) manuell bestätigt werden konnte. Annotation des besten Blasthits, zugeordnete KEGG Orthologie und GO-Termini sind gezeigt. Basierend auf diesen Informationen wurden die Importkandidaten in putative funktionale Kategorien sortiert. Außerdem ist der mögliche EGT- oder HGT-Ursprung der Proteine angegeben.

## 7 Manuskripte

Das folgende Manuskript wurde am 25. September 2017 im Journal Current Biology publiziert:

‘Massive Protein Import into the Early-Evolutionary-Stage Photosynthetic Organelle of the Amoeba *Paulinella chromatophora*’

Autoren: Anna Singer, Gereon Poschmann, Cornelia Mühlich, Cecilio Valadez-Cano, Sebastian Hänsch, Vanessa Hüren, Stefan A. Rensing, Kai Stühler, Eva C. M. Nowack

Nachfolgend aufgelistet sind die Abbildungen und Tabellen aus dem Manuskript, die übernommen oder abgewandelt auch als Abbildung oder Tabelle in dieser Dissertation verwendet wurden (mit entsprechender Abbildungs-/Tabellennummer):

| <b>Abbildung/ Tabelle im Manuskript</b> | <b>Abbildung/ Tabelle in Dissertation</b> |
|-----------------------------------------|-------------------------------------------|
| Figure 1                                | Abbildung 2.2-2                           |
| Figure 2                                | Abbildung 2.5-1                           |
| Figure 3                                | Abbildung 2.5-2                           |
| Figure 4 A                              | Abbildung 2.5-4                           |
| Figure 4 B, C, D                        | Abbildung 2.5-5                           |
| Figure 4 E, F                           | Abbildung 2.7-1                           |
| Figure 5                                | Abbildung 2.8-1                           |
| Figure 6                                | Abbildung 2.9-1                           |
| Figure S1                               | Abbildung 2.2-1                           |
| Figure S2                               | Abbildung 2.4-1                           |
| Figure S3                               | Abbildung 2.6-1                           |
| Figure S4                               | Abbildung 2.5-3                           |
| Table S1                                | Tabelle 2.2-1                             |
| Table S2                                | Tabelle 2.2-2                             |
| Table S3                                | Tabelle S1                                |
| Table S4                                | Tabelle S2                                |
| Table S5                                | Tabelle S3                                |
| Table S6                                | Tabelle 4.2-2                             |
| Table S7                                | Tabelle 4.2-3                             |

Das den Experimenten zugrundeliegende Material für die MS-Untersuchung wurde von mir isoliert und bereitgestellt. Zudem wurden die Rohdaten von mir ausgewertet. Gereon Poschmann und Kai Stühler führten die massenspektrometrische Untersuchung durch und stellten die Rohdaten bereit. Cornelia Mühlich und Stefan A. Rensing entwickelten anhand der ausgewerteten MS-Daten die in silico Vorhersagen für lange Importkandidaten und stellten die Rohdaten für die Auswertung bereit. Cecilio Valadez-Cano half bei der Auswertung der Daten. Sebastian Hänsch half bei der Erstellung der Aufnahmen am Konfokalmikroskop. Eva C. M. Nowack hat an der Auswertung der Rohdaten mitgearbeitet und das Manuskript verfasst.

Ich bestätige hiermit die Richtigkeit dieser Angaben.

20.12.2017, Leverkusen

### Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Menschen bedanken, die mich auf meinem Weg begleitet und bei der Erstellung dieser Arbeit unterstützt haben.

Zunächst möchte ich einen großen Dank an Eva Nowack für das interessante und vielseitige Projekt aussprechen. Vielen Dank für die großartige Unterstützung, dass du immer Zeit und eine offene Tür für Fragen hattest und mich mit deinen kreativen Ideen begleitet hast.

Ich danke Prof. Dr. Andreas Weber für die Annahme des Zweitgutachtens und die immer konstruktiven und hilfreichen Besprechungen.

Ein besonderer Dank gilt meiner Kollegin Sofia, die während der letzten drei Jahre zu einer sehr guten Freundin geworden ist. Vielen Dank für deine stets aufmunternden Worte, deine Unterstützung und deine Geduld. Auch allen weiteren Mitgliedern des „Evaluation“-Labors, Jorge, Linda, Georg und Jan möchte ich für eine lustige Zeit und eine tolle Arbeitsatmosphäre danken. Danke, dass ihr immer hilfsbereit und offen für Fragen wart, für die interessanten Diskussionen und die vielen gemeinsam verbrachten Mittagspausen. Bei Linda und Georg möchte ich mich außerdem für das Korrekturlesen dieser Arbeit bedanken, ihr seid die Besten!

Auch den Feldis möchte ich an dieser Stelle danken. Danke für die tolle Stimmung im Institut, die konstruktiven Seminare und den vielen Sekt.

Außerdem gilt ein großer Dank natürlich meiner Familie und Freunden. Ohne eure Unterstützung wäre das alles nicht möglich gewesen.

Als letztes möchte ich meinem Mann Tobias Singer danken. Deine Unterstützung hat mich während des gesamten Studiums begleitet. Danke dass du mich auch während der schwierigen Phasen nicht hast aufgeben lassen und mir immer motivierend und humorvoll zur Seite gestanden bist.

Vielen Dank!