Philipps Universität Marburg

Die erste funktionelle Charakterisierung einer eukaryot kodierten Bilin Lyase

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Kathrin Bolte

aus Bad Nauheim

Marburg/ Lahn 2009

Vom Fachbereich Biologie der Philipps-Universität Marburg
als Dissertation am 29. 04. 2009 angenommen.

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

Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl
Prof. Dr. Andreas Brune

Tag der mündliche Prüfung am: 07. 05. 2009

Für meine Familie

Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden publiziert in:

Bolte K, Kawach O, Prechtl J. Grünheit N, Nyalwidhe J, Maier UG. 2008. Complementation of a phycocyanin-bilin lyase from Synechocystis sp. PCC 6803 with a nucleomorph-encoded open reading frame from the cryptophyte Guillardia theta. BMC Plant Biol. 8: 56

weitere Publikationen:

Übersichtsartikel:

Bolte K, Bullmann L, Hempel F, Bozarth A, Zauner S, Maier UG. 2009. Protein Targeting into Secondary Plastids. J Eukaryot Microbiol. In Press.

I. Inhaltsverzeichnis

I. INHALTSVERZEICHNIS ..... I-IV

II. ABKÜRZUNGEN V

III. TABELLEN UND ABBILDUNGEN VI

1. EINLEITUNG ..... - 1 -

1.1 Entstehung phototropher Eukaryoten ..... - 1 -
1.1.1 Primäre Endosymbiose ..... - 1 -
1.1.2 Sekundäre Endosymbiose ..... - 2 -

1.2 Die Cryptophyte *Guillardia theta* ..... - 5 -
1.2.1 Das Genom des Nukleomorphs – ein Modell für nukleäre Kompaktierung ..... - 6 -

1.3 Das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803 ..... - 8 -

1.4 Phycobiliproteine – akzessorische Pigmente ..... - 9 -
1.4.1 Phycoerythrin – ein Pigment der Cryptophyte *Guillardia theta* ..... - 11 -
1.4.1.1 Kodierung ..... - 12 -
1.4.1.2 Lokalisation ..... - 12 -
1.4.1.3 Organisation ..... - 13 -
1.4.1.4 Phylogenetische Entwicklung ..... - 13 -
1.4.2 Phycocyanin und Allophycocyanin – Pigmente des Cyanobakteriums *Synechocystis* ..... - 14 -
1.4.2.1 Kodierung ..... - 14 -
1.4.2.2 Lokalisation ..... - 15 -
1.4.2.3 Organisation ..... - 15 -

1.5 Bilin Lyasen – essentielle Proteine zur optimalen Funktion von Phycobiliproteinen ..... - 17 -
1.5.1 Cyanobakterielle Bilin Lyasen des E/F – Typs ..... - 17 -
1.5.2 Cyanobakterielle Bilin Lyasen des S/U – Typs ..... - 18 -
1.5.3 Cyanobakterielle Bilin Lyasen des T – Typs ..... - 19 -

2. AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG ..... - 20 -

3. ERGEBNISSE ..... - 21 -

3.1 Das Nukleomorph-kodierte Protein Orf222 der Cryptophyte *Guillardia theta* ..... - 21 -

3.2 Generierung einer Δ*slr*1649_Komp222 Mutante in *Synechocystis* sp. PCC6803 ..... - 23 -
3.2.1 Kontrollexperimente ..... - 25 -

3.3 Charakterisierung der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante ..... - 26 -
3.3.1 Phänotypisches Erscheinungsbild ..... - 26 -
3.3.2 Untersuchungen der Phycobilisomen der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante ..... - 28 -
3.3.2.1 Isolation intakter Phycobilisomen ..... - 28 -
3.3.2.2 Negativ-Staining isolierter intakter Phycobilisomen ..... - 30 -
3.3.2.3 Untersuchungen einzelner Phycobilisomen Untereinheiten ..... - 31 -
3.3.2.3.1 Gelelektrophoretische Analysen ..... - 31 -
3.3.2.3.2 Proteolytische Experimente ..... - 33 -

3.4 Phylogenetische Analyse des Proteins Orf222 und seiner Homologen ..... - 35 -

4. DISKUSSION ..... - 37 -

4.1 Die Komplementations-Mutante Komp222_Δ*slr*1649 ..... - 37 -
4.1.1 Eindeutiger makroskopischer Phänotyp ..... - 39 -
4.1.2 Phycobilisomen der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante sind denen des Wildtyps gleichzusetzen ..... - 40 -
4.1.2.1 Untersuchungen intakter Phycobilisomen ..... - 40 -
4.1.2.2 Untersuchungen einzelner Phycobilisomen Untereinheiten ..... - 42 -
4.1.2.2.1 Die Rod-Linker Proteine CpcC2 und CpcD werden in der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante exprimiert und in die Phycobilisomen integriert. ..... - 42 -
4.1.2.2.2 Die Phycocyanin β-Untereinheit der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante trägt an zwei verschiedenen Positionen zwei Biline. ..... - 43 -

4.2 Das Nukleomorph-kodierte Protein Orf222 – ein funktionelles Ortholog einer Phycocyanin-Bilin Lyase ..... - 45 -

4.3 Funktionelles Phycoerythrin in *Guillardia theta* – eine Beteiligung von drei Genomen ..... - 49 -

4.4 Das Nukleomorph-kodierte Protein Orf222 aus *Guillardia theta* und seine Homologen ..... - 51 -
4.4.1 Orf222 Homologe in Cyanobakterien ..... - 52 -
4.4.2 Das Orf222 Homolog des Cyanophagen S-PM2 ..... - 56 -
4.4.3 Orf222 Homologe in Landpflanzen ..... - 57 -
4.4.4 Das Homolog der Thecamöbe *Paulinella chromatophora* ..... - 59 -
4.4.5 Orf222 Homologe in Rhodophyten und Cryptophyten ..... - 60 -

4.5 Das Nukleomorph von *Guillardia theta* – Zwischenstadium oder dauerhafte Existenz? ..... - 61 -
4.5.1 Nukleomorph-kodierte, plastidäre Proteine ..... - 62 -

5. ZUSAMMENFASSUNG ..... - 64 -

6. MATERIAL ..... - 65 -

6.1 Chemikalien ..... - 65 -

6.2 Puffer, Medien, Lösungen und Reagenzien ..... - 65 -

6.3 Geräte ..... - 65 -

6.4 Hard- und Software ..... - 67 -

6.5 molekularbiologische Kits ..... - 68 -

6.6 Enzyme ..... - 68 -

6.7 Längen- und Molekulargewicht-Standards ..... - 69 -

6.8 Oligonukleotide ..... - 69 -

6.9 Antikörper ..... - 70 -

6.10 Vektoren ..... - 70 -

6.11 Bakterienstämme ..... - 71 -

7. METHODEN ..... - 71 -

7.1 Kulturbedingungen der Cryptophyte *Guillardia theta* ..... - 71 -

7.2 Kulturbedingungen von *Synechocystis* sp. PCC6803 ..... - 72 -

7.3 Stamm- und Kulturhaltung von *Escherichia coli* ..... - 73 -

7.4 Netzwerk Konstruktion ..... - 73 -

7.5 Nukleinsäureanalytik ..... - 73 -

7.5.1 Isolation von Nukleinsäuren ..... - 73 -

7.5.1.1 Isolation von genomischer DNA aus *Guillardia theta* ..... - 73 -

7.5.1.2 Isolation von DNA aus *Synechocystis* sp. PCC6803 ..... - 74 -

7.5.1.3 Isolation von RNA aus *Synechocystis* sp. PCC6803 ..... - 74 -

7.5.1.4 Isolation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* ..... - 75 -

7.5.2 Präzipitation von Nukleinsäuren ..... - 75 -

7.5.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren ..... - 76 -

7.5.4 DNaseI Behandlung von Nukleinsäuren ..... - 76 -

7.5.5 Amplifikation von Nukleinsäuren ..... - 76 -

7.5.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ..... - 76 -

7.5.5.2 Reverse Transkription (RT-PCR) ..... - 77 -

7.5.6 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren ..... - 77 -

7.5.7 Elution niedermolekularer DNA aus Agarose ..... - 77 -

7.5.8 Modifikation von Nukleinsäuren ..... - 78 -

7.5.8.1 Restriktion von DNA ..... - 78 -

7.5.8.2 Ligation von DNA ..... - 78 -

7.5.9 Transformation von *Escherichia coli* ..... - 78 -

7.5.10 Transformation von *Synechocystis* sp. PCC6803 - 79 -
7.5.11 Sequenzanalysen von Nukleinsäuren - 79 -
7.5.11.1 Das LiCOR System - 79 -
7.5.11.2 Das ABI-System - 80 -

7.6 Proteinanalytik - 81 -
7.6.1 Herstellung von *Synechocystis* Proteinextrakt - 81 -
7.6.2 Aufkonzentrierung von Proteinen - 81 -
7.6.2.1 TCA-Fällung - 81 -
7.6.2.2 Chloroform-Methanol-Fällung - 82 -
7.6.3 Quantitative Proteinbestimmung - 82 -
7.6.4 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen - 83 -
7.6.5 Nachweis und Quantifizierung - 84 -
7.6.5.1 Kollodiale Coomassie-Färbung - 84 -
7.6.5.2 $ZnSO_4$-Färbung - 85 -
7.6.6 Immobilisierung und Immundetektion von Proteinen - 85 -
7.6.7 Semidry Westernblot - 85 -
7.6.8 Immundetektion von Proteinen - 86 -
7.6.9 Isolation intakter Phycobilisomen aus *Synechocystis* - 86 -
7.6.10 Proteolytische Experimente - 87 -
7.6.11 Negativ-Staining isolierter intakter Phycobilisomen - 87 -
7.6.12 Pigmentanalysen - 87 -
7.6.12.1 Konzentrationsbestimmung von Chlorophyll - 87 -
7.6.12.2 Konzentrationsbestimmung von Phycocyanin - 88 -

8. LITERATUR - 89 -

9. ANHANG - 100 -

9.1 Accession Numbers - 100 -

9.2 Nukleomorph-kodierte plastidäre Proteine - 101 -

II. Abkürzungen

(v/v)	volume per volume	*mesh*	Maschenweite in µm
(w/v)	weight per volume	mg	Milligramm, 10^{-3} Gramm
°C	Grad Celsius	Mio.	Millionen
µE	Mikroeinstein, 10^{-6} Einstein	ml	Milliliter, 10^{-3} Liter
µg	Mikrogramm, 10^{-6} Gramm	min	Minuten
µl	Mikroliter, 10^{-6} Liter	mm	Millimeter, 10^{-3} Meter
µM	Mikromol, 10^{-6} M	mM	Millimolar, 10^{-3} M
APS	Ammonium Persulfat	Mrd.	Milliarden
Bp	Basenpaar(e)	mRNA	*messenger* RNA
BTS	*bipartite topogenic signal*	ng	Nanogramm, 10^{-9} Gramm
cDNA	*complementary* DNA	nm	Nanometer, 10^{-9} Meter
cm	Zentimeter	OD	optische Dichte
cm^2	Quadratzentimeter	orf	*open reading frame*, offener Leserahmen
CTAB	Cetyltrimethylammonium-bromid	PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Da	Dalton	pmol	picomol, 10^{-12} molar
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PPC	periplastidäres Kompartiment
ddNTP	Didesoxyribonukleotidtriphosphat	qRT-PCR	quantitative *real-time* PCR
DUF	*domain of unknown function*	RNA	Ribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemiluminiscence	rRNA	*ribosomal* RNA
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	rpm	*rounds per minute*; Umdrehungen pro
ER	endoplasmatisches Reticulum		Minute
g	Gramm	RT	Raumtemperatur
g	Erdbeschleunigung	s	Sekunde
h	Stunde	SDS	Natriumdodecylsulfat
H_2Od	Wasser, einfach destilliert	TAT	twin arginine transporter
H_2Odd	Wasser, dopplet destilliert	TCA	Trichloressigsäure
HRP	Horseredish Peroxidase	TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
IgG	Immunglobulin G	T_M	Schmelztemperatur
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalactopyranosid	Triton-X-100	Octophenolpoly(ethylenglycolether)$_n$
kBp	Kilobasenpaare, 10^3 Basenpaare	tRNA	*transfer* RNA
kDa	Kilodalton, 10^3 Dalton	U	Units
l	Liter	ü.N.	über Nacht
M	Mol l^{-1}	V	Volt
mA	Milliampere, 10^{-3} Ampere	X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl- -D-
mBp	Megabasenpaar, 10^6 Basenpaare		galactopyranosid

III. Tabellen und Abbildungen

Abb. 1-1: Schema der primären Endosymbiose. - 1 -

Abb. 1-2: Schema zur Entstehung komplexer Plastiden durch sekundäre Endosymbiose. - 3 -

Abb. 1-3: Darstellungen der Cryptophyte *Guillardia theta*. - 5 -

Abb. 1-4: Das Nukleomorph Genom der Cryptophyte *Guillardia theta*. - 7 -

Abb. 1-5: Transmissionselektronen-mikroskopische Aufnahme einer *Synechocystis* Zelle. - 8 -

Abb. 1-6: Allgemeine Darstellung des Aufbaus von Phycobiliproteinen. - 9 -

Abb. 1-7: Darstellung bekannter Phycobiliproteine mit möglichen Bilinen. - 10 -

Abb. 1-8: Darstellung der Organisation Phycobiliproteine des Cyanobakteriums *Synechocystis*. - 16 -

Abb. 3-1: Alignment der Aminosäuresequenzen des Orf222 und einiger ausgewählter Homologer. - 22 -

Abb. 3-2: Schematische Darstellung des Konstruktes zur Komplementation. - 24 -

Abb. 3-3: Kontrolle der generierten Komp222_ Δ*slr*1649 Zellen. - 26 -

Abb. 3-4: Phänotypische Charakterisierung der generierten Komp222_ Δ*slr*1649 Kultur. - 27 -

Abb. 3-5: Vergleichende Analysen des Pigmentgehaltes. - 28 -

Abb. 3-6: Untersuchungen intakter Phycobilisomen. - 29 -

Abb. 3-7: Negativ-Staining isolierter intakter Phycobilisomen. - 31 -

Abb. 3-8: SDS-PAGE Analyse isolierter Phycobilisomen. - 32 -

Abb. 3-9: Theorie des durchgeführten proteolytische Assays. - 33 -

Abb. 3-10: Auftrennung proteolytisch behandelter Phycobilisomen mittels SDS-Tricin PAGE. - 34 -

Abb. 3-11: NeighborNet (NNet) splits Graph für 43 homologe Proteine. - 36 -

Abb. 4-1: Modell zu Synthese und Transport von funktionellen Phycoerythrin Einheiten in *G. theta*. - 50 -

Abb. 6-1: Verwendete Längen- und Molekulargewichtsstandards. - 69 -

Tabelle 4-1: Aufstellung aller untersuchten prokaryoten homologen Proteine. - 53 -

Tabelle 4-2: Aufstellung aller untersuchten eukaryoten homologen Proteine. - 57 -

Tabelle 9-1: Accession Numbers der Proteinsequenzen zur Berechnung des Netzwerks. -100-

Tabelle 9-2: Auflistung identifizierter Gene Nukleomorph-kodierter plastidärer Proteine. -101-

1. EINLEITUNG

1.1 Entstehung phototropher Eukaryoten

1.1.1 Primäre Endosymbiose

Die Etablierung eines anzestralen Cyanobakteriums als intrazellulären Endosymbionten gab Eukaryoten erstmals die Möglichkeit zum autotrophen Leben. Bereits 1883 postulierte Schimper die symbiontische Entstehung der Chloroplasten (Schimper 1883) und wurde damit zum Wegbereiter der später formulierten Endosymbionten-Theorie. Auch Mereschkowsky nahm 1905 an, dass Plastiden und die heutigen Cyanobakterien gemeinsame Vorläufer besitzen (Mereschkowsky 1905, Mereschkowsky 1910). Die Hypothese wurde durch die Entdeckung des Plastidengenoms untermauert (Ris und Plaut 1962, Chun et al. 1963) und führte einige Jahre später zur Formulierung der Endosymbionten-Theorie (Margulis 1970). Letztere besagt, dass ein anzestrales, zur oxygenen Photosynthese befähigtes Cyanobakterium durch eine biflagellate, heterotrophe Wirtszelle internalisiert, jedoch nicht metabolisiert sondern als intrazellulärer Endosymbiont etabliert wurde (Margulis 1970, McFadden und Gilson 1995, Stoebe und Maier 2002). Dies geschah zunächst durch die Stabilisierung des aufgenommenen phototrophen Eukaryoten innerhalb einer phagotrophen Vakuole.

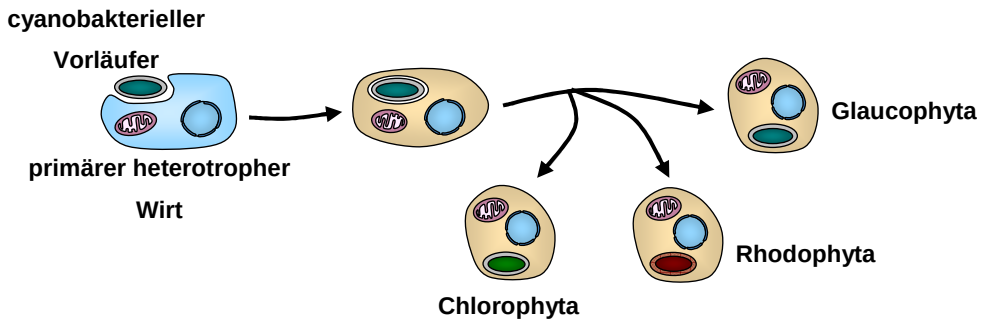

Abb. 1-1: Schema der primären Endosymbiose nach Stoebe und Maier 2002. Die Aufnahme eines cyanobakteriellen Vorläufers und dessen intrazelluläre Etablierung als Endosymbiont führte zur Entstehung primärer Plastiden in den drei rezenten Linien.

Eine dauerhafte intrazelluläre Etablierung des Endosymbionten führte zu einem von zwei Membranen, dem *plastid envelope*, umgebenen semiautonomen Organell, der primären Plastide (Abb. 1-1). Die innere der beiden Hüllmembranen stellt die ehemalige Plasmamembran des Endosymbionten dar (Cavalier-Smith 2000), während die äußere Hüllmembran sowohl pro- als auch eukaryote Züge aufweist (Bolter et al. 1998, Reumann et al. 1999). Die Integration des Endosymbionten in die Wirtszelle erfolgte einerseits durch den Verlust redundanter Gene (Delwiche und Palmer 1997) sowie andererseits durch den Transfer von genetischem Material vom Genom des Endosymbionten in den Zellkern des Wirtes (Martin und Herrmann 1998, Martin et al. 1998, Martin et al. 2002). Diese essentiellen, heute im Wirtskern kodierte Proteine werden durch ein effizientes Proteintransport-System in die Plastide reimportiert (Soll und Schleiff 2004).

Phylogenetische Analysen belegen einen monophyletischen Ursprung aller primärer phototropher Organismen (Martin et al. 2002, Yoon et al. 2004). Aus einem gemeinsamen Vorgänger entstanden die drei heute rezenten Linien; die Rhodophyta (Rotalgen), Chlorophyta (Grünalgen) und die sehr ursprüngliche kleine Gruppe der Glaucophyta (Abb. 1-1), die sich phylogenetisch vor etwa 550 Mio. Jahren von den beiden ersten Gruppen abzweigte (Cavalier-Smith 2003).

1.1.2 Sekundäre Endosymbiose

Die Etablierung der Photosynthese in eukaryoten Organismen fand nicht nur im Zuge der primären Endosymbiose statt. Im Laufe der Evolution kam es zur Entstehung weiterer komplexerer Endosymbiosen. Die sekundäre Endosymbiose beschreibt hierbei einen Prozess, bei welchem in primärer Endosymbiose entstandene phototrophe Eukaryoten von weiteren heterotrophen Wirtszellen aufgenommen und durch sukzessive Reduktion als intrazelluläre eukaryote Endosymbionten etabliert wurden (Stoebe und Maier 2002, Cavalier-Smith 2003). Die dadurch entstandenen Plastiden werden aufgrund ihrer drei oder vier Hüllmembranen auch als komplexe Plastiden bezeichnet. Heute geht man davon aus, dass dieses Ereignis polyphyletischen Ursprungs ist und mindestens dreimal unabhängig voneinander stattgefunden hat (Abb. 1-2) (Rogers et al. 2007).

Die Entstehung der Gruppen der Euglenophyten sowie der Chlorarachniophyten sind auf zwei unabhängige endosymbiontische Ereignisse zurückzuführen, wobei in beiden Fällen der aufgenommene phototrophe Eukaryot eine Chlorophyte war (Abb. 1-2). Eine weitere Gruppe stellen die sogenannten Chromalveolaten dar, deren Endosymbiont auf eine ehemalige Rhodophyte zurückzuführen ist (Abb. 1-2) (Cavalier-Smith 1999, Cavalier-Smith 2003). Aufgrund zahlreicher phylogenetischer Analysen könnte ein monophyletischer Ursprung postuliert werden (Zhang et al. 2000, Yoon et al. 2002, Harper und Keeling 2003, Harper et al. 2005). Den Chromalveolaten werden die Heterokontophyta, Haptophyta und Cryptophyta als Chromisten, sowie die peridinin-haltigen Dinoflagellaten und Apicomplexa als Alveolaten zugeordnet. Zu der Gruppe zählt man auch, aufgrund der Ähnlichkeit ihrer Wirtszellen die Gruppe der photosynthetisch inaktiven Ciliaten. Es wird angenommen, dass diese ihre Plastiden sekundär verloren haben (Cavalier-Smith 2002a, Tyler et al. 2006).

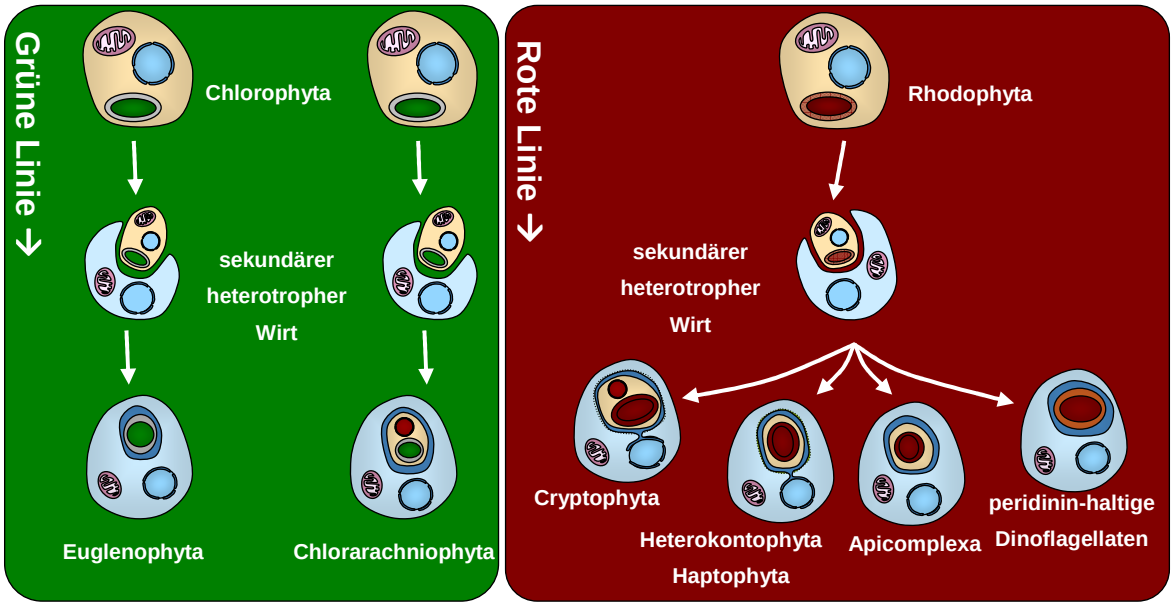

Abb. 1-2: Schema zur Entstehung komplexer Plastiden durch sekundäre Endosymbiose. Bei dem polyphyletischen Ereignis wurden unabhängig voneinander zweimal eine Chlorophyte und einmal eine Rhodophyte von einem sekundären heterotrophen Wirt als intrazellulärer Endosymbiont etabliert.

Analog zur primären kam es auch bei der sekundären Endosymbiose schrittweise zu einer Reduktion der Endosymbionten, der sich neben einem Transfer genetischer Information in den Nukleus des Wirtes oder deren Verlust, auch in der Eliminierung verschiedener Kompartimente des Endosymbionten wie z.B. Golgi-Apparat, ER oder des Nukleus äußert (Maier et al. 2000, Douglas et al. 2001). Zurück blieb eine, von drei oder vier Membranen umgebene, komplexe Plastide, deren inneres Membranenpaar dem *plastide envelope* der primären Plastide zugeordnet werden kann. Die äußerste Membran der Plastiden geht auf die Phagozytosemembran des Wirtes zurück (Cavalier-Smith 2000). Diese steht im Falle der Cryptophyten, Heterokontophyten und Haptophyten in einem Kontinuum mit dem ER der Wirtszelle (Cavalier-Smith 2003). Die folgende zweite Membran wird als ehemalige Plasmamembran des Endosymbionten betrachtet (Cavalier-Smith 2001). Heutige Vertreter unterscheiden sich in einigen Bereichen in ihren Entwicklungs- bzw. Reduktionsstufen. Während die Plastiden der Euglenophyten, Heterokontophyten, Haptophyten, peridinin-haltigen Dinoflagellaten und Apicomplexa direkt von drei oder vier Membranen umhüllt sind (Stoebe und Maier 2002, Hjorth et al. 2004), findet man sowohl bei Chlorarachniophyten als auch bei Cryptophyten den ursprünglichsten aller sekundären Plastidentypen. Den Endosymbionten beider Gruppen sind charakteristische eukaryote Merkmale erhalten geblieben. Beide Organismengruppen haben, obwohl polyphyletischen Ursprungs, sowohl ein reduziertes Restzytosol als auch den dezimierten Zellkern des eukaryoten Endosymbionten erhalten (Abb. 1-2) (Greenwood et al. 1977, Hibbert und Norris 1984, Maier et al. 2000). In der heutigen Terminologie werden diese als periplastidäres Kompartiment (PPC) und als Nukleomorph bezeichnet. Cryptophyten und Chlorarachniophyten besitzen somit vier unterschiedliche Genome (intertaxonische Kombination). Prokaryoten Ursprungs sind das Genom des Mitochondriums (Hauth et al. 2005) und das Genom der Plastide (Douglas und Penny 1999, Khan et al. 2007, Rogers et al. 2007), eukaryoten Ursprungs das Genom des Nukleomorph und das des Nukleus der Wirtszelle (Gilson und McFadden 1995, Zauner et al. 2000, Douglas et al. 2001, Gilson et al. 2006, Lane et al. 2007). Analog zu der Situation in primären Plastiden ist ein Großteil essentieller, plastidärer Proteine im Zellkern des Wirtes kodiert (Douglas et al. 2001, Armbrust et al. 2004, Gilson et al. 2006, Rogers et al. 2007). Ein Reimport dieser Proteine in

die komplexe Plastide ist für deren Funktion essentiell ist jedoch bis heute nicht vollständig geklärt (Hempel et al. 2007, Bolte et al. 2009).

1.2 Die Cryptophyte *Guillardia theta*

Ein etablierter Organismus zur Untersuchung von sekundären Endosymbiosen ist die unizellulare, heterokont begeißelte Cryptophyte *Guillardia theta* (*G. theta*). Der Organismus kommt ausschließlich in marinen Gewässern vor und zeichnet sich durch eine charakteristisch dorsoventrale Form aus (Abb. 1-3A,B). Die Cryptophyte besitzt keine Zellwand im eigentlichen Sinne, sondern einen Periplast aus polygonalen Proteinplatten, welcher der Plasmamembran innen anliegt.

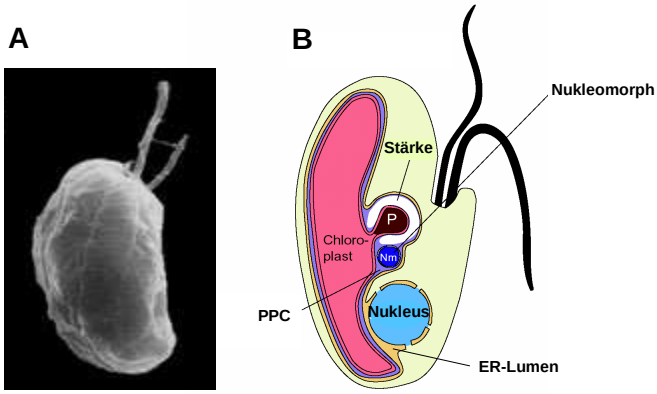

Abb. 1-3: Darstellungen der Cryptophyte *Guillardia theta*.
A, Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme (Bild von DOE Joint Genome Institute).
B, schematische Darstellung einer Zelle und ihrer komplexen Plastide. Nm Nukleomorph, PPC periplastidäres Kompartiment, P Pyrenoid. verändert nach Gilson 2001.

Pro Zelle besitzt *G. theta* eine einzelne, aus sekundärer Endosymbiose mit einer Rhodophyte entstandene komplexe Plastide, welche becherförmig in der Zelle angeordnet ist. Die komplexe Plastide besitzt vier Hüllmembranen, deren äußerste Membran ein Kontinuum mit dem ER der Wirtszelle bildet (Douglas et al. 2001). Der Endosymbiont liegt dadurch direkt im ER-Lumen des Wirtes (Abb. 1-3B). Die nächstfolgende, zweite Membran lässt sich wahrscheinlich auf die Plasmamembran des Endosymbionten zurückführen (Cavalier-Smith 2001), während die beiden innersten Membranen auf das *plastid envelope* der ehemals primären Plastide zurückzuführen sind.

Die Besonderheit aller Cryptophyten ist eine unvollständige Reduktion des eukaryoten Endosymbionten (Stoebe und Maier 2002, Hjorth et al. 2004). Zwischen zweiter und dritter Membran finden sich bis heute Reste des eukaryoten Endosymbionten in Form eines

Restzytosols, dem periplastidären Kompartiment. Charakteristisch für ein eukaryotes Zytoplasma konnten dort der reduzierte Zellkern, das Nukleomorph (Greenwood et al. 1977, Hofmann et al. 1994), sowie 80S Ribosomen (Gillot und Gibbs 1980) und Amylopektinkörner identifiziert werden. Eigenständige Mitochondrien konnten bislang nicht erkannt werden (Abb. 1-3B) (Douglas et al. 2001, Cavalier-Smith 2002b).

1.2.1 Das Genom des Nukleomorphs – ein Modell für nukleäre Kompaktierung

Das Nukleomorph stellt den rudimentären Zellkern des eukaryoten Endosymbionten dar (Douglas et al. 2001, Cavalier-Smith 2002b, Archibald 2007). Es hat neben seiner Kernhülle mit nukleären Poren auch drei, durch Genverlust und Gentransfer miniaturisierte, lineare Chromosomen erhalten. Im Rahmen eines internationalen Genomprojektes konnten die drei Chromosomen der Cryptophyte *G. theta* vollständig sequenziert und analysiert werden. Es kam im Jahr 2001 zum Abschluss und war zu diesem Zeitpunkt das kleinste bekannte eukaryote Genom (Douglas et al. 2001). Mittlerweile sind zwei weitere Nukleomorph Genome vollständig sequenziert (Gilson et al. 2006, Lane et al. 2007).

Das Nukleomorph Genom der Cryptophyte *G. theta* besitzt eine Größe von 551 kBp und kodiert insgesamt 513 Gene (Zauner et al. 2000, Douglas et al. 2001). Alle drei Chromosomen besitzen identische subtelomerische *inverted repeats* (Abb. 1-4A). Die Gendichte ist extrem hoch, da pro 977 Basenpaare ein Gen kodiert wird. Insgesamt 44, bis zu 76 Basenpaaren überlappende Gene verdeutlichen die Kompaktierung des Nukleomorph Genoms ebenso wie die sehr kurzen nicht-kodierenden Regionen (Douglas et al. 2001). Gerade einmal 17 protein-kodierende Gene enthalten spliceosomale Introns mit variablen Längen von 42 – 52 Basenpaaren, welche Standard-Nukleotid Begrenzungen GT/AG aufweisen (Douglas et al. 2001). Weiterhin konnte eine starke Häufung der kleinsten bekannten Introns in für tRNAs kodierenden Genen beobachtet werden (Zauner et al. 2000, Kawach et al. 2005). Von den 513 Genen kodieren 464 für putative Proteine (Douglas et al. 2001). Letzteren konnte zum Teil durch Datenbankanalysen eine Funktion zugeordnet werden, die Funktion von 219 putativen Proteinen bleibt jedoch unbekannt.

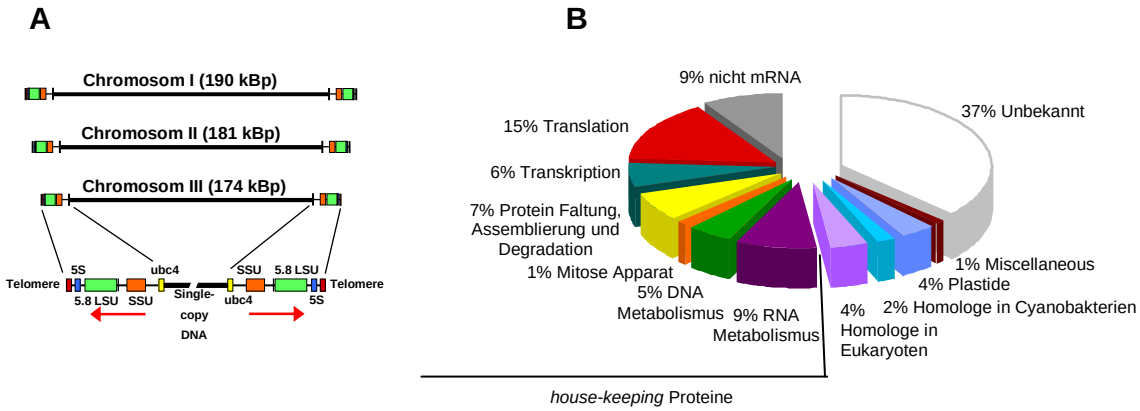

Abb. 1-4: Das Nukleomorph Genom der Cryptophyte *Guillardia theta*.
A, Darstellung der drei Chromosomen des Nukleomorph Genoms mit identischen *inverted repeats* nach Gilson 2001.
B, Einteilung der Nukleomorph-kodierten offenen Leserahmen nach funktionellen Kategorien nach Douglas et al. 2001.

Eine Einteilung der Proteine in verschiedene Kategorien ergab, dass ein Großteil für sogenannte *house-keeping* Funktionen zuständig ist (Douglas et al. 2001). Diese umfassen neben Chromosomenreproduktion und Genexpression einige wenige cytoplasmatische Funktionen wie Protein-Assemblierung und Degradation (Abb. 1-4B). Im Laufe der letzten Jahre wurden einige funktionell unbekannte Proteine als Komponenten der Proteintransport-Maschinerie postuliert (Sommer et al. 2007). 30 Proteine konnten aufgrund von Sequenzhomologien zu cyanobakteriellen Proteinen als putative Plastidenproteine identifiziert werden. Die Proteine besitzen im Vergleich zu den cyanobakteriellen Homologen N-terminale Extensionen, welche als Transitpeptide für einen Import in die Plastide fungieren (Wastl und Maier 2000). Neunzehn Proteinen konnten bereits putative Funktionen zugeordnet werden, wie z.B. dem an der Plastidenteilung beteiligten FtsZ-Protein oder dem für die Plastide essentiellen Kofaktor Rubredoxin (Fraunholz et al. 1998, Wastl et al. 2000). Die Funktion der verbleibenden elf Proteine ist jedoch weitgehend unbekannt.

1.3 Das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. PCC6803

Cyanobakterien, deren vielleicht prominentester Vertreter *Synechocystis* sp. PCC6803 (*Synechocystis*) ist, bilden eine zahlreiche und mannigfaltige Gruppe phototropher Prokaryoten, welche einen großen Beitrag zur globalen Photosynthese-Leistung erbringen (Ting et al. 2002). Fossile Funde lassen vermuten, dass erste, den heutigen Cyanobakterien ähnliche Organismen vor ca. 3,5 Mrd. Jahre auftraten (Schopf 1993). Klassifiziert werden die Cyanobakterien als Gram-negativ, da die Zellen von einer Plasmamembran, einer Peptidoglycanschicht und einer äußeren Membran begrenzt werden (Hoiczyk und Hansel 2000), phylogenetische Analysen implizieren jedoch eine Verwandtschaft mit Gram-positiven Bakterien (Hansmann und Martin 2000, Xiong et al. 2000). Sie sind die einzigen Prokaryoten mit Befähigung zur oxygenen Photosynthese, welche aufgrund der nicht vorhandenen Zellkompartimentierung gleichzeitig mit der Respiration innerhalb eines Kompartiments stattfindet (Vermaas 2001). Den meisten Cyanobakterien gemeinsam sind ihre Thylakoidstrukturen, welche ein internes Membransystem bilden. Allerdings sind auch Cyanobakterien ohne interne Thylakoidmembranen bekannt, dort finden Photosynthese und Respiration an einer Membran statt (Rippka et al. 1974). Für *Synechocystis* konnte gezeigt werden, dass die Thylakoidmembranen nicht in Verbindung mit der Plasmamembran stehen (Liberton et al. 2006). Das einzellige, coccoide, im Süßwasser lebende Cyanobakterium ist bereits seit vielen Jahren ein etablierter Modellorganismus für genetische und physiologische Studien der Photosynthese (Abb. 1-5A-C).

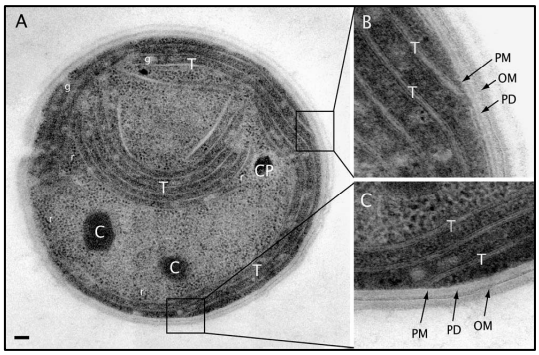

Abb. 1-5: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme einer *Synechocystis* Zelle (Liberton et al. 2006). B und C stellen vergrößerte Areale dar.
T Thylakoidmembranen, C Carboxysomen, CP Cyanophycin Granula, G Glycogen Granula, R Ribosomen, OM äußere Membran, PD Peptidoglykan Schicht. Balken 100nm.

Es ist durch natürliche Kompetenz genetisch manipulierbar, indem es exogene DNA aufnimmt und in das zirkuläre, in acht- bis zwölffacher Kopie vorliegende Genom integriert (Grigorieva und Shestakov 1982) und besitzt außerdem die Fähigkeit zum heterotrophen Wachstum (Rippka et al. 1979, Williams 1998). Die vollständige Sequenzierung des Genoms wurde 1997 zum Abschluss gebracht und war das damals erste bekannte cyanobakterielle Genom (Kaneko et al. 1996, Kaneko und Tabata 1997). Dieses ist, wie bei allen Prokaryoten, zirkulär organisiert, besitzt eine Größe von 3,573 mBp und zeichnet sich durch einen GC-Gehalt von 47,7% aus.

1.4 Phycobiliproteine – akzessorische Pigmente

Phycobiliproteine sind Antennenpigmente von Cyanobakterien, Rhodophyten, Glaucophyten und Cryptophyten. Sie erlauben diesen Organismen effiziente Lichtenergiesammlung in der sogenannten „Grünlücke“, wo die verschiedenen Chlorophylle nur spärlich absorbieren (MacColl und Guard-Friar 1987, Sidler 1994) und leiten diese Energie direkt weiter zu den Photosystemen. Heute sind verschiedene Phycobiliproteine bekannt. Dazu zählen das Phycocyanin, Phycoerythrin I und II (Esenbeck 1836), Phycoerythrocyanin und Allophycocyanin (Sorby 1877) aus Cyanobakterien und Rhodophyten, welche eine große monophyletische Familie von homologen heterodimeren Proteinen bilden, sowie die Phycocyanin und Phycoerythrin Varianten der Cryptophyten. Alle Phycobiliproteine besitzen ein oder mehrere assoziierte Pigmente (Kylin 1910), auch chromophore Gruppe genannt, welche der Klasse der Biline zugeordnet werden konnten (Abb. 1-6) (Lemberg 1930).

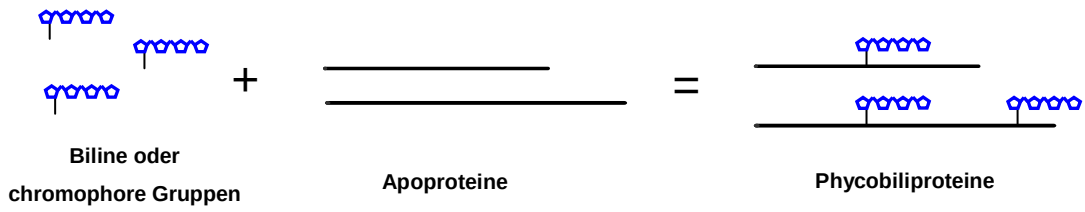

Abb. 1-6: Allgemeine Darstellung des Aufbaus von Phycobiliproteinen. Durch die posttranslationale Ligation eines Bilins an das Apoprotein kommt es zur Entstehung der chromophorylierten Phycobiliproteine.

Biline sind lineare Tetrapyrolle, welche in einem komplexen Prozess aus Protohäm entstehen (Frankenberg und Lagarias 2003, Dammeyer und Frankenberg-Dinkel 2008). Sie werden posttranslational über stabile Thioetherbindungen kovalent an das Apoprotein gebunden (Crespi und Smith 1970, Beuhler et al. 1976, Lagarias et al. 1979, Schoenleber et al. 1984). Die Bindung kommt dabei stets an konservierten Cysteinen des Apoproteins zustande (Köst-Reyes et al. 1975, Muckle et al. 1978). Zusätzlich zu der kovalenten Bindung gibt es weitere exzessive, nicht-kovalente Interaktionen zwischen Apoprotein und Bilin, welche für die Funktionalität der Phycobiliproteine essentiell sind (Scheer und Zhao 2008). Die verschiedenen Phycobiliproteine tragen unterschiedliche Mengen und Arten von Bilinen. Die Anzahl steigert sich von Allophycocyanin über Phycocyanin, Phycoerythrocyanin bis hin zu Phycoerythrin und den Phycobiliproteinen der Cryptophyten (Abb. 1-7).

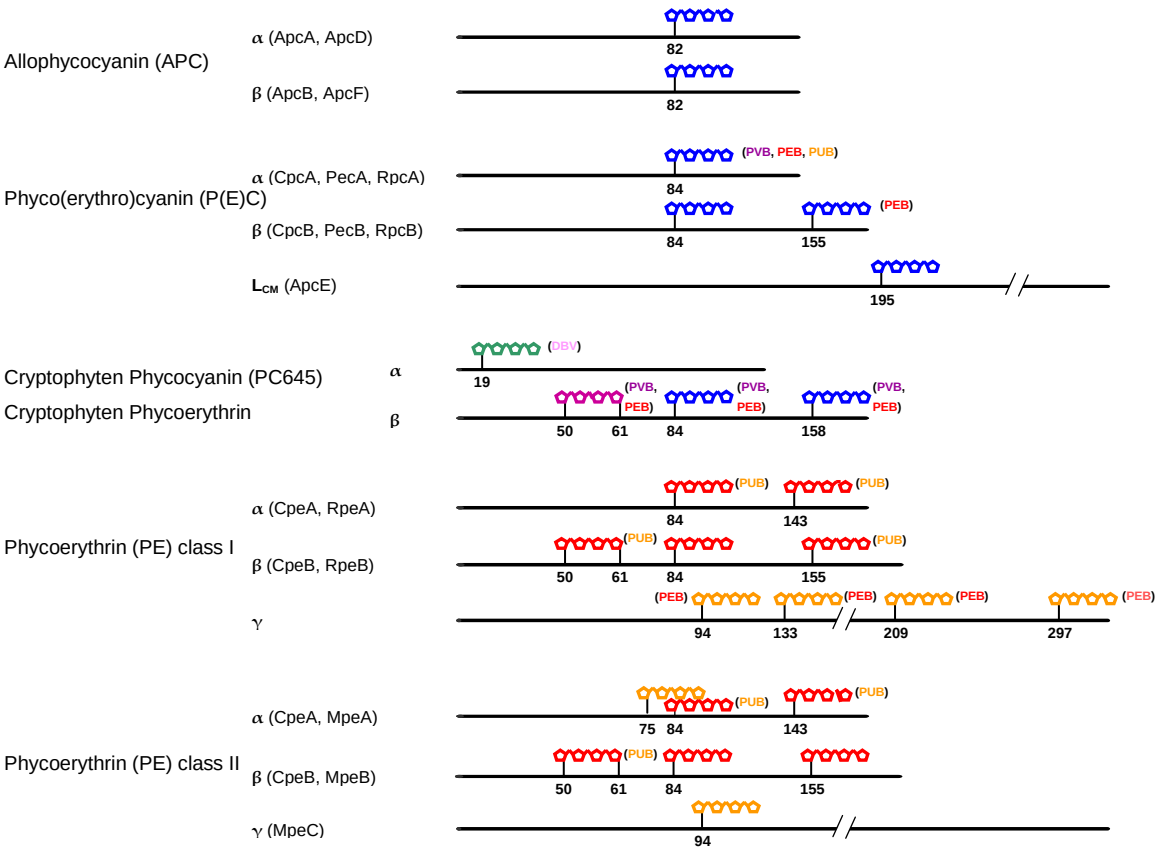

Abb. 1-7: Darstellung bekannter Phycobiliproteine mit möglichen Bilinen nach Scheer und Zhao 2008. Bilin bindende Cysteine sind entsprechend ihrer Position nummeriert. Die Farbe der nativen Phycobiliproteine ist durch die Farbe des Bilins dargestellt, Alternativen in Klammern: Phycocyanobilin (PCB) blau, Phycoviolobilin (PVB) lila, Phycoerythrobilin (PEB) rot, Phycourobilin (PUB) orange, Dihydrobiliverdin (DBV) rosa, Mesobiliverdin grün.

Das konservierte Cystein an Position 84 ist, mit Ausnahme der α-Untereinheit der Biliproteine aus Cryptophyten, eine konservierte Bindestelle innerhalb der Phycobiliproteine. Weitere Bindestellen entwickelten sich im Bereich der Globindomäne des C-Terminus um die Aminosäure 150 und im Bereich des N-Terminus um Position 50 (Scheer und Zhao 2008). Die meisten Biline sind über eine einzelne Thioetherbrücke an Cysteinreste des Apoproteins gebunden, eine zweifache Bindung findet man bei manchen Phycoerythrinen, wo ein Phycoerythrobilin gleichzeitig an Cystein-50 sowie Cystein-61 der β-Untereinheit gebunden ist (Abb. 1-7) (Ficner und Huber 1993).

1.4.1 Phycoerythrin – ein Pigment der Cryptophyte *Guillardia theta*

Als akzessorische Pigmente zur Sammlung von Lichtenergie besitzt *G. theta* die Chlorophylle a und c_2 sowie das Phycobiliprotein Phycoerythrin (Haxo und Fork 1959, Glazer 1983). Beide Chlorophylle absorbieren in den Wellenlängenbereichen λ_{max} = ~420nm und λ_{max} = ~650nm, Phycoerythrin absorbiert bei λ_{max} = 560-570nm (Haxo und Fork 1959).
Im Unterschied zu Cyanobakterien und Rhodophyten findet man immer nur eine einzelne Art Phycobiliprotein pro Cryptophyten Spezies (Mörschel und Wehrmeyer 1975, Glazer und Wedemayer 1995, Wedemayer et al. 1996). Bekannt sind mittlerweile sieben verschiedene Phycobiliproteine, welche sich zwei verschiedenen Klassen zuordnen lassen (Wedemayer et al. 1996). Erstere beinhaltet drei Phycoerythrin-Varianten (PE545, PE555, PE566), die aufgrund von mindestens einem grün absorbierenden Phycoerythrobilin rötlich erscheinen. Die zweite Klasse besteht aus vier Phycocyanin-Varianten (PC569, PC612, PC630, PC645), welche aufgrund der Präsenz des rot-absorbierenden Phycocyanins als bläulich wahrgenommen werden (O'Heocha und Raftery 1959, Hill und Rowan 1989). Die Ziffern innerhalb der Namen stehen dabei für das jeweilige Absorptionsmaximum, welches durch die Ausstattung der Apoproteine mit unterschiedlichen Bilinen, wie Phycocyanobilin, Phycoerythrobilin, Mesobiliverdin, 15,16-Dihydrobiliverdin, Bilin-584 oder dem Bilin-618 variiert (Glazer und Wedemayer 1995). Während die Art der Biline variiert, bleibt ihre Anzahl innerhalb der α- und β-Untereinheiten gleich. Während die α-Untereinheit sowohl von Phycoerythrin als auch von Phycocyanin stets ein Bilin trägt, besitzt die β-Untereinheit stets drei.

G. theta besitzt das Phycobiliprotein Phycoerythrin mit einem Absorptionsmaximum bei 545nm (Wilk et al. 1999). Die α-Untereinheit ist mit einem 15,16-Dihydrobiliverdin an Position Cystein-19 ausgestattet, wo ein konserviertes DXXXC-Motiv (X: beliebige Aminosäure) identifiziert werden konnte (Gould et al. 2007), während die β-Untereinheit ein zweifach kovalent gebundenes Dihydrobiliverdin an den Positionen Cystein-50,61 sowie zwei Phycoerythrobiline an den Positionen Cystein-82 und Cystein-158 trägt (Glazer und Wedemayer 1995).

1.4.1.1 Kodierung

Im Rahmen von Genomprojekten konnte ein einziges Gen kodierend für die β-Untereinheit auf den Plastidengenomen zweier Cryptophyten identifiziert werden (Douglas und Penny 1999, Khan et al. 2007). Bemerkenswerterweise besitzen β-Untereinheiten keine Thylakoid-Import Sequenz (Reith und Douglas 1990, Douglas und Penny 1999), welche aufgrund der intrathylakoidalen Lokalisation der Phycobiliproteine zu erwarten gewesen wäre. Die α-Untereinheit hingegen wird von einer Genfamilie des Wirtkerns kodiert (Jenkins et al. 1990, Broughton et al. 2006, Gould et al. 2007). Die Gene kodieren für Präproteine, welche mit einer zweiteiligen N-terminalen Extension synthetisiert werden (Jenkins et al. 1990, Gould et al. 2007). Letztere wird als *bipartite topogenic signal sequence* (BTS) bezeichnet und dient als Zielsteuerungssequenz für den Import in die komplexe Plastide (Wastl und Maier 2000, Apt et al. 2002, Kilian und Kroth 2005, Gould et al. 2006b).

1.4.1.2 Lokalisation

Elektronenmikroskopische Studien zeigten eine ungewöhnliche Lokalisation der Phycobiliproteine in Cryptophyten (Dodge 1969, Wehrmeyer 1970). Im Thylakoidlumen konnte elektronendichtes Material identifiziert werden, welches photosynthetische Pigmente innerhalb dieses Kompartiments repräsentieren könnte. Dies konnte durch Immuno-Lokalisationsstudien des Phycoerythrin aus *Rhodomonas lens* bestätigt werden (Ludwig und Gibbs 1989).

1.4.1.3 Organisation

Cryptophyten besitzen im Gegensatz zu Cyanobakterien und Rhodophyten keine eindeutige Organisation ihrer Phycobiliproteine (Ludwig und Gibbs 1989). In der Cryptophyte *Cryptomonas rufescens* wurden jedoch kleine Phycoerythrin-Einheiten in der Nähe der Thylakoidmembran beobachtet, welche aneinander assoziiert zu sein scheinen und kleine Stapel bilden (Lichtle et al. 1987). Allen Phycobiliproteinen aus Cryptophyten ist die Bildung von $\alpha_1\alpha_2\beta\beta$ Heterotetrameren gemeinsam, welche sich durch eine molekulare Masse von ungefähr 50 kDa auszeichnen (Mörschel und Wehrmeyer 1975, Sidler et al. 1985, Guard-Friar und MacColl 1986, MacColl und Guard-Friar 1987, Martin und Hiller 1987, Jenkins et al. 1990). Durch die Auflösung der Kristallstruktur des Phycoerythrin 545 in einem Bereich von 1,63Å konnten die vorherigen biochemischen Analysen untermauert werden (Wilk et al. 1999). Linkerproteine, wie sie klassisch in Phycobilisomen vorkommen und für strukturelle Stabilität sorgen (Glazer 1985), konnten nicht identifiziert werden. Die Frage ob ein Energietransfer zu den Photosystemen stattfindet, konnte durch die Isolation von photosynthetisch aktiven Partikeln, bestehend aus Photosystem II und Phycoerythrin, beantwortet werden (Lichtle et al. 1987). Fluoreszenz-Emissions Spektren zeigten, dass der Transfer von Excitonen Energie zwischen Phycoerythrin und Chlorophyll effizient ist (Lichtle et al. 1980, Lichtle et al. 1987). Die Tatsache, dass kleine Phycoerythrin-Stapel an Photosystem II assoziiert zu sein scheinen, unterstützen diese Analysen.

1.4.1.4 Phylogenetische Entwicklung

Phylogenetische Untersuchungen haben gezeigt, dass β-Untereinheiten der Cryptophyten spezifischen Phycobiliproteine hohe Homologien zu β-Untereinheiten des Phycoerythrin aus Rhodophyten aufweisen (Glazer und Apell 1977, Sidler et al. 1990). Diese Homologie umfasst eine Identität von über 80% in den Aminosäuresequenzen (Sidler et al. 1990, Godovac-Zimmermann et al. 1992). Somit wird angenommen, dass die Apo-β-Untereinheiten aller Phycobiliproteine der Cryptophyten aus den β-Untereinheiten der Rhodophyten entstanden sind (Sidler und Zuber 1988). Die α-Untereinheit ist mit einer molekularen Masse von 9-10 kDa kleiner als die α-Untereinheiten von Phycobiliproteinen

anderer Organismen (Glazer 1983), und besteht aus einem antiparallelem β-Faltblatt, gefolgt von einer α-Helix (Sidler et al. 1990, Broughton et al. 2006). Phylogenetische Studien zeigen keinerlei verwandtschaftliche Verhältnisse mit bekannten Proteinen. Darüber hinaus besitzen Cryptophyten, je nach Art, mindestens zwei verschiedene α-Untereinheiten (Mörschel und Wehrmeyer 1975, Guard-Friar und MacColl 1986, Broughton et al. 2006), welche somit vermutlich eine Cryptophyten-spezifische Proteinfamilie darstellen (Glazer und Wedemayer 1995).

1.4.2 Phycocyanin und Allophycocyanin – Pigmente des Cyanobakteriums *Synechocystis*

Generell finden sich in Cyanobakterien immer mehrere Arten Phycobiliproteine.
Synechocystis nutzt sowohl Phycocyanin als auch Allophycocyanin als lichtabsorbierende Pigmente. Ein weiteres Pigment ist das Chlorophyll a, Chlorophyll b fehlt dem Organismus wie allen anderen Cyanobakterien. Durch die drei Pigmente kann das Cyanobakterium Licht in den Wellenlängenbereichen λ_{max} = ~430nm, λ_{max} = 680-700nm (Chlorophyll a) und in der sogenannten Grünlücke von λ_{max} = 500-650nm (Allophycocyanin, Phycocyanin) effektiv zur Energiegewinnung nutzen.

1.4.2.1 Kodierung

Die Untereinheiten der Phycobiliproteine konnten in *Synechocystis* durch die Genomsequenzierung 1997 identifiziert werden (Kaneko et al. 1996, Kaneko und Tabata 1997). Diese sind in zwei Operonstrukturen, dem Allophycocyanin-Operon (apc-Operon) sowie dem Phycocyanin-Operon (cpc-Operon) organisiert und werden als polycistronische mRNAs transkribiert (DiMagno und Haselkorn 1993, Nakajima et al. 2001, Ughy und Ajlani 2004). Das apc-Operon kodiert beide Allophycocyanin Untereinheiten (ApcA, ApcB) und ein kleines Core Linkerprotein (ApcC) (DiMagno und Haselkorn 1993), das cpc-Operon beide Phycocyanin Untereinheiten (CpcA, CpcB) und drei Rod Linker Proteine (CpcC1, CcpcC2, CpcD) (Nakajima et al. 2001, Ughy und Ajlani 2004). In manchen Cyanobakterien sind innerhalb dieses Operons noch die Gene *cpc*E und *cpc*F organisiert (Zhou et al. 1992, Hess et al. 1999, Kaneko et al. 2001).

1.4.2.2 Lokalisation

Gannt und Conti erkannten als erste die Organisation von Phycobiliproteinen in Phycobilisomen und ihre Lokalisation an Thylakoidmembranen der Rhodophyte *Porphyridium cruentum* (Gantt und Conti 1965, Gantt und Conti 1966a). Heute ist bekannt, dass die Multiproteinkomplexe sowohl in Cyanobakterien als auch in Rhodophyten der cytoplasmatischen Seite der Thylakoidmembranen aufliegen (Grossman et al. 1993). Phycobilisomen sind Lichtsammelkomplexe sowohl für Photosystem I (PS I) wie auch für Photosystem II (PS II). Eine frühere Annahme, dass sie ausschließlich an PS II zu finden sind, konnte widerlegt werden (Mullineaux 1992, Mullineaux 1994). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass Phycobilisomen und Photosysteme keine stabile Interaktion eingehen, sondern vielmehr ein ständiger Positionswechsel der Phycobilisomen auf der Thylakoidmembran erfolgt, während die Photosysteme immobil sind (Sarcina et al. 2001).

1.4.2.3 Organisation

Phycobiliproteine sind in Cyanobakterien wie auch in Rhodophyten in Multiproteinkomplexen organisiert (Edwards und Gantt 1971, Wildman und Bowen 1974), welche man aufgrund ihrer molekularen Masse von ca. 5-20 x 10^6 Da auch als *giants* (engl. Riese) bezeichnet (Adir 2005). Die Bezeichnung der Komplexe als sogenannte Phycobilisomen wurde von 1965 Gantt und Conti geprägt (Gantt und Conti 1965, Gantt und Conti 1966a, Gantt und Conti 1966b). Die Komplexe konnten auch in den Cyanellen von Glaucophyten entdeckt werden (Lefort 1965). Man unterscheidet bei den, im Durchmesser 30-40nm großen Komplexen, zwei verschiedene Erscheinungsformen, dem hemi-discoidalen und hemi-ellipsoidalen Typ (Gantt und Conti 1966b). Ausnahmen scheinen das Cyanobakterium *Synechocystis* sp. strain BO8402 sowie der Genus *Prochlorococcus* zu sein, deren Phycobiliproteine nicht in Phycobilisomen organisiert sind (Reuter et al. 1994, Hess et al. 2001).

In *Synechocystis* findet sich der weit verbreitete trizylindrische, hemidiscoidale Aufbau (Abb. 1-8). Das Innere des Phycobilisoms wird von drei Allophycocyanin Zylindern gebildet, welche als Core bezeichnet werden und an welche so genannte Rod-Strukturen assoziiert sind (MacColl 1998). Im Falle von *Synechocystis* sind dies sechs, ausschließlich aus

Phycocyanin bestehende Rods (Abb. 1-8). Die Länge und die Zusammensetzung der Rod-Strukturen variieren innerhalb der Cyanobakterien und hängen von der Phycobiliprotein Ausstattung der Organismen sowie den Lichtbedingungen ab (MacColl 1998). Rod-Strukturen setzen sich aus oligomerisierten Hexameren (Heterododecameren) zusammen, welche aus ringförmigen Trimeren (Heterohexameren) bestehen (Abb. 1-8) (Scheer 1982, Sidler 1994, Adir 2005). Letztere werden aus den kleinsten Bausteinen gebildet, den zueinander homologen α- und β-Untereinheiten. Diese zeichnen sich durch eine Globin-ähnliche, Bilin-tragende Region und einen N-terminalen Bereich aus, der hauptsächlich in die Oligomerisation involviert ist (Scheer und Zhao 2008). Für Stabilität und Vernetzung innerhalb der einzelnen Strukturen sowie für Vernetzung an die Membran sorgen Linkerproteine (de Marsac und Cohen-Bazire 1977), welche im Unterschied zu den Phycobiliproteinen basische Eigenschaften besitzen (Lundell et al. 1981).

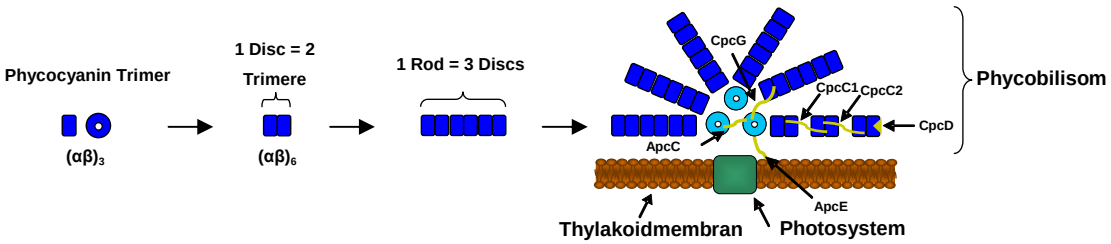

Abb. 1-8: Darstellung der Organisation Phycobiliproteine des Cyanobakteriums *Synechocystis*. Aufbau der einzelnen Rod-Strukturen sowie eines gesamten Phycobilisoms, bestehend aus drei Core-Zylindern (hellblau), sechs Rod-Strukturen (dunkelblau) sowie verschiedener Linkerproteine (gelb).

Linkerproteine optimieren zudem die Absorptionseigenschaften und Energieweiterleitung innerhalb der Phycobilisomen. Die meisten Linkerproteine sind farblos, Ausnahmen bilden hierbei die γ-Untereinheiten der Phycoerythrine aus Rhodophyten, welche als Linkerproteine fungieren (Wilbanks und Glazer 1993, Scheer und Zhao 2008), zwei Phycoerythrin assoziierte Linkerproteine des Cyanobakteriums *Synechococcus* sp. WH8102 (Six et al. 2005) sowie der Core-Membran Linker L_{CM} (ApcE) (Zhao et al. 2005b). Letzterem kommen noch eine Funktion als terminaler Emitter sowie wahrscheinlich die Verankerung des Phycobilisoms an der Thylakoidmembran zu (Wanner und Köst 1980).

1.5 Bilin Lyasen – essentielle Proteine zur optimalen Funktion von Phycobiliproteinen

Die posttranslationale Ligation von Bilinen an das Apoprotein wird durch sogenannte Bilin Lyasen bewerkstelligt (Scheer und Zhao 2008). Auch sind wenige Fälle bekannt, in denen Biline autokatalytisch an das Apoprotein gebunden werden (Zhao et al. 2005b, Hu et al. 2006). Die Ligation ist Hauptbestandteil einer Serie posttranslationaler Modifikationen der Phycobiliproteine. Diese Modifikationen schließen eine Methylierung eines konservierten Asparagins in den β-Untereinheiten und einigen Allophycocyanin α-Untereinheiten (Klotz et al. 1986, Klotz und Glazer 1987, Wilbanks et al. 1989, Swanson und Glazer 1990) durch eine Asparagin-Methyltransferase (Miller et al. 2008) sowie das Entfernen des N-terminalen Methionins (Sidler 1994, Shen et al. 2008) ein. Im Gegensatz zu Chlorophyllen sind freie Biline als Photorezeptoren ungeeignet, da sie Licht nur spärlich absorbieren und der gehobene Energiezustand sehr kurzlebig ist. Die kovalente Bindung an das jeweilige Apoprotein scheint für eine optimale Funktion von Phycobiliproteinen essentiell, da sowohl die labilen chromophoren Gruppen (Scheer 1982), als auch die Apoproteine stabilisiert werden (Anderson und Toole 1998, Shen et al. 2008).

1.5.1 Cyanobakterielle Bilin Lyasen des E/F – Typs

Als erste Bilin Lyase überhaupt wurde 1992 ein Heterodimer bestehend aus den Proteinen CpcE und CpcF aus *Synechococcus* sp. PCC7002 identifiziert (Zhou et al. 1992, Fairchild und Glazer 1994b). Das Heterodimer wird für die Ligation des Bilins Phycocyanobilin an die α-Untereinheit von Phycocyanin an Position Cystein-84 benötigt und katalysiert sowohl die Ligationsreaktion als auch die reverse Reaktion, das Entfernen des Bilins (Fairchild et al. 1992). Die Lyase des E/F-Typs wurde lange Zeit als generelle Modellstruktur für weitere Lyasen anderer Bindestellen angesehen, allerdings hat sich gezeigt, dass die Anzahl der homologen Gene in verschiedenen Cyanobakterien zu gering ist, um alle Bindestellen für Biline bedienen zu können (Schluchter und Glazer 1999). In einigen Cyanobakterien sind die Gene, kodierend für CpcE und CpcF oder deren Homologe innerhalb des cpc-Operons lokalisiert (Zhou et al. 1992, Hess et al. 1999, Kaneko et al. 2001), in apc-Operons oder

Phycoerythrin-Operons (cpe-Operon) konnten beide allerdings nicht identifiziert werden (Kahn et al. 1997).

Die Phycoerythrocyanin-Operone (pec-Operon) von *Nostoc* sp. PCC7120 und *Mastigocladus laminosus* enthalten zwei homologe Gene, die allerdings eine veränderte Variante der Lyase kodieren (Zhao et al. 2002). Es konnte gezeigt werden, dass die PecE/F Lyase dieser Organismen nicht nur die Bindung des Phycoerythrocyanins an Cystein-84 der Phycoerythrin α-Untereinheit, sondern auch die Isomerisierung zu Phycoviolobilin katalysiert (Zhao et al. 2002). Dies könnte erklären, weshalb freies Phycoviolobilin bisher nicht in Cyanobakterien nachgewiesen werden konnte. Weiterhin wird PecE eine Chaperon-artige Funktion zugeschrieben (Böhm et al. 2007).

1.5.2 Cyanobakterielle Bilin Lyasen des S/U – Typs

Die S/U-Typ Lyasen stellen eine Familie von Proteinen dar, die nicht mit den E/F-Typ Lyasen verwandt sind und weite umfangreiche und charakteristische Variationen aufweisen. Das Hauptmerkmal dieser Lyasen ist eine hohe Spezifität für Bindestellen, aber eine geringe Spezifität für die jeweilige chromophore Gruppe und das Apoprotein (Zhao et al. 2006b, Zhao et al. 2007b). So agiert das Protein CpeS aus *Nostoc* sp. PCC7120 als monomere Lyase und katalysiert die Bindung sowohl von Phycocyanobilin als auch Phycoerythrobilin an Position Cystein-84 der β-Untereinheiten von Phycocyanin und Phycoerythrocyanin (Zhao et al. 2006b). Weiterhin wurde dieses Protein als nahezu universelle Lyase für die Position Cystein-84 diverser β-Untereinheiten beschrieben (Zhao et al. 2007b).

Ein Heterodimer, bestehend aus den Proteinen CpcS und CpcU, ist hingegen in *Synechococcus* sp. PCC7002 für die Ligation der Biline an die Positionen Cystein-84 bzw. Cystein-82 der β-Untereinheit des Phycocyanins und beider Allophycocyanin Untereinheit verantwortlich (Saunee et al. 2008, Shen et al. 2008). Auch konnte kürzlich eine direkte Interaktion zwischen Lyase und Bilin nachgewiesen werden (Tu et al. 2008).

1.5.3 Cyanobakterielle Bilin Lyasen des T – Typs

Ein neuer Typ von Lyase konnte 2006 erstmals beschrieben werden (Shen et al. 2006). Durch die Charakterisierung einer Insertionsmutante in *Synechococcus* sp. PCC7002 und parallel durchgeführten *in vitro* Additionsassays konnte das Protein CpcT als erste Lyase für die Position Cystein-155 der Phycocyanin β-Untereinheit identifiziert werden. Dieser Typ von Lyase ist regioselektiv, zeigt jedoch weniger Spezifität in Bezug auf das Bilin und das Apoprotein (Zhao et al. 2007a). Zeitlich nacheinander folgende Additionsassays zeigten, dass ein bereits vorhandenes Bilin an Position Cystein-84 der β-Untereinheit die Lyase-Funktion des CpcT Proteins inhibiert (Zhao et al. 2007a).

2. AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

Als Nukleomorph werden rudimentäre Zellkerne sekundärer Endosymbionten von Cryptophyten und Chlorarachniophyten bezeichnet. Sie sind die kleinsten heute bekannten eukaryoten Genome und unterlagen im Verlauf der Evolution einer drastischen Reduktion und Kompaktierung. Nukleomorph-kodierte, plastidäre Gene sind eine mögliche Erklärung für die andauernde Existenz dieses Genoms. Die zellulären Aufgaben Nukleomorph-kodierter, plastidärer Proteine sind daher von großem Interesse, allerdings sind die Funktionen heute nur zum Teil bekannt.

Die funktionelle Charakterisierung des Nukleomorph-kodierten Proteins Orf222 der Cryptophyte *Guillardia theta* und dessen phylogenetische Einordnung innerhalb identifizierter Homologer stellt den Aspekt der vorliegenden Arbeit dar.

Homologen Proteinen aus Cyanobakterien konnten bereits Aktivitäten als Bilin Lyasen nachgewiesen werden. Die Pigmentkomposition in Cryptophyten als auch deren Organisation und Lokalisation unterscheidet sich generell im Vergleich zu Cyanobakterien und machen eine funktionelle Charakterisierung des Proteins Orf222 notwendig.

Aufgabe war es, durch die sinnvolle Generierung einer cyanobakteriellen Mutante zu analysieren, ob das cryptophytische Protein Orf222 funktionelle Aktivitäten einer Lyase bewerkstelligen kann. Dazu sollte zunächst der Phänotyp dieser generierten Mutanten nach diversen Kontrollexperimenten untersucht werden. Anschließend war die Mutante mittels vielfältiger Methoden vergleichend zu einem Wildtyp Stamm und einer Insertionsmutante zu analysieren. Dabei sollte der Fokus auf einen Vergleich der akzessorischen Pigmente aus den drei verschiedenen cyanobakteriellen Stämme gerichtet werden.

3. ERGEBNISSE

3.1 Das Nukleomorph-kodierte Protein Orf222 der Cryptophyte *Guillardia theta*

Im Rahmen der vollständigen Sequenzierung des Nukleomorph Genoms der Cryptophyte *G. theta* und dessen Analyse konnten 30 putativ plastidäre Proteine identifiziert werden (Douglas et al. 2001). Aufgrund von Sequenzhomologien konnte bereits im Jahre 2001 einem Großteil dieser putativen Plastidenproteine eine Funktion zugeordnet werden. Unbekannt hingegen sind die Funktionen einiger der putativen Plastidenproteine sowie deren cyanobakteriellen Homologen. Da deren Existenz als ein Grund für eine bis heute andauernde Aufrechterhaltung des Nukleomorphs angenommen wird, ist die Charakterisierung dieser putativen plastidären Proteine von allerhöchstem Interesse, da sie wichtige Funktionen innerhalb der Plastide übernehmen könnten.

Eines der bisher unbekannten putativ plastidär lokalisierten Proteine ist der auf dem Chromosom 1 des Nukleomorph-kodierte Orf222. Der AT-Gehalt des Gens *orf*222 von 73,7% spiegelt den hohen AT-Gehalt des Nukleomorphs wider. Das Protein wurde mittels verschiedener Vorhersageprogramme als lösliches Protein vorhergesagt. In der Aminosäuresequenz des Orf222 konnte das klassische FXN-Motiv an Position 4-6 identifiziert werden (X: beliebige Aminosäure), welches als konserviertes Motiv für Nukleomorph-kodierte, putativ plastidär lokalisierte Proteine gilt (Cavalier-Smith 2003). Homologe können durch ein *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST) fast ausschließlich in photosynthetisch aktiven Organismen identifiziert werden. Deren Vorkommen ist in nahezu allen Fällen an die Existenz von Phycobiliproteinen in den jeweiligen Organismen gekoppelt (Bolte et al. 2008). Ausnahmen stellen die homologen Proteine aus Landpflanzen, sowie das Homolog des photosynthetisch inaktiven Cyanophagen S-PM2 dar.

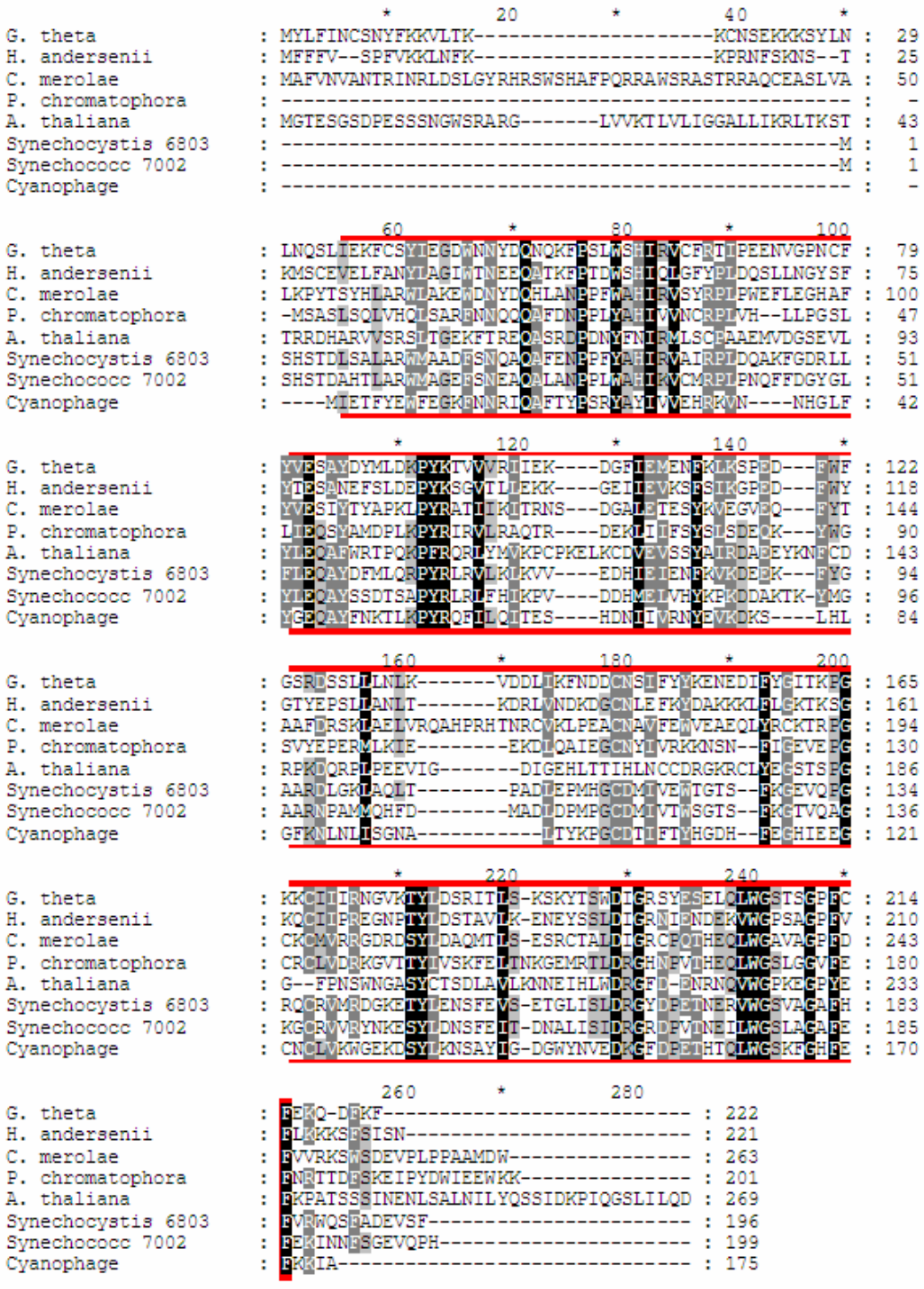

Abb. 3-1: Alignment der Aminosäuresequenzen des Orf222 und einiger ausgewählter Homologer wie cpeT-like Protein der Cryptophyte *Hemiselmis andersenii* (H. andersenii), CMK263C der Rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae* (C. merolae), hypothetisches Protein PCC_0629 der Thecamöbe *Paulinella chromatophora* (P. chromatophora), At5g51020 der Landpflanze *Arabidopsis thaliana* (A. thaliana), Slr1649 des Cyanobakteriums *Synechocystis* sp. PCC 6803 (Synechocystis 6803), CpcT des Cyanobakteriums *Synechococcus* sp. PCC7002 (Synechococc 7002), S-PM2p215 des Cyanophagen *Synechococcus* Phage S-PM2 (Cyanophage).
In rot hinterlegt ist die konservierte *domain of unknown function* 1001 (DUF1001).

Das in Abbildung 3-1 dargestellte Alignment von Aminosäuresequenzen wurde mit einigen exemplarischen Vertretern Orf222 homologer Proteine erstellt. Dazu zählen die homologen Proteine der Cryptophyte *Hemiselmis andersenii*, der Rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae*, der Thecamöbe *Paulinella chromatophora* als auch die homologen Proteine der Landpflanze *Arabidopsis thaliana*, der Cyanobakterien *Synechococcus* sp. PCC7002 und *Synechocystis* sp. PCC6803 sowie das Homolog des Cyanophagen *Synechococcus* Phage S-PM2.

Allen Proteinen ist eine konservierte Domäne, eine *domain of unknown function* (DUF1001) gemeinsam, welche sich über einen großen Teil der Proteine erstreckt (Abb. 3-1). Weiterhin fallen mehrere stark konservierte Motive von wenigen Aminosäuren Länge in Bereichen der N- und C-Termini der Proteine auf. Ebenfalls weisen eukaryote homologe Vertreter eine N-terminale Extension im Vergleich mit den beiden cyanobakteriellen Homologen auf. Eine Ausnahme hierbei stellt das Homolog aus *Paulinella chromatophora* dar. Dieses ist auf dem zirkulären Genom der sogenannten Chromophoren der eukaryoten Thecamöbe kodiert (Nowack et al. 2008) und besitzt wie die cyanobakteriellen Homologen keine N-terminale Extension im Vergleich zu eukaryoten Homologen.

3.2 Generierung einer Δ*slr*1649_Komp222 Mutante in *Synechocystis* sp. PCC6803

Um eine putative Lyase-Funktion des Proteins Orf222 nachzuweisen, wurde mittels eines revers-genetischen Ansatzes eine Komplementations-Mutante in dem Cyanobakterium *Synechocystis* generiert. Die natürliche Kompetenz der cyanobakteriellen Zellen befähigt diese zur Aufnahme von Fremd-DNA aus dem umgebenden Medium sowie der Integration ins Genom durch homologe Rekombination.

Zur Erstellung des zur Transformation verwendeten genetischen Konstrukts wurde aus genomischer DNA der Cryptophyte *G. theta* das Gen *orf*222 amplifiziert. Dabei wurde die vorhergesagte N-terminale Extension des Proteins nicht berücksichtigt, da deren Existenz in einem prokaryoten Organismus für einen plastidären Import nicht notwendig ist und eine vollständige Funktion des Proteins Orf222 unterbinden könnte. Daher wurde der

Nukleotidbereich korrespondierend zu den Aminosäuren Asparagin an Position 29 bis Phenylalanin an Position 222 amplifiziert und mittels eingebrachter Schnittstellen für spezifische Restriktionsendonukleasen an eine, der späteren Selektion positiver Klone dienende Resistenzkassette fusioniert (Abb. 3-2). Letztere kodiert das Gen für eine, gegen das Antibiotikum Spektinomycin Resistenz vermittelnde Adenyltransferase.

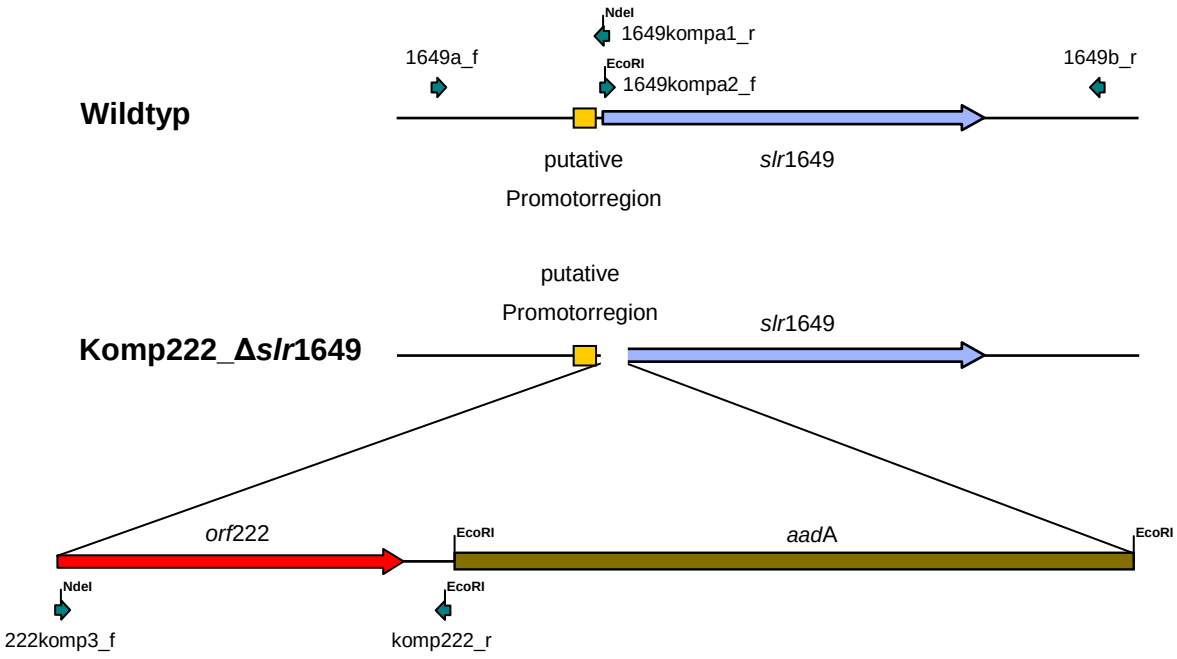

Abb. 3-2: Schematische Darstellung des Konstruktes zur Komplementation des Gens *slr*1649 aus *Synechocystis* mit Nukleomorph-kodiertem *orf*222 aus *Guillardia theta*. Die obere Darstellung entspricht der Wildtyp Situation mit dargestellten Oligonukleotiden zur Amplifikation der beiden flankierenden homologen Bereiche. Die untere Darstellung entspricht der Situation des generierten Komp222_Δ*slr*1649 Stammes, in welchem das Gen *orf*222 ohne N-terminale Extension unter Einfluss der Promotorregion des Gens *slr*1649 stehen soll. Zur Selektion diente eine darauf folgende Spektinomycin-Resistenzkassette, kodierend für eine Resistenz vermittelnde Adenyltransferase (*aad*A).

Die Integration des Konstruktes erfolgte durch homologe flankierende Bereiche, welche aus cyanobakterieller DNA mittels der Oligonukleotide 1649a_f, 1649kompa1_r und 1649kompa2_f, 1649b_r amplifiziert wurden. (Abb. 3-2). Durch eingefügte Schnittstellen wurden die flankierenden Bereiche beidseitig an das Konstrukt bestehend aus dem verkürzten cryptophytischen Gen *orf*222 und der Resistenzkassette fusioniert. Als putative Promotorregion wurde der 5'- Bereich des offenen Leserahmens *slr*1649 angenommen, so dass die Integration des Konstruktes unmittelbar in den 3'- gelegenen Bereich dieser

putativen Promotorregion erfolgte. Das Gen *slr*1649 wurde dahingehend beeinflusst, dass die ersten sieben Nukleotide und damit das natürliche Startkodon verändert wurden. Letzteres sollte dadurch nicht mehr der Translationsinitiation dienen. Die Generierung des Komplementationsstammes erfolgte durch Frau Julia Prechtl. Nach Transformation von *Synechocystis* Wildtyp-Zellen erfolgte die initiale Selektion auf BG11 Platten. Anschließend wurden putativ positive Klone unter gradueller Steigerung der Antibiotika-Konzentration unter Standardbedingungen (siehe Kapitel 7.2) kultiviert.

3.2.1 Kontrollexperimente

Zur Überprüfung ob generierte Mutanten eine homogenomische Segregation des eingebrachten Konstruktes aufwiesen, was einer Integration des genetischen Konstruktes in alle acht bis zwölf Genomkopien entsprechen würde, wurden ab einer Spektinomycin Konzentration von 20µg/ml diverse Kontrollexperimente durchgeführt.

Standardmäßig wird bei der Generierung von Insertionsmutanten auf die Methode des Southern Blot zurückgegriffen, wo die Insertion einer Resistenzkassette durch eine komplementäre Sonde anhand verschiedener Restriktionsmuster nachgewiesen wird. Es erschien jedoch im Fall der generierten komplementierten Mutanten sinnvoller, eine direkte Kontrolle der Expression der endogenen Bilin Lyase aus *Synechocystis* durchzuführen, da der Leserahmen des Gens *slr*1649 durch die Insertion einer Resistenzkassette nicht unterbrochen wurde, sondern dessen ersten sieben Nukleotide verändert wurden.

Daher wurde nach Herstellung von Proteinextrakten (siehe Kapitel 7.6.1) die Expression des Proteins Slr1649 mittels Western Blot Analysen untersucht. Eine Expression konnte nur in parallel hergestellten Extrakten einer Wildtyp Kultur festgestellt werden (Abb. 3-3A). Dort konnte das Protein Slr1649 mittels spezifischer Antikörper in erwarteter Größe detektiert werden. Dieses Signal fehlt in Proteinextrakten einer Δ*slr*1649 Kultur, wo der offene Leserahmen des Gens durch die Insertion einer Kanamycin Resistenzkassette unterbrochen wurde (Kawach 2006). Entscheidend war das Fehlen des Signals in den Extrakten hergestellt aus generierten Komp222_Δ*slr*1649 Kulturen.

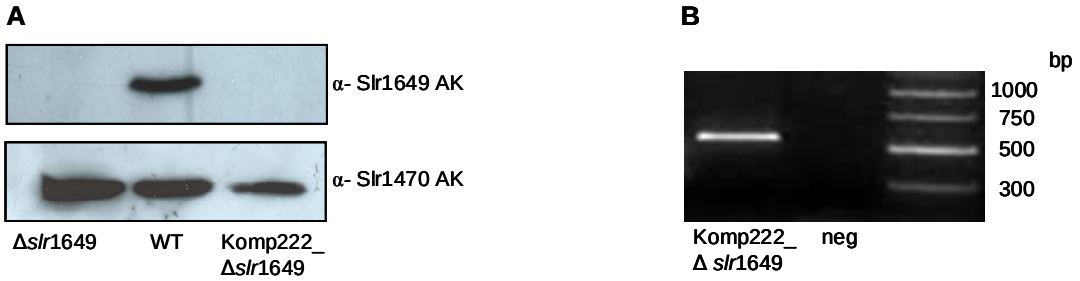

Abb. 3-3: Kontrolle der generierten Komp222_Δ*slr*1649 Zellen.
A, Western Blot Analyse mit spezifischen α-Slr1649 (oben) und spezifischen α-Slr1470 Antikörpern. Ein Signal der α-Slr1649 Antikörper ist nur in der Wildtyp-Fraktion in erwarteter Höhe zu detektieren.
B, RT-PCR mit *orf*222 spezifischen Primern.
AK, Antikörper

Zur Kontrolle der Funktionalität aller drei Extrakte wurde der Nachweis des Proteins Slr1470 mittels spezifischer Antikörper durchgeführt (Abb. 3-3A).

Aufgrund des Fehlens Orf222 spezifischer Antikörper wurden mit isolierter RNA aus einer Komp222_Δ*slr*1649 Kultur Transkriptionsanalysen mit für das cryptophytische Gen *orf*222 spezifischen Primern durchgeführt. Nach reverser Transkription der RNA in *complementary* DNA-Stränge (cDNA), anschließender PCR und Sequenzierung konnte gezeigt werden, dass das integrierte cryptophytische Gen *orf*222 transkribiert wird (Abb. 3-3B).

3.3 Charakterisierung der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante

3.3.1 Phänotypisches Erscheinungsbild

Zu Beginn der Charakterisierung der Komplementations-Mutante konnte bereits aufgrund des phänotypischen Erscheinungsbildes festgestellt werden, dass die generierte Mutante Komp222_Δ*slr*1649 farblich ähnlich zu Wildtyp Kulturen gleicher Zellzahl war (Abb. 3-4A). Ein deutlicher farbiger Unterschied war in Bezug auf eine Kultur der Insertionsmutante Δ*slr*1649 zu erkennen. Letztere wurde bereits als gelb-grün im Vergleich zu der bekannten blau-grünen Farbe der Wildtyp Kulturen beschrieben (Kawach 2006, Bolte et al. 2008).

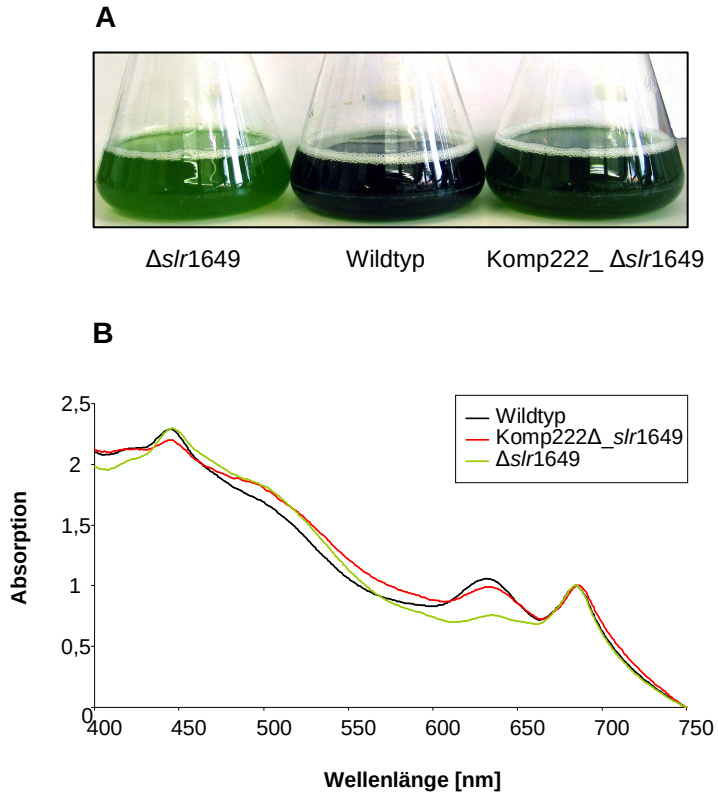

Abb. 3-4: Phänotypische Charakterisierung der generierten Komp222_Δ*slr*1649 Kultur.
A, Farblicher Vergleich von Δ*slr*1649, Wildtyp sowie Komp222_Δ*slr*1649 Flüssigkulturen. Während Δ*slr*1649 Kulturen eine charakteristisch gelb-grüne Farbe aufweisen, ähneln Komp222_Δ*slr*1649 Kulturen farblich dem typischen grün-blau der Wildtyp Kulturen.
B, Absorptionsspektren intakter Zellen von Wildtyp (schwarz), Δ*slr*1649 (grün) und Komp222_Δ*slr*1649 (rot) Kulturen. Eine Reduktion der Absorption der Phycobiliproteine im Bereich von 620nm wie bei einer Δ*slr*1649 Kultur, konnte bei der Komp222_Δ*slr*1649 nicht beobachtet werden.

Absorptionsspektren intakter Zellen zeigten eine ähnliche, leicht geringere Absorption im Bereich von 620nm der Komp222_Δ*slr*1649 Kulturen im Vergleich zu Wildtyp Kulturen, was der Absorption der beiden Biliproteine Phycocyanin und Allophycocyanin entspricht (Abb. 3-4B). Die Δ*slr*1649 Kulturen wiesen im Gegensatz dazu eine deutlich reduzierte Absorption im Bereich von 620nm auf. Alle Spektren wurden bei 680nm normalisiert. Die Absorption des Chlorophyll a in den Bereichen von ~430nm und ~680nm war in allen drei untersuchten Kulturen nahezu identisch und zeigte keine weiteren Auffälligkeiten.

Durchgeführte Pigmentanalysen konnten die aus den Absorptionsspektren erhaltenen Daten bestätigen. Dazu wurden parallel sowohl Chlorophyll a, als auch das Phycobiliprotein Phycocyanin mittels unterschiedlicher Methoden nach Kapitel 7.6.12. extrahiert. Dabei konnte gezeigt werden, dass bei nahezu gleichem Chlorophyllgehalt aller drei Kulturen, der Gehalt des Phycocyanins der Komp222_Δ*slr*1649 Zellen ähnlich dem der Wildtyp Zellen ist und nicht wie in Δ*slr*1649 Zellen um ca. 60% reduziert ist (Abb. 3-5A,B).

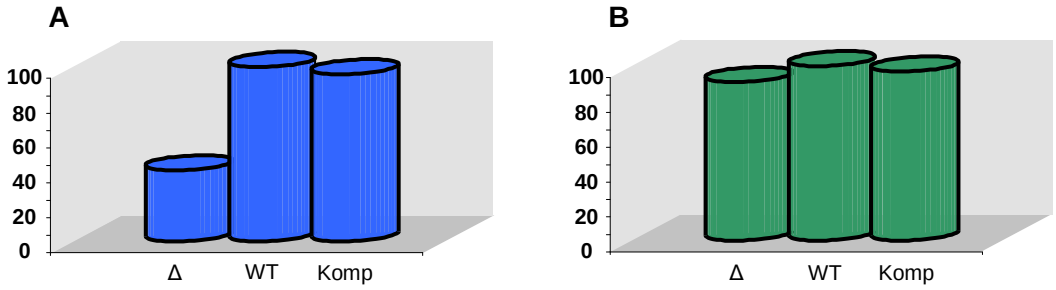

Abb. 3-5: Vergleichende Analysen des Pigmentgehaltes.
A, Vergleich des Phycocyanin Gehaltes. **B**, Vergleich des Chlorophyll a Gehaltes zwischen Δ*slr*1649 (Δ), Wildtyp (WT), und Komp222_Δ*slr*1649 (Komp) Zellen.

3.3.2 Untersuchungen der Phycobilisomen der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante

3.3.2.1 Isolation intakter Phycobilisomen

Aufgrund der bisher erhaltenen Daten zur Analyse der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante wurden intakte Phycobilisomen mittels Saccharose-Dichtegradienten isoliert.

Zum direkten Vergleich wurden parallel intakte Phycobilisomen einer Wildtyp Kultur sowie einer Δ*slr*1649 Kultur isoliert.

Nach Isolation der Proteinkomplexe über einen 10%-40% Saccharose-Gradienten zeigte sich, dass isolierte Phycobilisomen der Komp222_Δ*slr*1649 Zellen ein Migrationsverhalten ähnlich dem des Wildtyps aufwiesen. Die Einwanderungsweite in den Gradienten unterschied sich nur geringfügig von den Phycobilisomen des Wildtypen (Abb. 3-6A). Weiterhin konnte beobachtet werden, dass es zu einer Anreicherung einer zweiten Bande innerhalb des Gradienten kam, die in ihrer Intensität jedoch erheblich schwächer war. Eine

Ansammlung von Phycobiliproteinen, dem Gradienten aufgelagert, konnte nicht beobachtet werden. Intakte isolierte Phycobilisomen von Insertionsmutanten *orf*222 homologer Gene in Cyanobakterien wiesen eine veränderte Migrationsweite im Vergleich zu parallel isolierten Phycobilisomen des Wildtyps auf (Abb. 3-6A) (Shen et al. 2006, Bolte et al. 2008). Weiterhin konnten dem Gradienten aufliegende, nicht einmigrierte Phycobiliproteine beobachtet werden.

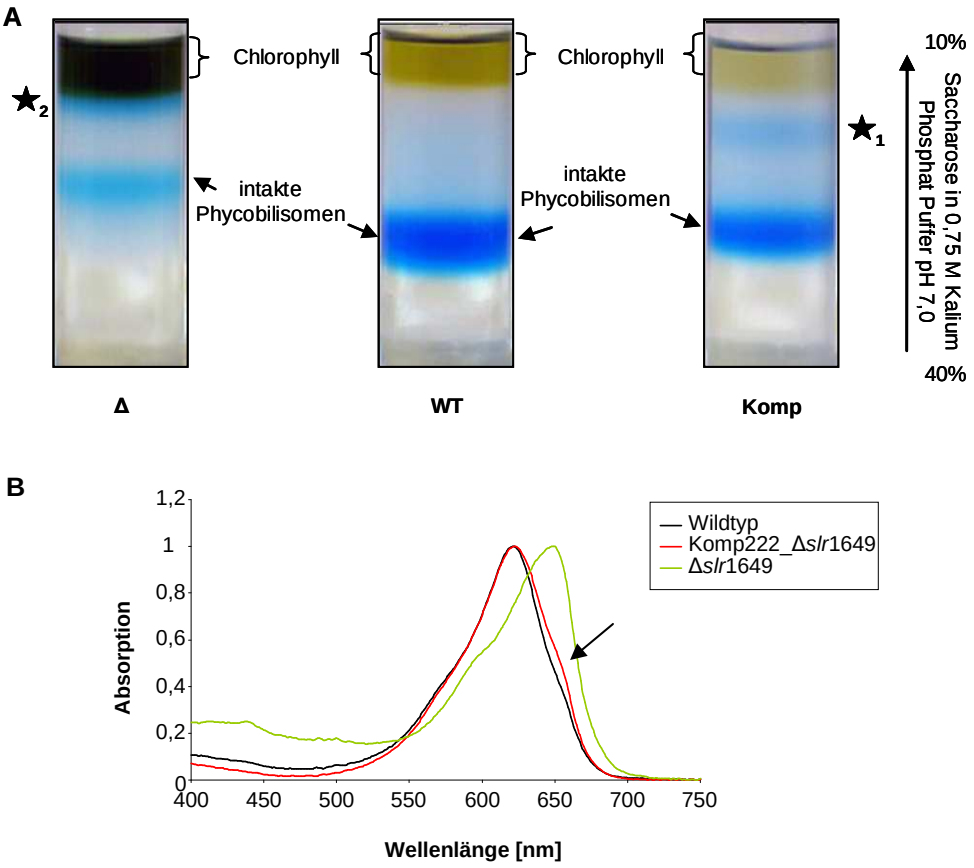

Abb. 3-6: Untersuchungen intakter Phycobilisomen.
A, Isolation intakter Phycobilisomen aus Δ*slr*1649 (Δ), Wildtyp (WT) und Komp222_Δ*slr*1649 (Komp) Kulturen mittels Saccharose-Dichtegradienten Zentrifugation. Eine veränderte Migrationsweite im Vergleich zu Wildtyp Phycobilisomen der Komp222_Δ*slr*1649 Phycobilisomen konnte im Gegensatz zu Δ*slr*1649 Phycobilisomen nicht beobachtet werden. Mit Sternen gekennzeichnet sind (1) die zusätzlich auftretende Bande innerhalb des Gradienten der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante, sowie (2) die dem Gradienten aufliegenden Phycobiliproteine der Δ*slr*1649 Mutante.
B, Absorptionsspektren isolierter, intakter Phycobilisomen. Im Gegensatz zu dem Absorptionsmaximum bei 649nm der Δ*slr*1649 Phycobilisomen (grün) zeigten sowohl Wildtyp als auch Komp222_Δ*slr*1649 Phycobilisomen ein Absorptionsmaximum bei 621nm. Die mit einem Pfeil markierte Schulter entspricht dem Absorptionsmaximum von Allophycocyanin. Die Spektren wurden auf ihre jeweiligen Maxima normalisiert.

Die isolierten, intakten Phycobilisomen wurden auf ihre spektroskopischen Eigenschaften untersucht. Dabei zeigte sich, dass das Absorptionsmaximum der Phycobilisomen der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante bei 621nm dem Maximum der Wildtyp Phycobilisomen identisch war (Abb. 3-6B). Phycobilisomen der Δ*slr*1649 Mutante zeigten dagegen eine Verschiebung des Absorptionsmaximums in den rötlichen Wellenlängenbereich und wiesen ein Maximum bei 649nm auf.

Die einzelnen Spektren wurden auf ihre jeweiligen Absorptionsmaxima normalisiert. Aufgrund des reduzierten Phycocyanin-Gehalts entspricht das Maximum der Δ*slr*1649 Phycobilisomen dem des Allophycocyanins bei 650nm. Durch die Normalisierung wird die Absorption des Phycocyanins von der des Allophycocyanins überdeckt.

Die gemessenen Absorptionsmaxima der Phycobilisomen des Wildtyps und der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante entsprechen dem Maximum des Phycobiliproteins Phycocyanin, während die leichte Schulter bei 650nm dem Absorptionsmaximum von Allophycocyanin entspricht. Letzteres wird im Spektrum der Phycobilisomen des Wildtyps und der Komp222_Δ*slr*1649 von dem Maximum des Phycocyanins überlagert, ist aber noch zu erkennen.

3.3.2.2 Negativ-Staining isolierter intakter Phycobilisomen

Zur Darstellung der Ultrastruktur intakter Phycobilisomen wurden die Proteinkomplexe mittels Negativ-staining auf elektronenmikroskopischer Ebene dargestellt. Dazu wurden intakte Phycobilisomen unmittelbar nach Isolation in Glutaraldehyd fixiert, mit Uranylacetat negativ kontrastiert und direkt anschließend elektronenmikroskopisch visualisiert (siehe Kapitel 7.6.11). Die Methodik stellt technisch sehr hohe Ansprüche und ist deshalb mehrfach zu wiederholen.

Tendenziell zeigte sich nach ersten Aufnahmen, dass Phycobilisomen der Komp222_Δ*slr*1649 Kultur in ihrer Größe denen des Wildtyps gleichzusetzen sind. Bedeutend kleiner hingegen erschienen Phycobilisomen des Δ*slr*1649 Stamms (Abb. 3-7A,B). Von gleicher Größe hingegen erschienen die aus Allophycocyanin gebildeten Core-Regionen der Phycobilisomen aller drei Stämme; die Core-Region der Phycobilisomen des

Komp222_Δ*slr*1649 Stamms wird in der hier gewählten Abbildung wahrscheinlich von einer Rod-Struktur verdeckt.

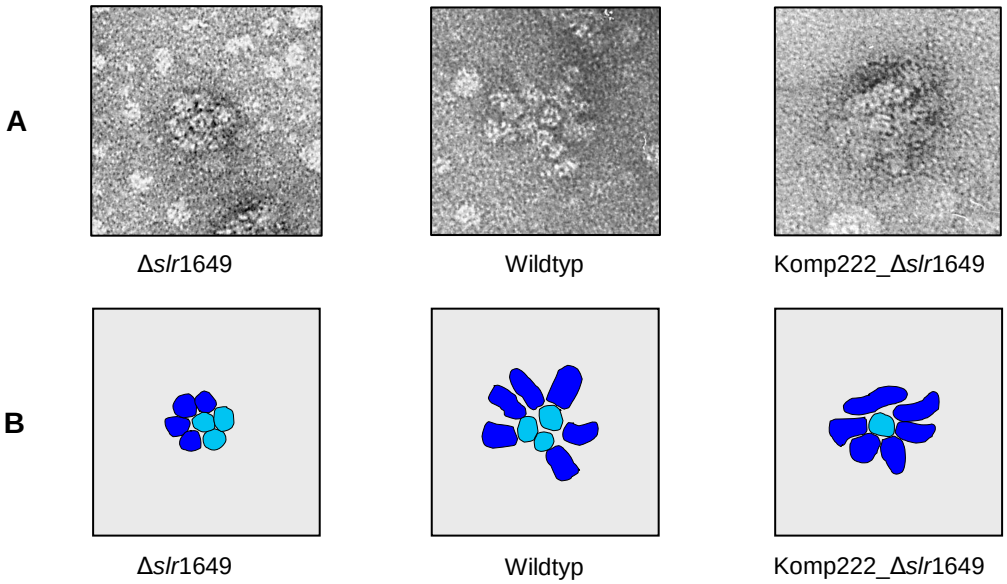

Abb. 3-7: Negativ-Staining isolierter intakter Phycobilisomen.
A, TEM-Aufnahme; Vergrößerung nach Originalaufnahmen 47 000fach, nach manueller, hier dargestellter Nachbearbeitung 273 000fach.
B, schematische Darstellung der in A abgebildeten intakten Phycobilisomen. In hellblau dargestellt sind die aus Allophycocyanin bestehenden Core-Regionen, welche bei dem Beispiel des Komp222_Δ*slr*1649 Phycobilisoms zum Teil verdeckt zu sein scheint. In dunkelblau erkennbar sind die einzelnen Rod-Strukturen, welche sich präparationsbedingt in ihrer Anzahl zwischen den hier dargestellten Phycobilisomen unterscheiden.

3.3.2.3 Untersuchungen einzelner Phycobilisomen Untereinheiten

3.3.2.3.1 Gelelektrophoretische Analysen

Um die einzelnen Untereinheiten der Phycobilisomen (Abb. 1-8) näher untersuchen und vergleichen zu können, wurden diese nach Aufkonzentrierung gelelektrophoretisch aufgetrennt. Um alle Untereinheiten optimal voneinander zu separieren wurde dabei ein 10%-15% Gradient der Acrylamidkonzentration gewählt, da die Untereinheiten in Bezug auf ihre einzelnen Molekulargewichte erhebliche Differenzen zueinander aufweisen. Nach Auftrennung der einzelnen Fraktionen wurden prominente Banden anschließend über Massenspektrometrie identifiziert und konnten den einzelnen Untereinheiten der Phycobilisomen zugeordnet werden.

Dabei zeigte sich, dass die Zusammensetzung der Phycobilisomen isoliert aus der generierten Komp222_Δ*slr*1649 Mutante der Zusammensetzung von Wildtyp Phycobilisomen gleichzusetzen ist (Abb. 3-8A). Die in einer Δ*slr*1649 Mutante fehlenden Rod-Linker Proteine CpcC2 und CpcD (Bolte et al. 2008) sind in der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante als Bestandteil der Phycobilisomen nachweisbar. Weiterhin konnte keine auffällige Veränderung der molekularen Masse der Phycocyanin ß-Untereinheit innerhalb der Phycobiliproteine beobachtet werden, wie dies für die Phycocyanin β-Untereinheit einer Δ*slr*1649 Mutante der Fall ist (Abb. 3-8A).

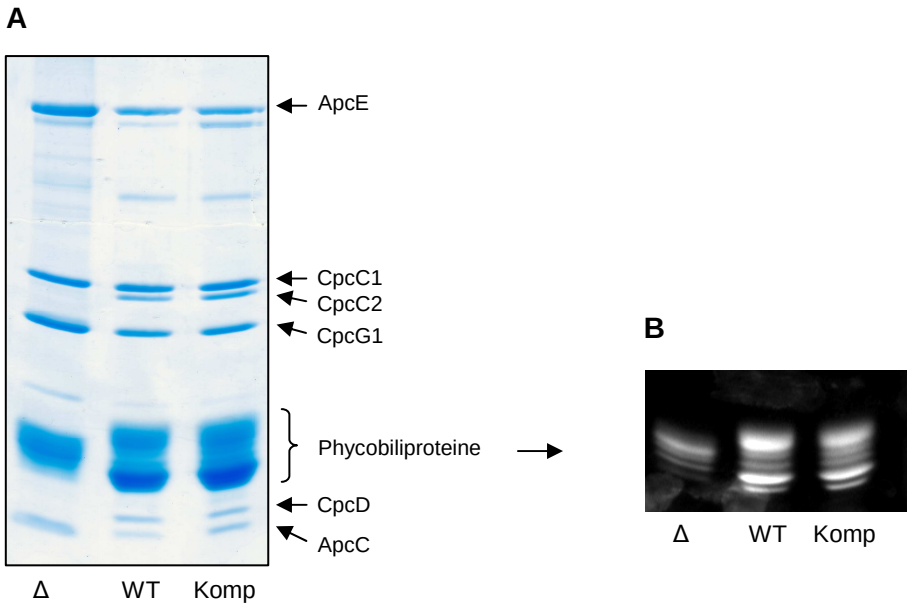

Abb. 3-8: SDS-PAGE Analyse isolierter Phycobilisomen. Die isolierten Phycobilisomen aus Δ*slr*1649 (Δ), Wildtyp (WT) und Komp222_Δ*slr*1649 (Komp) Kulturen wurden auf einem Acrylamidgel mit einem Gradienten von 10-15% aufgetrennt.
A, Visualisierung aller aufgetrennten Proteine mittels Coomassie-Färbung. ApcE, Phycobilisomen Core-Membran Linker Polypeptid. CpcC1, Phycobilisomen Rod Linker Polypeptid. CpcC2, Phycobilisomen Rod Linker Polypeptid. CpcG1, Phycobilisomen Rod-Core Linker Polypeptid. CpcD, Phycobilisomen small Rod Linker Polypeptid. ApcC, Phycobilisomen small Core Linker Polypeptid.
B, Visualisierung der Biline mittels Färbung mit Zinksulfat.

Proteine mit chromophoren Gruppen lassen sich durch eine kurze Inkubation mit 200mM $ZnSo_4$ Lösung visualisieren. Dort kommt es zu einer Komplexbildung der positiv geladenen Zn^{2+} Ionen mit den Bilinen der Phycobiliproteine (siehe Kapitel 7.6.5.2).

In Abbildung 3-8B zeigt sich eindeutig, dass die Signalintensitäten der chromophoren Gruppen zwischen Phycobilisomen-Untereinheiten des Wildtyps und des Komplementationsstammes nahezu identisch waren. Eine reduzierte Signalintensität,

welche für eine Δ*slr*1649 Mutante erkennbar ist, konnte trotz äquivalenter Proteinmengen für die Komp222_Δ*slr*1649 Mutante nicht gezeigt werden.

3.3.2.3.2 Proteolytische Experimente

Abschließende proteolytische Experimente sollten klären, ob Phycocyanin β-Untereinheiten der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante eine dem Wildtyp identische Ausstattung mit Bilinen aufweisen. Phycocyanin β-Untereinheiten besitzen in Cyanobakterien zwei Biline an den Positionen Cystein-84 und Cystein-155. In Insertionsmutanten *orf*222 homologer Gene fehlt das Bilin an Position Cystein-155 (Shen et al. 2006, Bolte et al. 2008). Dazu wurde eine definierte Menge aufkonzentrierter Phycobilisomen über Nacht bei 37°C mit 70% Ameisensäure behandelt (siehe Kapitel 7.6.10), wodurch Peptidbindungen zwischen den Aminosäuren Asparaginsäure und Prolin spezifisch gespalten werden.

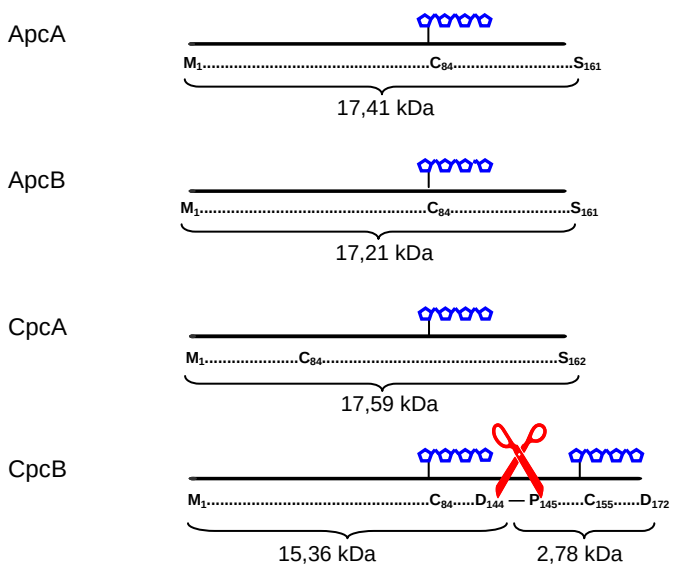

Abb. 3-9: Theorie des durchgeführten proteolytische Assays. Durch Behandlung mit 70% Ameisensäure kommt es zur Spaltung der Peptidbindung Asparaginsäure-Prolin innerhalb der Phycocyanin β-Untereinheit (CpcB). Insgesamt entstehen fünf verschiedene fluoreszierende Fragmente, korrespondierend für die intakten Allophycocyanin Untereinheiten (ApcA, ApcB) sowie die Phycocyanin α-Untereinheit (CpcA). Zwei fluoreszierende Fragmente entstehen durch die proteolytische Spaltung der Phycocyanin β-Untereinheit (CpcB).

Die Phycocyanin β-Untereinheit besitzt an Position 144 und 145 die Aminosäuren Asparaginsäure gefolgt von Prolin. Diese Reihenfolge findet sich ausschließlich in Phycocyanin β-Untereinheiten und ist weder in Phycocyanin α-Untereinheiten, noch in einer der beiden Allophycocyanin Untereinheiten zu finden (Abb. 3-9).

Durch eine Inkubation mit verdünnter Ameisensäure wird die Peptidbindung spezifisch proteolytisch gespalten. Dabei entstehen für die Phycocyanin β-Untereinheit zwei einzelne Fragmente von 15,36 und 2,78 kDa Größe, die jeweils ein Bilin tragen (Abb. 3-9). Die anderen Phycobiliproteine wie die α-Untereinheit des Phycocyanins sowie die beiden Allophycocyanin Untereinheiten bleiben von der proteolytischen Behandlung unbetroffen und werden somit in ihrer natürlichen Größe erwartet.

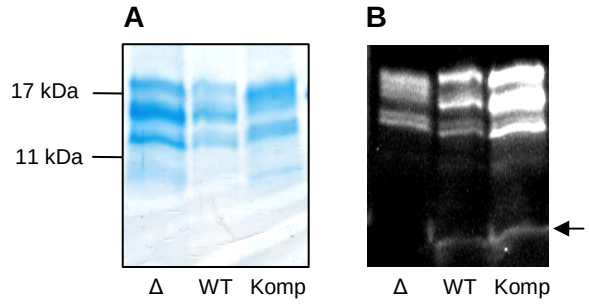

Abb. 3-10: Auftrennung proteolytisch behandelter Phycobilisomen mittels SDS-Tricin PAGE.
A, Coomassie-Färbung.
B, Färbung mit Zinksulfat. Die erwartete Bande bei 2,78 kDa (Pfeil) ist sowohl in Wildtyp (WT), als auch in Komp222_Δ*slr*1649 (Komp) Fraktionen zu detektieren, fehlt jedoch bei Fraktionen der Δ*slr*1649 (Δ)Mutanten.

Wie in Abb. 3-10 dargestellt, treffen die *in silico* vorhergesagten Größen zu. Ein eindeutiges Signal im Größenbereich von 2,78 kDa konnte in den Spuren der proteolytisch behandelten Phycobilisomen des Wildtyps, als auch der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante detektiert werden. Ein Fehlen dieses Signals konnte hingegen in der Spur mit proteolytisch behandelten Phycobilisomen der Δ*slr*1649 Mutante beobachtet werden. Dies bedeutet, dass das Bilin an Position Cystein-155 der Phycocyanin ß-Untereinheit in der Komp222_Δ*slr*1649 Mutanten an das Apoprotein gebunden ist. Diese Situation entspricht der des Wildtyps. Deutlich zu erkennen sind anhand der Fluoreszenz im Bereich von 17 kDa die anderen Phycobiliprotein-Untereinheiten, sowie das zweite proteolytische Fragment der Phycocyanin ß-Untereinheit, welches ein Bilin an Position Cystein-84 trägt.

3.4 Phylogenetische Analyse des Proteins Orf222 und seiner Homologen

Die Anzahl der Orf222 homologen Proteine pro Organismus variiert, korreliert allerdings mit der Anzahl verschiedener Phycobiliproteine, so dass sich tendenziell in Spezies mit mehreren verschiedenen Phycobiliproteinen (ausgenommen Allophycocyanin) auch mehrere Orf222 homologe Proteine identifizieren lassen (Bolte et al. 2008).

Zur phylogenetischen Analyse wurde ein Netzwerk mit 43 Sequenzen Orf222 homologer Proteine berechnet. Der Vorteil eines phylogenetischen Netzwerkes ist die Darstellung schwächerer und eventuell widersprüchlicher Signale, welche in einem bifurzierenden Baum nicht berücksichtigt werden. Das mit dem Programm MUSCLE (Edgar 2004) erstellte Alignment enthielt 307 Positionen mit 191 Positionen, an denen Lücken in dem Alignment auftraten. Diese Positionen können die Berechnung des Netzwerkes verfälschen und wurden deshalb aus dem Alignment entfernt. Von den verbliebenen 116 Positionen wurden die Hamming-Distanzen (engl. *Hamming distance* oder *p-distance*) mit Hilfe des Programms Splitstree berechnet (Huson und Bryant 2006). Diese Distanzen dienten anschließend zur Konstruktion des Netzwerkes, das mit dem Programm Splitstree graphisch dargestellt wurde.

Die phylogenetische Analyse zeigt, dass sich die Mehrheit der Orf222 homologen Proteine in vier verschiedene, monophyletische Gruppen einordnen lassen (Abb. 3-11). Letztere werden als die Gruppen Slr1649-artig A und B sowie CpeT-artig A und B bezeichnet. Sie werden ausschließlich von cyanobakteriellen Homologen gebildet. Für einige wenige homologe Proteine konnten keine Zugehörigkeiten zu einer der vier Gruppen extrapoliert werden. Dazu zählen zwei cyanobakterielle Vertreter, die beiden homologen Proteine CpcT aus *Synechococcus* sp. PCC7002 und das Protein Glr1538 aus *Gloeobacter violaceus* PCC7421 und das Homolog S-PM2p215 des Cyanophagen S-PM2. Andere nicht einfügbaren Vertreter sind ausschließlich homologe Proteine aus Eukaryoten. Dies sind die Homologen aus der Thecamöbe *Paulinella chromatophora*, den Landpflanzen *Arabidopsis thaliana* und *Oryza sativa*, der Rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae* und die beiden Proteine der Cryptophyten *Guillardia theta* und *Hemiselmis andersenii*.

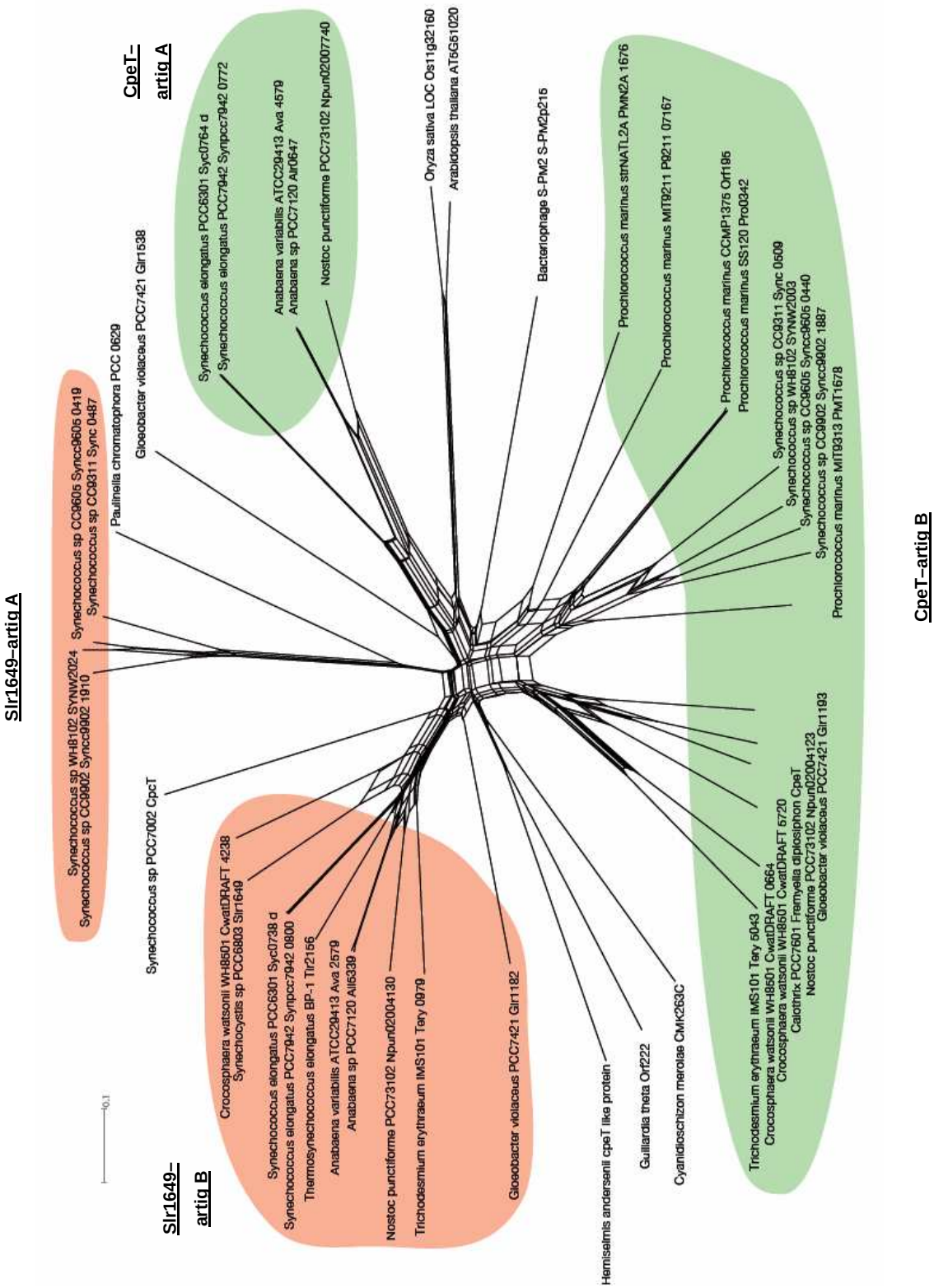

Abb. 3-11: NeighborNet (NNet) splits Graph für 43 homologe Proteine. Hervorgehoben sind vier monophyletische Gruppen. In rot hervorgehoben sind die Gruppen A und B der Slr1649-artigen Proteine, in grün die Gruppen A und B der CpeT-artigen Proteine.

4. DISKUSSION

Die Gruppe der Cryptophyten nutzt zur Sammlung von Lichtenergie akzessorische Proteine und Pigmente. Eine Besonderheit der in sekundärer Endosymbiose entstandenen Gruppe ist die bis heute andauernde Existenz eines reduzierten Restzellkerns, dem Nukleomorph, der den Nukleus der vormals aufgenommenen Rhodophyte darstellt. Im Zuge der Evolution wurde das Genom des Nukleomorph stark reduziert und scheint heute, neben sogenannten *house-keeping* Genen nur essentielle Proteine für Plastide und Proteintransport zu kodieren (Zauner et al. 2000, Douglas et al. 2001, Sommer et al. 2007). Eine Besonderheit stellen die auf dem Nukleomorph kodierten plastidären Proteine dar, welche als ein Grund für die andauernde Existenz des Nukleomorph angenommen werden. Für einen Teil dieser Proteine konnten Funktionen oder eine Beteiligung innerhalb verschiedener plastidärer Prozesse ermittelt werden. Proteine mit bis heute unbekannter Funktion scheinen ebenfalls wichtige Funktionen innerhalb der Plastide zu besitzen und stellen einen interessanten Forschungsaspekt dar. Diese Arbeit sollte einen Beitrag zur Aufklärung weiterer Funktionen Nukleomorph-kodierter plastidärer Proteine leisten.

4.1 Die Komplementations-Mutante Komp222_Δ*slr*1649

Um funktionell unbekannte Proteine aus Cryptophyten charakterisieren zu können und deren Funktion zu analysieren, muss zum Teil auf heterologe Systeme zurückgegriffen werden, da eine genetische Manipulation dieser Organismen bis heute nicht möglich ist. Dabei eignet sich für die Analyse plastidärer Gene das Cyanobakterium *Synechocystis* aufgrund seiner leichten genetischen Zugänglichkeit und seines vollständig sequenzierten Genoms.

Zur funktionellen Analyse des Nukleomorph-kodierten, plastidären Proteins Orf222 aus *G. theta* wurde daher eine Komplementation des *orf*222 homologen Gens *slr*1649 in *Synechocystis* mit dem Gen der Cryptophyte untersucht. Dazu wurde das cyanobakterielle Gen *slr*1649 verändert und das cryptophytische Gen *orf*222 unter Kontrolle des natürlichen Promotors des *slr*149 Gens gesetzt. Die generierte Mutante Komp222_Δ*slr*1649 wurde in

Bezug auf ihre Lichtsammelkomplexe sowohl mit Wildtyp, als auch mit einer Insertionsmutante Δ*slr*1649 verglichen. Bei letzterer wurde das *orf*222 homologe Gen durch die Insertion einer Resistenzkassette unterbrochen (Kawach 2006). Insertionsmutanten *orf*222 homologer Gene in Cyanobakterien zeigen einen eindeutigen makroskopischen Phänotyp, der auf charakteristischen Veränderungen innerhalb der Phycobilisomen-Struktur basiert (Shen et al. 2006, Bolte et al. 2008). In der generierten Komp222_Δ*slr*1649 Mutante konnte die Abwesenheit exprimierter Slr1649 Proteine mittels spezifischer Antikörper demonstriert werden (Abb. 3-3), so dass von einem *knock-out* des Gens *slr*1649 ausgegangen werden kann. Der Nachweis der Transkription des inserierten Gens *orf*222 lässt stark vermuten, dass strukturelle Veränderungen der Phycobilisomen im Vergleich zu einer Δ*slr*1649 Mutante auf die Funktionalität des Orf222 Protein zurückgeführt werden können. Durch die gezielte Insertion des verwendeten Konstrukts sollte das Gen *orf*222 in der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante unter dem Einfluss des gleichen Promotors stehen, wie das wildtypische Gen *slr*1649 in einem Wildtyp Stamm. Auf Transkriptionsebene und Translationsebene sollte dies in einer identischen Expression beider Proteine resultieren.
Zur Überprüfung können wahlweise Analysen mittels qRT-PCR (quantitative *real-time* PCR) oder quantitative Proteinbestimmungen mittels spezifischer Antikörper angewendet werden. Letztere der beiden Methoden ist zu bevorzugen, da es zu posttranskriptionellen Regulationen von Proteinexpressionen kommen kann (Lackner und Bahler 2008), die bei der Analyse der Transkriptmengen mittels qRT-PCR nicht berücksichtigt werden. Erste Versuche zur Überprüfung ob das Gen *orf*222 in der Kom222_Δ*slr*1649 Mutante unter Kontrolle des gleichen Promotors steht wie das endogene Gen *slr*1649 im Wildtyp wurden mangels spezifischer Antikörper gegen das Protein Orf222 anhand qRT-PCR Experimenten durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass tendenziell von einer sehr ähnlichen Expression beider Gene, dem Gen *slr*1649 im verwendeten Wildtyp Stamm und dem Gen *orf*222 in der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante ausgegangen werden kann (Daten nicht gezeigt). Diese ersten Tendenzen bedürfen allerdings noch statistischer Absicherungen, um eine endgültige Aussage treffen zu können.

4.1.1 Eindeutiger makroskopischer Phänotyp

Die im Rahmen dieser Arbeit generierte Komp222_Δ*slr*1649 Mutante zeigte bei gleichen Zellzahlen eindeutig eine Farbe ähnlich des wildtypischen blau-grün, im Vergleich zu dem gelb-grün der Δ*slr*1649 Kulturen. Diese wildtyp-ähnliche Farbe kann aufgrund des nachgewiesenen kontrollierten *knock-outs* des *slr*1649 Gen und des positiven Nachweis der Transkription des integrierten cryptophytischen Gens *orf*222 auf eine Expression des Proteins Orf222 zurückgeführt werden.

Der gelb-grüner Phänotyp der Insertionsmutante ist unter anderem aus Cyanobakterien mit Mutationen in Genen der Phycobiliproteine, Linker-Proteine oder Bilin Lyasen bekannt und resultiert aus einem reduzierten Gehalt der Phycobiliproteine (Anderson et al. 1987, Plank und Anderson 1995, Plank et al. 1995, Kondo et al. 2005, Shen et al. 2006, Bolte et al. 2008). Die deutliche Farbveränderung der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante lässt vermuten, dass sich der Gehalt des Phycobiliproteins Phycocyanin im Vergleich zu einer Δ*slr*1649 Mutante verändert hat. Der Gehalt ist dem einer Wildtyp Kultur nahezu gleichzusetzen, was durch Absorptionsspektren intakter Zellen sowie durch verschiedene Pigmentanalysen gezeigt werden konnte. Ob die Veränderung des Phycocyanin-Gehalts in der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante auch in wildtyp-ähnlichen „vollständigen" Phycobilisomen resultiert, können diese Experimente allein nicht klären. Denkbar wäre, neben einer vollständigen Assemblierung der Phycobiliproteine zu wildtyp-ähnlichen Phycobilisomen auch, dass diese als freier Pool in der Zelle vorliegen könnten (siehe Kapitel 4.1.2).

4.1.2 Phycobilisomen der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante sind denen des Wildtyps gleichzusetzen

Aufgrund der offensichtlichen Veränderungen der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante im spektralen Bereich der Phycobiliproteine wurden Phycobilisomen der Komp222_Δ*slr*1649 Mutanten, des Wildtyps und einer Δ*slr*1649 Mutanten näher untersucht und vergleichend analysiert (siehe Kapitel 3.3.2).

4.1.2.1 Untersuchungen intakter Phycobilisomen

Durch Auftrennung in kontinuierlichen Saccharose-Dichtegradienten lassen sich die Proteinkomplexe der Phycobilisomen in hochmolekularen Puffern intakt isolieren, wobei die Migrationsweite dabei der Masse des jeweiligen Komplexes entsprechend erfolgt. Isolierte Phycobilisomen von Insertionsmutanten *orf*222 homologer Gene zeichnen sich durch eine geringere Masse aus, da sie innerhalb des Gradienten höher ansiedeln als Phycobilisomen des Wildtyps (Shen et al. 2006, Bolte et al. 2008). Dieses veränderte Migrationsverhalten wurde auf das Fehlen einzelner Rod-Komponenten zurückgeführt, was in einer leichteren Masse der Phycobilisomen resultiert. Weiterhin wurde vermutet, dass dem Gradienten weitere, nicht einmigrierte Phycobiliproteine aufliegen. Wildtyp Phycobilisomen migrieren hingegen in einer typischen scharf abgegrenzten Bande.

Intakte Phycobilisomen der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante zeigten eine ähnliche Migrationsweite wie Phycobilisomen des Wildtyp Stamms (Abb. 3-6A). In einer Δ*slr*1649 Mutanten fehlende Rod-Komponenten scheinen also in der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante wieder assembliert zu sein. Dafür spricht auch die Tatsache, dass keine, dem Gradienten aufliegenden Ansammlung von Phycobiliproteinen beobachtet werden konnte. Die vorherige Mutmaßung, dass Phycocyanin-Untereinheiten als freier Pool in den Zellen vorliegen könnten und nicht in Phycobilisomen assembliert sind, ist somit widerlegt. Damit ist eine Veränderung, resultierend auf einer Expression des Proteins Orf222 auch im Bereich der intakten Proteinkomplexe eindeutig gezeigt. Die Expression scheint jedoch nicht zur vollständigen Wiederherstellung des Wildtyp-Zustands zu genügen, da eine weitere, schwache Bande innerhalb des Gradienten beobachtet werden konnte, deren

Migrationsweite höher anzusiedeln ist. Möglicherweise kommt es während der Präparation der Proteinkomplexe zur Ablösung einiger Rod-Komponenten in anteilsmäßig wenigen Phycobilisomen, die sich anschließend in diesem Dichte-Bereich ansiedeln. Dadurch lässt sich vermuten, dass Phycobilisomen der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante eine ähnliche Größe wie die des Wildtyps besitzen, aber weniger stabil sind, da es während der Präparation von Phycobilisomen des Wildtyps nicht in dem Ausmaß zu einer Ablösung einzelner Komponenten kommt.

Absorptionsspektren der isolierten, intakten Phycobilisomen aus allen drei Stämmen zeigten, dass die Verschiebung des Phycocyanin-Maximums in den roten Bereich der Phycobilisomen der Δ*slr*1649 Mutante durch die Komplementation mit dem Protein Orf222 unterbunden wird (Abb. 3-6B). Das Maximum der Komp222_Δ*slr*1649 Phycobilisomen liegt bei 621nm und entspricht damit exakt dem Maximum der Wildtyp Phycobilisomen. Die Verschiebung des Maximums der Δ*slr*1649 Phycobilisomen resultiert aus der Normalisierung der Spektren auf den jeweilig höchsten Absorptionspeak. Aufgrund des reduzierten Phycocyanin-Gehalts entspricht das Maximum der Δ*slr*1649 Phycobilisomen dem des Allophycocyanins bei 650nm. Durch die Normalisierung wird das Absorptionsmaximum des Phycocyanins von dem des Allophycocyanins überdeckt.

Zur Darstellung von Größenunterschieden wurden intakte Phycobilisomen mittels Negativ-staining auf elektronenmikroskopischer Ebene visualisiert. Die Darstellung auf ultrastruktureller Ebene stellt große Anforderungen an die methodische Durchführung und ist daher mit Vorsicht zu betrachten, da es im Zuge der Präparationen zur ungewollten Dissoziation einzelner Phycobilisomen-Komponenten kommen kann. Phycobilisomen der Δ*slr*1649 Mutante zeigen eine Tendenz zu kürzeren Rod-Strukturen, während diese bei Wildtyp und Komp222_Δ*slr*1649 Phycobilisomen gleiche Längen besitzen (Abb. 3-7). Damit bestätigen sich auch auf ultrastruktureller Ebene die Daten, welche durch die Analysen von Dichtegradienten und Absorptionsspektren ermittelt wurden. Folglich liegen erste Hinweise vor, dass Phycobilisomen der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante denen des Wildtyps gleichzusetzen sind und implizieren, dass das Protein Orf222 aus *G. theta* funktionell in der Lage ist, einen *knock-out* des homologen Gens *slr*1649 aus *Synechocystis* nahezu vollständig zu komplementieren.

4.1.2.2 Untersuchungen einzelner Phycobilisomen Untereinheiten

Mit Analysen spektraler Eigenschaften und Größen intakter Phycobilisomen können keine Aussagen zur Proteinzusammensetzung der Phycobilisomen vollbracht werden. Durch gelelektrophoretischen und proteolytischen Untersuchungen wurden die Untereinheiten der Phycobilisomen aller drei Stämme analysiert und miteinander verglichen.

4.1.2.2.1 Die Rod-Linker Proteine CpcC2 und CpcD werden in der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante exprimiert und in die Phycobilisomen integriert.

Durch gelelektrophoretische Auftrennungen isolierter Phycobilisomen aller drei Stämme konnte deren Proteinzusammensetzung detailliert analysiert werden. Eine darauf folgende massenspektroskopische Analyse lieferte den Nachweis, dass Phycobilisomen der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante und des Wildtyps in ihrer Zusammensetzung aus verschiedenen Untereinheiten identisch sind. So konnte gezeigt werden, dass die beiden, in einer Δ*slr*1649 Mutante fehlenden Rod-Linker Proteine CpcC2 und CpcD in der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante exprimiert und auf Protein Level innerhalb angereicherter Phycobilisomen nachweisbar sind (Abb. 3-8A). CpcC2 und CpcD liegen innerhalb der einzelnen Rod-Strukturen proximal zur Core-Region (Abb. 1-8) (de Lorimier et al. 1990a, de Lorimier et al. 1990b, Grossman et al. 1993). Sie interagieren mit den Phycobiliprotein Disks wahrscheinlich über eine Kombination aus hydrophoben Wechselwirkungen und unterschiedlichen Ladungszuständen im Hohlraum, den die Trimer- bzw. Hexamer-Strukturen bilden (Füglistaller et al. 1984, Glauser et al. 1992, Wilk et al. 1999). Das Fehlen beider Proteine in einer Δ*slr*1649 Mutante wird posttranslationalen Ursachen zugeschrieben, da ihre Expression auf Transkriptebene bestätigt werden konnte (Bolte et al. 2008). Ihre Funktionen als „Rod Capping Linker“ (CpcD) sowie als Verknüpfer der terminalen mit der darunter liegenden Disc (CpcC2) führten zur Vermutung, dass Rods der Phycobilisomen einer Δ*slr*1649 Mutante nur noch aus ein bis zwei Disks bestehen.

Durch den Nachweis, dass Phycobilisomen der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante alle Komponenten eines wildtypischen Phycobilisoms aufweisen, ist davon auszugehen, dass es auf subzellulärer Ebene zur Zusammensetzung vollständiger, wildtypischer Phycobilisomen in der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante kommt. Die Rod-Linker Proteine

CpcC2 und CpcD werden somit in die Rod-Strukturen der Phycobilisomen integriert und nicht, wie es im Falle einer Δ*slr*1649 Mutante vermutet wird, proteolytisch degradiert. Damit existiert auch auf Ebene der einzelnen Proteinkomponenten, aus denen sich Phycobilisomen zusammensetzen ein dem Wildtyp nahezu identischer Zustand.

4.1.2.2.2 Die Phycocyanin β-Untereinheit der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante trägt an zwei verschiedenen Positionen zwei Biline.

Phycobiliproteine der Komp222_Δ*slr*1649 Mutanten zeigen zum Wildtyp identische Eigenschaften. Bereits im Zuge der gelelektrophoretischen Analysen konnte ein Massenshift wie jener der Phycocyanin β-Untereinheit einer Δ*slr*1649 Mutante nicht für die korrespondierende Untereinheit aus der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante beobachtet werden. Auch die Signalintensitäten fluoreszierender Biline aller Phycobiliproteine zeigten keinen Unterschied zum denen des Wildtyps (Abb. 3-8B). Anhand dieser Daten lässt sich vermuten, dass die Ausstattung der einzelnen Phycobiliproteine der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante mit Bilinen identisch zur Ausstattung des Wildtyps ist.

Ursache für einen sichtbaren Massenshift der Phycocyanin β-Untereinheit und eine reduzierte Signalintensität fluoreszierender Bilin-Gruppen in Insertionsmutanten *orf*222 homologer Gene ist die Abwesenheit eines Bilins an Position Cystein-155 (Shen et al. 2006, Bolte et al. 2008). Da ein einzelnes Bilin ohne Apoprotein gerade einmal eine Masse von 582 Da besitzt, war es notwendig, die Phycocyanin β-Untereinheit der Komp222_Δ*slr*1649 Mutanten genauer zu untersuchen. Hierbei konnte mittels einer proteolytischen Analyse gezeigt werden, dass die Phycocyanin β-Untereinheit der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante wie der Wildtyp zwei Biline trägt (Abb. 3-9). Daher kann von einer wildtypischen Situation gesprochen werden.

Biline sind über Thioetherbrücken an konservierte Cysteine an den Positionen 84 und 155 der Phycocyanin β-Untereinheit gebunden (Scheer und Zhao 2008). Das Bilin an Position Cystein-84 ist sowohl für die korrekte Faltung der Globindomäne der β-Untereinheit wie auch für die Interaktion mit der α-Untereinheit wichtig (Schirmer et al. 1985, Pastore und Lesk 1990), das Bilin an Position Cystein-155 „nur“ an der Interaktion der α- und β-Untereinheit (Toole et al. 1998). Fehlt dieses Bilin allerdings, wie es in einer Δ*slr*1649

Mutante der Fall ist, so entstehen aufgrund einer veränderten Bindungsaffinität zwischen α- und β-Untereinheit eine Reihe von Sekundäreffekten, die für das phänotypische Erscheinungsbild dieser Insertionsmutante verantwortlich sind (Bolte et al. 2008). Dazu gehören nicht assemblierte Untereinheiten wie die Linkerproteine CpcC2 und CpcD sowie fehlende Phycocyanin Heterododecamere (Abb. 1-8). Die dadurch bedingte Verkürzung der Rod-Strukturen ist Ursache für ein verändertes Migrationsverhalten der Phycobilisomen in Saccharose-Gradienten, einen reduzierten Phycocyanin Gehalt und letztendlich für eine gelb-grüne Farbe von Flüssigkulturen der Insertionsmutante.

Durch die Komplementation der endogenen Lyase Slr1649 und den dadurch wiederhergestellten wildtypischen Zustand ist gezeigt, dass einzig das Fehlen des Bilins, bedingt durch eine fehlende Funktion der Lyase, den komplexen Phänotyp der Insertionsmutante hervorruft. In dieser ist die Bindungsaffinität zwischen den beiden Phycocyanin Untereinheiten herabgesetzt, was Einfluss auf alle höheren Phycocyanin Aggregate und die einzelnen Linkerproteine hat. Die Phycocyanin-Rods sind dadurch möglicherweise verkürzt. Es ist wahrscheinlich, dass die Symmetrie dieser Struktur dahingehend gestört ist, dass eine stabile Interaktion zwischen Linkern und Phycobiliproteinen nicht möglich ist. Da es trotzdem zu einer teilweisen Assemblierung von Phycocyanin in Rod Strukturen kommt, scheint dies nicht alle Linker-Phycobiliprotein Interaktionen gleichermaßen zu betreffen. Hierfür gibt es zwei Möglichkeiten: Entweder die Instabilität tritt erst ab einer bestimmten Rodlänge auf, bzw. je länger der Rod, desto instabiler ist die Bindung, oder die Symmetrieunterschiede betreffen die Interaktion zwischen CpcC2 und Phycocyanin mehr als die Interaktion zwischen CpcG bzw. CpcC1 und Phycocyanin. Die dritte Disk, welche auch CpcD tragen würde scheint in jedem Fall nicht vorhanden zu sein, was aus dem Fehlen des Linker Proteins CpcC2 in isolierten Phycobilisomen der Δ*slr*1649 Mutante abgeleitet werden kann.

Somit ist das Bilin an Position Cystein-155 nicht nur an der Interaktion der Phycocyanin Untereinheiten beteiligt, sondern indirekt für einen vollständigen Zusammenbau der Phycobilisomen essentiell.

Die in der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante nachgewiesene Bilin-Gruppe an Position Cystein-155 führt folglich zu erhöhter Stabilität zwischen den beiden Phycocyanin-Untereinheiten, was wiederum im Aufbau vollständiger Rod-Strukturen und Einbau und möglichen Nachweis der beiden Rod-Linker Proteine CpcC2 und CpcD in Phycobilisomen resultiert. Dadurch kann von einer wildtypischen Zusammensetzung der Phycobilisomen der Komp222_Δ*slr*1649 Mutante ausgegangen werden.

Zusammenfassend implizieren die Untersuchungen der Proteinzusammensetzung der Phycobilisomen als auch die nähere Analyse der Phycocyanin β-Untereinheit, dass das Protein Orf222 aus *G. theta* funktionell in der Lage ist, einen *knock-out* des homologen Gens *slr*1649 aus *Synechocystis* nahezu vollständig zu komplementieren. Dies unterstützt die bereits beschriebenen Ergebnisse, resultierend aus der Analyse intakter Phycobilisomen aus Komp222_ Δ*slr*1649, Wildtyp und Δ*slr*1649 Zellen. Dort konnte demonstriert werden, dass Phycobilisomen der Komp222_ Δ*slr*1649 Mutante sowohl auf makroskopischer Ebene, als auch auf elektronenmikroskopischer Ebene denen des Wildtyps gleichzusetzen sind.

4.2 Das Nukleomorph-kodierte Protein Orf222 – ein funktionelles Ortholog einer Phycocyanin-Bilin Lyase

Die bereits diskutierten Ergebnisse, welche durch die verschiedenen, vielfältigen Analysen einer generierten Komplementations-Mutante in dem Cyanobakterium *Synechocystis* gewonnen wurden, lassen die Behauptung zu, dass das Nukleomorph-kodierte Protein Orf222 der Cryptophyte *G. theta* funktionell ortholog zu dem Protein Slr1649 aus dem Cyanobakterium *Synechocystis* ist. Dies bedeutet, dass das Protein Orf222 aufgrund funktioneller und struktureller Verwandtschaft in der Lage ist, die Funktion des Proteins Slr1649 zu ersetzen.

Es ist bekannt, dass es sich bei Orf222 homologen Proteinen höchstwahrscheinlich um spezifische Bilin Lyasen handelt. Diese konnten 2006 erstmals beschrieben und als regiospezifische so genannte T-Typ Lyasen charakterisiert werden (Kawach 2006, Shen et al. 2006). Die monomeren Lyasen besitzen die funktionelle Eigenschaft eine posttranslationale Bindung zwischen einem Phycocyanobilin und dem konservierten

Cystein an Position 155 der Phycocyanin β-Untereinheit herzustellen. Diese Funktion wird in der Komplementations-Mutante Komp222_Δ*slr*1649 durch das Protein Orf222 ausgeführt. Die Funktion im homologen System, in der Cryptophyte *G. theta*, lässt sich aufgrund der genetischen Unzugänglichkeit des Organismus nur theoretisch formulieren. Allgemein ist die Ausstattung von Cryptophyten mit akzessorischen Pigmenten und Bilinen sowie deren Lokalisation und strukturelle Organisation im Vergleich zu Cyanobakterien unterschiedlich. *G. theta* besitzt nur ein einziges Phycobiliprotein, das Phycoerythrin mit den Bilinen Dihydrobiliverdin und Phycoerythrobilin (Glazer und Wedemayer 1995). Aufgrund der Funktionalität des Proteins Orf222 als Lyase im heterologen System, lässt sich stark vermuten, dass das Protein eine Phycoerythrin-Bilin Lyase ist, die in *G. theta* ein Phycoerythrobilin an die Position Cystein-158 der Phycoerythrin β-Untereinheit knüpft. Somit wäre Orf222 als eine T-Typ Lyase mit dem Namen CpeT (Phycoerythrin T-Typ Lyase) zu bezeichnen. Es stellt die erste funktionell charakterisierte eukaryot kodierte Bilin Lyase überhaupt dar.

Eine alternative funktionelle Überprüfung als Lyase wäre methodisch sowohl *in vitro* als auch im heterologen System des Bakteriums *E. coli* möglich, welches mittlerweile für Charakterisierungen einiger Lyasen verwendet wurde (Shen et al. 2006, Zhao et al. 2006b, Zhao et al. 2007a, Zhao et al. 2007b). Der Vorteil von *in vivo* Versuchen gegenüber *in vitro* Experimenten ist im Falle der Charakterisierung von Lyasen eine Verhinderung von spontanen Bindungen der Biline an das Apoprotein. Die meisten Apoproteine können Biline *in vitro* spontan binden, was mit sehr geringer Effizienz stattfindet und zu sogenannten Mischprodukten und Fehlinterpretationen führen kann (Arciero et al. 1988, Fairchild und Glazer 1994a, Zhao et al. 2004). Es wird als unwahrscheinlich angesehen, dass dies auch *in vivo* vorkommt (Scheer und Zhao 2008) und ist somit auch für die generierte und beschriebene Komplementations-Mutante so gut wie auszuschließen.

Aufgrund der Fähigkeit des Proteins CpeT (Orf222) trotz unterschiedlicher Apoproteine und unterschiedlicher Biline die Funktion des homologen Proteins Slr1649 in einem Cyanobakterium vollständig zu ersetzen, kann eine eindeutige Regioselektivität in Bezug auf die homologe Cystein-Bindestelle, aber deutlich weniger Spezifizierung in Bezug auf das jeweilige Bilin und das Apoprotein festgestellt werden. In der generierten

Komplementations-Mutante ligiert CpeT (Orf222) ein Phycocyanobilin an die β-Untereinheit des Phycocyanin an Position Cystein-155; im homologen System *G. theta* theoretisch ein Phycoerythrobilin an die β-Untereinheit des Phycoerythrin an die homologe Position Cystein-158.

Ähnliche Eigenschaften sind auch für eine cyanobakterielle T-Typ Lyase aus *Nostoc* sp. PCC7120 bekannt (Zhao et al. 2007a). Die Rod-Strukturen der Phycobilisomen dieses Cyanobakteriums werden aus zwei verschiedenen Phycobiliproteinen gebildet, dem distal gelegenen Phycoerythrocyanin und dem proximal gelegenen Phycocyanin. Die Phycobiliproteine sind mit zwei unterschiedlichen Bilinen, dem Phycocyanobilin (Phycocyanin) und dem Phycoerythrobilin (Phycoerythrocyanin) ausgestattet. Durch Ligations-Experimente *in vitro* und *in vivo* im heterologen System des Bakterium *E.coli*, konnte gezeigt werden, dass das Protein CpcT1 das Bilin Phycocyanobilin ausnahmslos an die Positionen Cystein-155 bindet, jedoch nicht zwischen den β-Untereinheiten der beiden Phycobiliproteine unterscheiden kann (Zhao et al. 2007a).

Die Generierung von cyanobakteriellen Komplementations-Mutanten ist eine bislang nicht verwendete Möglichkeit zur funktionellen Charakterisierung von Bilin Lyasen. Das hier verwendete Tool der Komplementation eines cyanobakteriellen Proteins zur Charakterisierung des Nukleomorph-kodierten Proteins Orf222 ist daher einmalig.

Denkbar ist mit dem hier beschriebenen Tool die funktionelle Charakterisierung weiterer Bilin Lyasen aus Cryptophyten. Folgt man einer Argumentation von Swanson und Zhao und den Untersuchungen von Phycocyanin Lyasen in Cyanobakterien, sind in *G. theta* bis zu vier verschiedene Bilin Lyasen zu erwarten, da an den beiden Phycoerythrin Untereinheiten vier Biline an vier Positionen zu finden sind (Fairchild et al. 1992, Swanson et al. 1992, Zhao et al. 2006b). Weder auf dem Nukleomorph Genom, noch auf dem Plastiden Genom konnten weitere Homologe bekannter Lyasen identifiziert werden. Diese unterlagen möglicherweise im Laufe der Evolution einem genetischen Transfer in den Nukleus des Wirtes. Unterstützt wird diese Spekulation durch die Identifizierung eines ESTs aus *G. theta* (Accession-Nr. AM183804), welcher sich durch den Besitz einer vorhergesagten BTS auszeichnet. Letztere ist typisch für Nukleus kodierte, plastidär lokalisierte Proteine (Gould et al. 2006a, Gould et al. 2006b). Die Sequenz weist

Homologien zu CpeZ auf; ein Protein, das vermutlich gemeinsam mit CpeY an der Ligation eines Phycoerythrobilins an die Phycoerythrin α- oder β-Untereinheit im Cyanobakterium *Fremyella diplosiphon* (*Calothrix* sp.) beteiligt ist (Kahn et al. 1997). Das mögliche Vorkommen des Lyase-Dimers CpeY/CpeZ in *G. theta* lässt vermuten, dass es sich bei dieser um eine Lyase für Phycoerythrin β-Untereinheiten handelt, da diese im Gegensatz zu den α-Untereinheiten phylogenetisch mit den β-Untereinheiten von Rhodophyten und Cyanobakterien verwandt sind. Die bislang fehlende Komponente CpeY der dimeren Lyase sowie eventuell weitere Phycoerythrin spezifische Lyasen sollten durch die Sequenzierung des Kerngenoms der Cryptophyte durch das DOE Joint Genome Institut (http://www.jgi.doe.gov/sequencing/why/50026.html) nach Abschluss des Projektes theoretisch zu identifizieren sein. Allerdings sollten die Lyasen anschließend auf ihre Funktionalität hin überprüft werden. Komplizierter scheint die Suche nach einer Lyase für Phycoerythrin α-Untereinheiten, da diese keinerlei phylogenetische Verwandtschaft zu den Untereinheiten aus Rhodophyten und Cyanobakterien aufweisen. Die Untereinheiten sind in *G. theta* im Wirtsnukleus von mindestens zwei Genfamilien kodiert und werden posttranslational über fünf Membranen in das Thylakoidlumen der komplexen Plastide importiert (Gould et al. 2007).

Bei Betrachtung eines Alignment von Proteinsequenzen der Lyase CpeT (Orf222) und einigen seiner Homologen finden sich mehrere konservierte Motive (Abb. 3-1). Diese sind wenige Aminosäuren groß und befinden sich in N- und C-Termini der Proteine innerhalb der *domain of unknown function* 1001, welche allen Homologen gemeinsam ist. Aus Studien der beiden E/F–Typ Lyasen in dem Cyanobakterium *Mastigocladus laminosus* ist bekannt, dass einige Aminosäuren Motive für die enzymatische Aktivität der Lyasen essentiell sind (Zhao et al. 2005a, Zhao et al. 2006a). Allerdings unterscheiden sich die Motive zwischen dem PecE/F Lyase Dimer und dem CpcE/F Lyase Dimer, obwohl die homologen Lyasen strukturelle und funktionelle Gemeinsamkeiten haben, wie die Bildung eines heterodimeren Komplex und Ligation eines Bilins an Position Cystein-84 der α-Untereinheit von Phycoerythrocyanin (PecE/F) bzw. Phycocyanin (CpcE/F).

Die konservierten Motive des CpeT Proteins und seiner Homologen ähneln weder denen der PecE/F noch denen der CpcE/F Lyasen. Dies ist möglicherweise zum einen mit unterschiedlichen Apoproteinen und Bilinen und zum anderen mit der abweichenden Ligationsposition am Apoprotein zu erklären. Die Generierung verschiedener Lyase-Mutanten mit veränderten oder deletierten Aminosäuren im homologen oder heterologen System könnte diese Unklarheiten klären und zum weiteren Verständnis der enzymatischen Aktivität von Bilin Lyasen beitragen.

4.3 Funktionelles Phycoerythrin in *Guillardia theta* – eine Beteiligung von drei Genomen

Durch die Kodierung der Phycoerythrin α-Untereinheiten sowie putativer Bilin Lyasen auf dem Nukleus des Wirtes, der Kodierung von CpeT (Orf222) auf dem Nukleomorph und der Kodierung der Phycocyanin β-Untereinheit auf dem Plastiden-Genom kann eine genetische Kompartimentierung für Phycobiliprotein-Komponenten über drei verschiedene Genome demonstriert werden. Bislang war dies für das plastidär lokalisierte SUF-System (*mobilization of sulfur system*) bekannt (Hjorth et al. 2005). Hjorth et al. postulierten verschiedene Gentransfer Ereignisse im Zuge der Entstehung der Cryptophyten (Hjorth et al. 2005), die auch auf die Komponenten der Phycobiliproteine übertragbar sind. Demnach kam es im Laufe der Evolution zu einem Transfer der Gene, kodierend für CpeT (Orf222) und CpeZ vom einstigen Genom des cyanobakteriellen Vorläufers der Plastide in den Nukleus des primären Wirtes (heute Nukleomorph). Das Gen für CpeZ wurde anschließend nach sekundärer Endosymbiose in den Zellkern des sekundären cryptophytischen Wirtes transferiert, wohingegen CpeT (Orf222) in seinem genetischen Kompartiment bis heute retiniert.

Ein aktuelles Modell zur Generierung von funktionellem, im Thylakoidlumen lokalisiertem Phycoerythrin in *G. theta* lässt sich folgendermaßen beschreiben (Abb. 4-1):

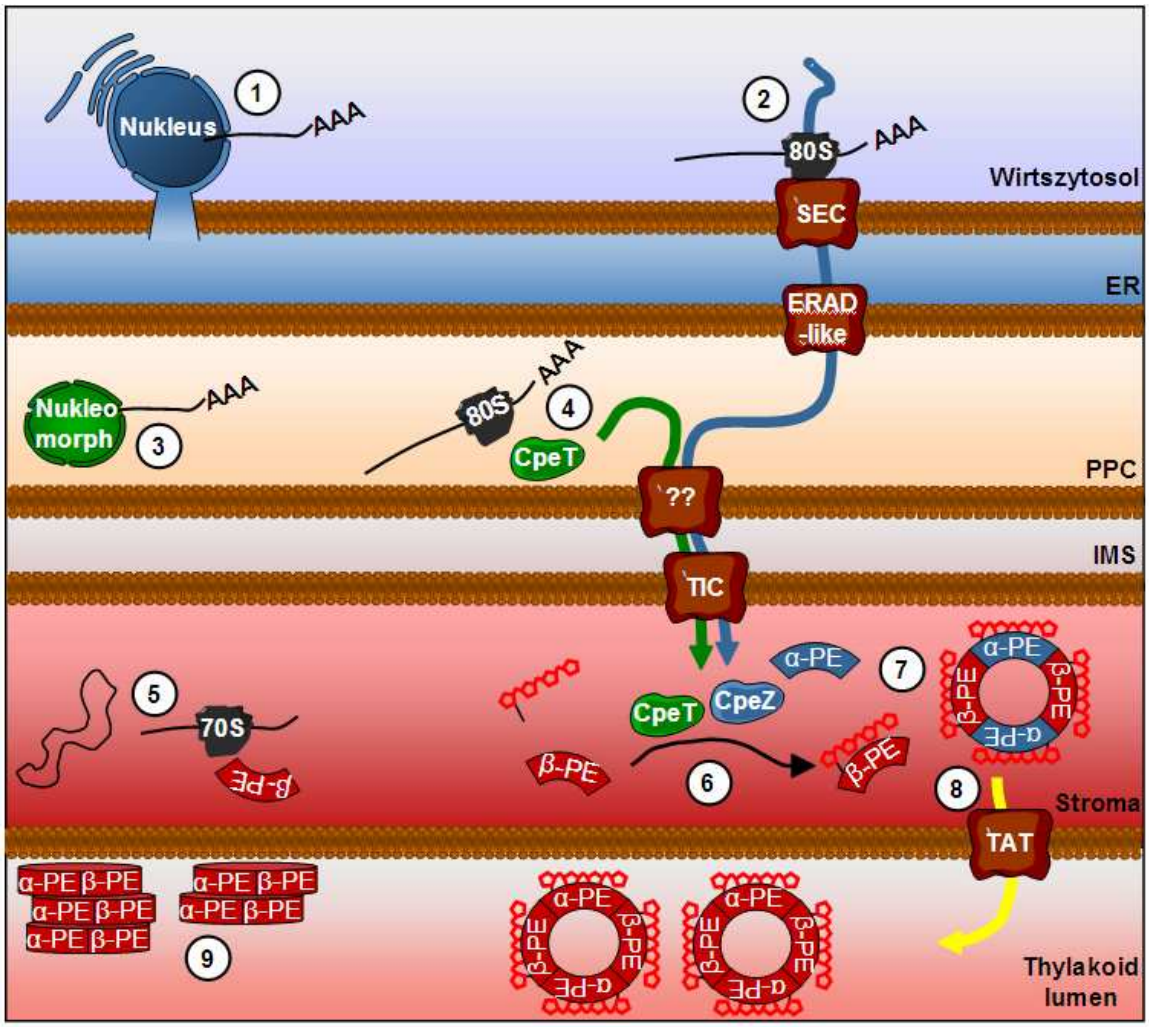

Abb. 4-1: Modell zu Synthese und Transport von funktionellen Phycoerythrin Einheiten in *G. theta*. PPC, periplastidäres Kompartiment. IMS, Intermembranraum. α-PE, Phycoerythrin α-Untereinheit. β-PE, Phycoerythrin β-Untereinheit.
1. Nukleus des Wirtes: Kodierung und Transkription von CpeZ und α-PE. **2.** Kotranslationale Insertion ins ER: Transport über die 1. Membran und die verbleibenden Membranen ins Stroma.
3. Nukleomorph: Kodierung und Transkription von CpeT (Orf222). **4.** Translation der *cpe*T mRNA im periplastidären Kompartiment und Transport über die dritte und vierte Membran der komplexen Plastide. **5.** Plastiden-Genom: Kodierung und Transkription von β-PE, Translation an plastidären Ribosomen. **6.** Bilin-Addition durch CpeT (Orf222) und CpeZ. **7.** Zusammensetzung der Heterotetramere. **8.** Translokation ins Thylakoid-Lumen via TAT Translokase. **9.** Bildung von Phycoerythrin Stapeln.

Nukleus-kodierte Struktur- und Reifungskomponenten werden aus dem Wirtszytosol mit drei- bzw. zweiteiligem topogenem Signal kotranslational über die erste Membran transportiert (Gould et al. 2006b, Gould et al. 2007). Der Import in das Plastiden-Stroma über die drei weiteren Membranen wird wahrscheinlich mit Hilfe drei verschiedener, teilweise noch unbekannter Transportsysteme vollzogen (Hempel et al. 2007, Bolte et al.

2009). Während des Transports und im Plastidenstroma erfolgt die Prozessierung der topogenen Signale. Das Nukleomorph-kodierte Protein CpeT (Orf222), dessen Translation als Präprotein mit einteiligem topogenem Signal im periplastidären Kompartiment erfolgt, wird posttranslational über das *plastid envelope* in das Stroma der Plastide importiert. Dort erfolgt die Synthese der plastidär kodierten Phycoerythrin β-Untereinheit sowie deren Ausstattung mit Bilinen. Daran sind putativ drei verschiedene Lyasen beteiligt. Für die Ligation eines Phycoerythrobilins an Position Cystein-158 ist das Nukleomorph-kodierte Protein CpeT (Orf222) wahrscheinlich essentiell. Nach der Bildung von Heterotetrameren ($\alpha_1\alpha_2\beta\beta$) aus zwei α- und zwei β-Untereinheiten erfolgt die Translokation über die Thylakoidmembran via TAT Translokator (*twin arginine transporter*) (Gould et al. 2007). Dort könnte es zur Bildung kleiner Phycoerythrin-Stapel in der Nähe der Thylakoidmembran kommen, wie es bereits für die Cryptophyte *Cryptomonas rufescens* gezeigt werden konnte (Lichtle et al. 1987).

4.4 Das Nukleomorph-kodierte Protein Orf222 aus *Guillardia theta* und seine Homologen

Durch *in silico* Analysen ermittelte homologe Proteine des Orf222 finden sich in den prokaryoten und eukaryoten Organismen welche alle, mit Ausnahme des Cyanophagen S-PM2, die Fähigkeit zur Photosynthese besitzen und sich größtenteils durch den Besitz von Phycobiliproteinen auszeichnen.

Im direkten Vergleich mit cyanobakteriellen Homologen fällt die N-terminale Extension des Proteins Orf222 auf (Abb. 3-1), welche für einen Import in die Plastide aus dem periplastidären Kompartiment in das Plastidenstroma der Cryptophyte spricht. Unterstützt wird dies durch die Identifikation des konservierten FXN Motivs an Position 4-6 des Proteins, welches als konserviertes Motiv für einen plastidären Import gilt (Cavalier-Smith 2003). Die allen Homologen gemeinsame konservierte Domäne DUF1001 deutet auf eine funktionelle Verwandtschaft der Proteine hin.

Zur Visualisierung von Verwandtschaftsbeziehungen des Proteins Orf222 und seiner Homologen wurde ein Netzwerk mit Proteinsequenzen aus 43 Organismen berechnet, um

eine Verwandtschaft mit und die evolutionäre Entwicklung eines Proteins im Vergleich zu anderen Proteinen zu verstehen. Unterzieht man das Protein Orf222 aus *G. theta* und eine größere Anzahl seiner Homologen aus diversen Organismen dieser phylogenetischen Analyse, so lassen sich vier verschiedene monophyletische Gruppen erkennen. Monophyletisch bedeutet, dass alle Proteine innerhalb einer Gruppe auf einen gemeinsamen Vorläufer zurückgehen. Diese vier Gruppen werden ausschließlich von homologen Proteinen aus Cyanobakterien gebildet (Abb. 3-11).

4.4.1 Orf222 Homologe in Cyanobakterien

Durch die Analysen einer Insertionsmutante in *Synechococcus* sp. PCC7002 konnte ein cyanobakterielles Homolog als spezifische Bilin Lyase für ein Phycobiliprotein beschrieben werden (Shen et al. 2006) und stellt somit ein für die Reifung von Phycobilisomen essentielles Protein dar. Aufgrund dieser Charakterisierung scheint die Funktion zumindest innerhalb der Cyanobakterien geklärt.

Die Gruppierung der cyanobakteriellen Homologen in vier monophyletische Gruppen korreliert zum Teil mit einer bekannten Einteilung, die allerdings nicht auf phylogenetischen Berechnungen beruht (Kawach 2006). Dort wurden die homologen Proteine aufgrund der *Expected Values*, welche auf Homologien mit Protein Slr1649 aus *Synechocystis* beruhen, in zwei verschiedene Gruppen eingeteilt. Diese zwei Gruppen werden in der hier durchgeführten phylogenetischen Analyse in jeweils zwei weitere phylogenetische Gruppen unterteilt, welche als Slr1649-artige Gruppen A und B sowie als CpeT-artige Gruppen A und B bezeichnet werden. Die Anzahl Orf222 homologer Proteine in Cyanobakterien variiert von Spezies zu Spezies, korreliert aber größtenteils mit der Anzahl unterschiedlicher Phycobiliproteine pro Organismus (Bolte et al. 2008).

Die Einteilung der homologen Proteine ist äquivalent zu dem genomischen Kontext in welchem die einzelnen, für die jeweiligen Proteine kodierenden Gene stehen. Dies wird mit Hilfe der dargestellten Tabelle deutlich (Tab. 4-1).

Tabelle 4-1: Aufstellung aller untersuchten prokaryoten homologen Proteine des Nukleomorph-kodierten Orf222 der Cryptophyte *G. theta*, ihre Einordnung in phylogenetische Gruppen und der genomische Kontext der jeweiligen Gene nach Bolte et al. 2008. PBP, Phycobiliproteine.

prokaryote Organismen		PBP	Homologe des Proteins Orf222	CpeT-artig	Slr1649-artig	Genomischer Kontext
Synechocystis	S. sp. PCC6803	PC	Slr1649		B	*slr1648/ssr2754/**slr1649***
Crocosphaera watsonii	WH8501	PE PC	CwatDRAFT_4238 CwatDRAFT_0664 CwatDRAFT_5720	 B B	B	***cwatDRAFT_4238**/cwatDRAFT_4297* *cpeA/ **cpeT**/ cpeY* *cpeS/**cpeT**/cpeR*
Nostoc	*N. punctiformes* PCC73102	PEC	Npun02004130 Npun02004123 Npun02007740	 B A	B	*thrC/ **npun02004130**/npun02004132* *cpeS/**cpeT**/cpeR* --
	Nostoc sp.PCC7120	PC	All5339 Alr0647	 A	B	-- --
	A.variabilis ATCC29413		Ava_2579 Ava_4579	 A	B	-- --
Thermosynechococcus elongatus	BP-1	PC	Tlr2156		B	*tlr2154/hemD/**tlr2156***
Synechococcus	elongatus PCC6301	PC	Syc0738_d Syc0764_d	 A	B	***syc0738_d/** syc0739_d/ ruvC* --
	sp.PCC7002		CpcT			*A2909/A2091/A2092/A2093/A2094/cpcT*
	sp. CC9311		Sync_0487 Sync_0509	 B	A	*cpcF/cpcE/**sync_0487**/cpcA/cpcB/pebB* *cpeC/sync_0512/cpeD-1/cpeS/**sync_0509***
	elongatus PCC7942		Synpcc7942_0772 Synpcc7942_0800	A 	 B	-- ***synpcc7942_0800**/synpcc7942_0799/ruvC*
	sp. CC9605	PE	Syncc9605_0440 Syncc9605_0419	B 	 A	*cpeS/**cpeT**/cpeR* *cpcB/cpcA/**syncc9605_0419**/bilin-lyase*
	sp. WH 8102		SYNW2024 SYNW2003	 B	A	*rpcB/rpcA/**synw2024**/bilin-lyase* *cpeC/mpeD/cpeE/cpeS/**cpeT**/cpeR*
	sp. CC9902		Syncc9902_1910 Syncc9902_1887	 B	A	*cpcB/cpcA/**9902_1910**/bilin-lyase* *cpeS/**cpeT**/cpeR*
Trichodesmium erythraeum	IMS101	PC PE	Tery_0543 Tery_0979	B 	 B	*cyp/cyp/**tery0543**/transposase* *cpeZ/**cpeT**/cpeF*[7]
Calothrix	PCC7601	PC PE	CpeT	B		*cpeS/**cpeT**/cpeR*
Gloeobacter violaceus	PCC7421	PE PC	Glr1182 Glr1193 Glr1538	 B --	B --	*apcD/**glr1182**/cpcB/cpcA* *cpeS/**cpeT*** --
Prochlorococcus marinus	MIT9211	PE	P9211_07167	B		*cpeS/**cpeT*** alle benachbart
	CCMP1375		Orf195	B		*cpeS/**cpeT*** zu α- und β-
	MIT9313		PMT1678	B		*cpeS/**cpeT*** Untereinheiten des
	NATL2A		PMN2A_1676	B		*cpeS/**cpeT*** Phycoerythrin
	SS120		Pro0342	B		*pro0347/pucC/ppeC/pro0344/cpeS/**cpeT***

Die Gruppe A der Slr1649-artigen Proteine wird von den Proteinen gebildet, deren Gene einen relativ konservierten Genlokus besitzen. Diese sind ohne Ausnahme in direkter Nachbarschaft zu den kodierenden Regionen zweier Phycobiliprotein-Untereinheiten zu finden. Im Gegensatz dazu stehen Gene der Gruppe B Slr1649-artigen Proteine in einem wenig konservierten genetischen Kontext. Den am höchsten konservierten Genlokus besitzen die Gene, die für Proteine der CpeT-artigen Gruppe B kodieren. Sie liegen in nahezu allen Fällen strangabwärts des *cpe*S Gens und/oder innerhalb des Phycoerythrin-Operons (Tab. 4-1). Für Gene, kodierend für Proteine der Gruppe A hingegen konnten ausnahmslos keine benachbarten Gene in derselben Orientierung gefunden werden. Damit wäre eine engere verwandtschaftliche Beziehung zwischen den Mitgliedern der vier monophyletischen Gruppen auch anhand des genomischen Kontexts bestätigt.

Proteine aus Organismen, in welchen zwei oder mehr homologe Proteine identifiziert werden konnten, verteilen sich immer auf mindestens zwei monophyletische Gruppen. Die Tatsache, dass in diesen Spezies auch immer mehrere verschiedene Phycobiliproteine (mit Ausnahme des Allophycocyanin) zu finden sind, könnte eine Erklärung dafür liefern. Wenn alle homologen Proteine aus Cyanobakterien Funktionen als Bilin Lyasen besitzen, ließe sich durch die phylogenetische Einordnung jeder Lyase ein bestimmtes Apoprotein zuordnen. Die einfachsten Beispiele hierbei sind die Orf222 Homologen aus *Thermosynechococcus elongatus* und *Synechocystis* sp. PCC6803. Beide Cyanobakterien exprimieren neben Allophycocyanin nur eine einzelne Phycobiliprotein-Spezies, das Phycocyanin, und besitzen auch nur ein einziges Homolog, die Proteine Tlr2156 bzw. Slr1649. Beide werden der Gruppe B der Slr1649-artigen Proteine zugeordnet und könnten als Bilin Lyasen ausschließlich das Apoprotein des Phycocyanins bedienen. Auch die Homologen der *Prochlorococcus marinus* Spezies unterstützen diese Vermutung. Diese werden ausnahmslos der Gruppe B der CpeT-artigen Proteine zugeordnet und synthetisieren neben Allophycocyanin als einziges Phycobiliprotein, Phycoerythrin. Komplexere, aber deutlichere Beispiele sind die Homologen aus dem marinen Cyanobakterium *Crocosphaera watsonii*, das sowohl Phycocyanin als auch Phycoerythrin synthetisiert. Während das Protein CwatDRAFT_4238 der Gruppe B der Slr1649-artigen Proteinen zugeordnet wird, und somit eventuell als Lyase das Apoprotein des

Phycocyanins bedienen wird, werden die anderen Homologen CwatDRAFT_0664 und CwatDRAFT_5720 der Gruppe B der CpeT-artigen Proteinen zugeordnet. Letztere sind wahrscheinlich als Lyasen für das Apoprotein des Phycoerythrin zuständig. So könnten Slr1649-artige Proteine für die Ligation eines Bilins ausschließlich an Phycocyanin, CpeT-artige Proteine für die Ligation an Phycoerythrin oder Phycoerythrocyanin verantwortlich sein. Diese Vermutungen unterstützen die phylogenetischen Berechnungen dahingehend, dass es zur Entwicklung mehrer, für jede Phycobiliprotein-Art spezifischer Lyasen gekommen sein könnte.

Orf222 homologen Proteine für die keine klaren Zugehörigkeiten extrapoliert werden konnten sind neben homologen Proteine aus Eukaryoten auch zwei cyanobakterielle Vertreter. Der genomische Kontext weist bei dem homologen Gen aus *Synechococcus* sp. PCC7002 keine Konservierung auf, da benachbarte Gene nicht für Proteine kodieren, die Komponenten der Phycobilisomen darstellen oder an deren Reifung beteiligt sind. Für das homologe Gen *glr*1538 aus *Gloeobacter violaceus* konnten keine benachbarten Gene in gleicher Orientierung identifiziert werden. Dieser Organismus besitzt für seine beiden Phycobiliproteine Phycocyanin und Phycoerythrin drei Orf222 homologe Proteine, wovon zwei aufgrund ihrer Zugehörigkeit zu der Slr1649-artigen Gruppe B (Glr1182) und der CpeT-artigen Gruppe B (Glr1193) als Lyasen für die beiden Phycobiliproteine fungieren könnten. Möglicherweise ist eine Funktion des Proteins Glr1538 als Lyase nicht essentiell. Dies lässt sich theoretisch durch Generation einer Insertionsmutante einfach zeigen, falls diese keine Veränderungen innerhalb der Phycobilisomen-Struktur aufweisen sollte. Alternativ könnte die Funktionalität als Lyase auch in einem heterologen System oder *in vitro* überprüft werden.

4.4.2 Das Orf222 Homolog des Cyanophagen S-PM2

Homologe des Nukleomorph-kodierten Proteins Orf222 der Cryptophyte *G. theta* konnten ausschließlich in Organismen mit autotropher Lebensweise identifiziert werden. Die bis heute einzige bekannte Ausnahme stellt das homologe Protein S-PM2p215 des Cyanophagen S-PM2 dar. Dieses konnte im Rahmen der phylogenetischen Analyse keiner der vier monophyletischen Gruppen zugeordnet werden (Abb. 3-11).

Bakteriophagen werden im Allgemeinen nicht als Lebewesen im eigentlichen Sinn betrachtet, da sie keinen eigenen Stoffwechsel und keine Fähigkeit zur eigenständigen Vermehrung besitzen. Das Orf222 homologe Protein ist auf dem 196 kBp großen Genom des Cyanophagen kodiert (Mann et al. 2005). Zugeordnet wird er der Gruppe der Cyanomyoviren und infiziert vor allem verschiedene *Synechococcus* Stämme und die mit ihnen verwandten Vertreter der *Prochlorococcen* (Waterbury und Valois 1993, Mann et al. 2005). Neben dem Orf222 homologen Protein besitzen sie auch Gene kodierend für die Core-Komponenten D1 (*psbA*) und D2 (*psbD*) des Photosystems II. Untersuchungen haben gezeigt, dass diese Gene kurz nach der Infektion einer Zelle und bis zur deren Lyse in hohem Maße transkribiert werden (Clokie et al. 2006). Der Besitz photosynthetischer Gene ist keineswegs obligatorisch für Bakteriophagen, die Cyanobakterien infizieren, wie das Beispiel des Phagen P60 zeigt, welcher keinerlei photosynthetische Gene besitzt (Chen und Lu 2002). Durch den Besitz der beiden Komponenten des Photosystems und der putativen Lyase CpeT könnte der Cyanophage S-PM2 in der Lage sein, die Photosyntheseleistung des Wirtes zu steigern, was in einer Erhöhung der Energie- und Reduktionäquivalenten für den Replikationszyklus resultiert. Das könnte zu einer vermehrten Entstehung neuer Cyanophagen führen und stellt damit einen Selektionsvorteil gegenüber anderen Cyanophagen dar. Möglich ist auch, dass die Produkte dieser Gene einer Abwehrreaktion des Wirtes, wie z.B. ein Einschränken der Photosyntheseleistung, entgegenwirken sollen.

4.4.3 Orf222 Homologe in Landpflanzen

In Landpflanzen finden sich Orf222 homologe Proteine, deren genauen Funktionen bis heute nicht im Detail geklärt sind. Im Rahmen der phylogenetischen Analyse konnten die homologen Proteine aus *Oryza sativa* und *Arabidopsis* keiner der vier monophyletischen Gruppen zugeordnet werden. Dies könnte anhand des evolutionären Hintergrunds begründet werden, da die untersuchten Proteine von den Zellkernen der jeweiligen primären Wirte kodiert werden (Tab. 4-2) (Ohyanagi et al. 2006). Die beiden homologen Proteine LOC_Os11g32160 und At5g51020 aus den pflanzlichen Vertretern werden zusammen durch einen großen Split von allen anderen homologen Vertretern getrennt. Beide Landpflanzen haben sich aus einem anzestralen Vertreter der Chlorophyten entwickelt (Gould et al. 2008).

Tabelle 4-2: Aufstellung aller untersuchten eukaryoten homologen Proteine des Nukleomorph-kodierten Orf222 der Cryptophyte *G. theta* und ihre Einordnung in phylogenetische Gruppen.
PBS, Phycobiliproteine. Das Homolog aus *Paulinella chromatophora* stellt eine Ausnahme da, da das Gen auf dem Genom der Chromatophoren kodiert ist.

eukaryote Organismen		PBP	Homolog des Orf222	CpeT-artig	Slr1649 - artig	Genomischer Kontext
Paulinella chromatophora		PC	PCC_0629	--	(A)	*cpcF/cpcE/cpcA/cpcB/cpcC/**ppc_0629***
Guillardia theta		PE	Orf222	--	--	Kodierung auf eukaryotem Genom
Hemiselmis andersenii		PE	*cpeT-like protein*	--	--	
Cyanidioschyzon merolae		PC	CMK263C	--	--	
Oryza sativa		--	LOC_Os11g32160	--	--	
A. thaliana		--	AT5G51020	--	--	

Aufgrund des Fehlens von Phycobiliproteinen in Landpflanzen, welche als akzessorische Pigmente Chlorophylle, Carotenoide und Xanthophylle nutzen (Grossman et al. 1995), scheint es äußerst unwahrscheinlich, dass Orf222 homologe Proteine wie in Cyanobakterien Funktionen als Bilin Lyasen zur Generierung funktioneller Phycobiliproteine besitzen. Denkbar wäre eine putative Lyase Funktion für die ebenfalls

Bilin-tragenden Phytochrome. Diese Gruppe von Proteinen wurde einst als *red/far-red* photosensorische Rezeptoren von Pflanzen charakterisiert, ist allerdings auch in Algen, Bakterien und sogar Pilzen zu finden (Lamparter 2004, Rockwell et al. 2006). Phycobiliproteine und Phytochrome sind nur entfernt verwandt, besitzen allerdings sehr ähnliche Biline, die in der gleichen Weise an Apoproteine gebunden werden und mit diesen ähnliche Interaktionen aufweisen (Scheer und Zhao 2008). Allerdings konnte für Phytochrome bereits eine autokatalytische Bindung von Bilinen an das Apoprotein über eine Domäne innerhalb des Proteins beobachtet werden (Terry et al. 1993, Wu und Lagarias 2000).

Weitere Argumente gegen Funktionen als Lyasen liefert die Charakterisierung einer T-DNA Insertionsmutante des *orf*222 homologen Gens *at5g*51020 in *Arabidopsis*. Die Mutante wurde nach ihrem komplexen Phänotyp als „*CRUMPLED LEAF*“ bezeichnet und zeigt morphologische Veränderungen aller Pflanzenorgane sowie auffällig vergrößerte Plastiden bei wildtypischen Thylakoidstrukturen (Asano et al. 2004). Im N-terminalen Bereich des Proteins wird eine Membrandomäne vorhergesagt, welche sich weder bei dem homologen Proteinen photosynthetisch aktiver Protisten, noch bei cyanobakteriellen Homologen finden lässt. Durch verschiedene Ansätze konnte das Protein experimentell als Membranprotein bestätigt und seine Lokalisation in der äußeren Plastidenmembran demonstriert werden (Asano et al. 2004). Spekulationen über eine mögliche Funktion des *CRUMPLED LEAF* Proteins sind vielfältig. Sie reichen von Funktionen für den Export putativer Plastidensignale oder Metaboliten über eine Beteiligung des Proteins während der Synthese einer Komponente der Plastidenhüllmembranen bis hin zu einer Involvierung in den plastidären Import von nukleär kodierten Proteinen, welche für die plastidäre Teilung essentiell sind (Asano et al. 2004). Die exakte Funktion des Proteins muss also, im Gegensatz zu den cyanobakteriellen Homologen noch eruiert werden; eine Funktion als Bilin Lyase kann aber wahrscheinlich ausgeschlossen werden.

Die Proteine mit konservierter DUF1001 Domäne in Landpflanzen könnten folglich im Laufe der Evolution eine andere, paraloge Funktion wahrgenommen haben als ihre Homologen in Organismen mit Phycobiliproteinen. Diese Vermutung, dass die Proteine

funktionell eine konvergente Entwicklung durchlaufen haben, könnte eine Erklärung für ihre Position innerhalb des phylogenetischen Netzwerks sein.

Plastiden der Landpflanzen sind durch eine primäre Endosymbiose entstanden (Gould et al. 2008). Das dabei internalisierte anzestrale Cyanobakterium besaß möglicherweise zwei Lichtsammelkomplexe, sowohl LHCs (*light harvesting complex*) als auch Phycobilisomen (Tomitani et al. 2006). Anzestrale Chlorophyten, aus denen sich die heutigen Landpflanzen entwickelten, verloren jedoch die Phycobilisomen und damit theoretisch Proteine, die an Aufbau und Reifung beteiligt waren. Da kein homologes Protein in Chlorophyten, aber in höheren und niederen Landpflanzen identifiziert werden konnte, ist davon auszugehen, dass entweder die Chlorophyten die Proteine sekundär verloren haben, oder es zu einem Wiedererwerb in niederen Landpflanzen durch Gentransfer kam. Ein Verlust fand vielleicht vor einer sekundären Endosymbiose innerhalb der grünen Linie (Abb. 1-2) statt, da auf dem Nukleomorph Genom der Chlorarachniophyte *Bigelowiella natans* kein Homolog des Proteins Orf222 identifiziert werden konnte. Allerdings ist nicht auszuschließen, dass ein mögliches Homolog bereits einem genetischen Transfer in den Nukleus des Wirtes unterlag und somit noch nicht identifiziert werden konnte.

4.4.4 Das Homolog der Thecamöbe *Paulinella chromatophora*

Das homologe Protein der Thecamöbe *Paulinella chromatophora* stellt in einigen Aspekten einen Sonderfall dar. Es ist das erste homologe Protein aus einem eukaryoten Organismus, das nicht im Nukleus der Wirtszelle kodiert ist und somit noch keinem genetischen Transfer unterlag. Diese Entdeckung unterstützt die Annahme, dass es sich um eine junge primäre Endosymbiose zwischen der Thecamöbe als heterotrophe Wirtszelle und den internalisierten sogenannten Chromatophoren handelt (Marin et al. 2005), deren nächster freilebender Verwandter das Cyanobakterium *Synechococcus* WH5701 ist (Nowack et al. 2008). Durch die Kodierung des homologen Proteins auf dem kürzlich sequenzierten zirkulären Genom der Chromatophoren (Nowack et al. 2008) benötigt das Protein keine N-terminale Extension.

Das Homolog stellt anhand seiner Position innerhalb des Netzwerkes möglicherweise eine Schwestergruppe zu der Gruppe A der Slr1649-artigen Proteine dar. Da das kodierende Gen auf einem prokaryoten Genom kodiert ist (Nowack et al. 2008), kann hier auch der genetische Kontext analysiert und interpretiert werden (Tab. 4-2). Benachbarte Gene strangaufwärts sind ausnahmslos Gene kodierend für verschiedene Komponenten der Phycobilisomen und könnten das cpc-Operon repräsentieren. Das homologe Gen befindet sich am direkten 3'-Bereich dieser putativen Operon Struktur und hat somit seine Position im Vergleich zu homologen Genen der nächsten frei lebenden Verwandten, der *Synechococcus* Spezien verändert. Möglicherweise wird durch diese Positionsänderung innerhalb der Operon Struktur ein genetischer Transfer in den Kern des Wirtes erleichtert.

4.4.5 Orf222 Homologe in Rhodophyten und Cryptophyten

Zu den photosynthetisch aktiven Protisten, welche Orf222 homologe Proteine besitzen, konnten neben *Paulinella chromatophora* eine Rhodophyte und eine Cryptophyte ermittelt werden (Tab. 4-2). Die geringe Anzahl der Protisten lässt sich aufgrund fehlender Verfügbarkeit genetischer Information vieler Organismen vermuten, was eine Ermittlung weiterer eukaryoter Homologer erschwert. Allerdings sind weitere homologe Proteine in photosynthetisch aktiven, Phycobiliprotein-haltigen Organismen zu erwarten.

Das homologe Protein der durch primäre Endosymbiose entstandenen Rhodophyte *Cyanidioschyzon merolae* lässt sich im Rahmen der phylogenetischen Analyse wie auch die beiden Proteine der Cryptophyten *G. theta* und *H. andersenii* keiner der vier monophyletischen Gruppen zuordnen (Abb. 3-11). Die Positionen der homologen Proteine aus der Rhodophyte und den beiden Cryptophyten zueinander implizieren eine engere Verwandtschaft der Proteine und waren aufgrund des evolutionären Hintergrundes zu erwarten. Die Proteine werden als Präproteine mit N-terminalen Extensionen im Vergleich zu cyanobakteriellen Homologen synthetisiert. Die Entwicklung topogener Signale ist nach einem Gentransfer für einen Reimport des Proteins in sein Zielkompartiment essentiell (Cavalier-Smith 2006).

Plastiden der Rhodophyten und Cryptophyten zeichnen sich durch die Existenz von Phycobiliproteinen aus. So könnten die Orf222 homologen Proteine eine ähnliche Funktion besitzen wie ihre cyanobakteriellen Vertreter. Dies konnte durch die Analyse der Komplementationsmutante (siehe Kapitel 4.1) nachgewiesen werden, wo gezeigt wurde, dass das Nukleomorph-kodierte Protein Orf222 funktionell ortholog zu einer cyanobakteriellen Phycocyanin Bilin Lyase ist.

4.5 Das Nukleomorph von *Guillardia theta* – Zwischenstadium oder dauerhafte Existenz?

Nukleomorph Genome sind die kleinsten heute bekannten eukaryoten Genome (Douglas et al. 2001, Gilson et al. 2006, Lane et al. 2007). Im Zuge der Evolution entstanden sie durch die Reduktion der Nuklei eukaryoter Endosymbionten (Stoebe und Maier 2002, Hjorth et al. 2004). Ob eine bis heute andauernde Aufrechterhaltung des Nukleomorphs, in zwei voneinander unabhängigen entstandenen Linien, nur eine evolutionäre Zwischenstufe darstellt, oder ob es sich um eine Existenz von Dauer handelt, lässt sich nur schwer beantworten.

Als Grund für eine Aufrechterhaltung wird unter anderem die Kodierung von Plastidenproteinen angenommen, die an funktionellen Prozessen beteiligt sind, welche für die gesamte Zelle essentiell sind (Douglas et al. 2001, Archibald 2007). Durch die Identifikation Nukleomorph-kodierter Transportkomponenten für einen Proteinimport in die komplexe Plastide von *G. theta* (Sommer et al. 2007), konnte ein weiterer Grund für die Aufrechterhaltung des Nukleomorphs gefunden werden. Das Transportsystem ist an einem Reimport nukleär kodierter, periplastidär oder plastidär lokalisierter Proteine beteiligt (Sommer et al. 2007). Eine Eliminierung des Genoms kommt aufgrund dieser essentiellen Komponenten für Transport und plastidäre Funktionen erst nach einem genetischen Transfer sowie einem erfolgreichen Reimport der Proteine in die komplexe Plastide in Frage (Cavalier-Smith 2006). Bis heute ist keine plausible Begründung formuliert worden, warum bereits ein Teil des genetischen Materials einem Transfer aus dem Nukleomorph in den Nukleus der Wirtszelle unterlag, der andere Teil jedoch bis

heute nicht. Für einige Nukleus kodierte Gene wird eine direkte Abstammung von der ehemaligen Rhodophyte und damit ein genetischer Transfer von einem eukaryoten Genom zu einem anderen eukaryoten Genom postuliert (Deane et al. 2000, Stibitz et al. 2000, Gould et al. 2006a).

4.5.1 Nukleomorph-kodierte, plastidäre Proteine

Die Charakterisierung eines Nukleomorph-kodierten, plastidären Proteins der Cryptophyte *G. theta* war Ziel der vorliegenden Arbeit. Nach der Identifikation von 30 plastidären Proteinen im Zuge der Sequenzierung des Nukleomorph Genoms, konnten bereits 19 Proteinen aufgrund von Homologien zu charakterisierten Plastidenproteinen Funktionen zugeordnet werden (Douglas et al. 2001). Diese Proteine sind in vielfältigen plastidären Prozessen involviert, welche von einer Beteiligung am Proteintransport (Tic22), über die plastidäre Transkription und Translation (RpoD, Rps15) bis hin zur Photosynthese (Hlip, Hcf136, Rub) und Teilung der Plastiden (FtsZ) reichen. Interessanterweise konnte im Zuge der Sequenzierung des Nukleomorph Genoms der Cryptophyte *H. andersenii* eine identische Ausstattung mit plastidären Proteinen im Vergleich zu *G. theta* gezeigt werden (Lane et al. 2007). Anscheinend war diese Anzahl an plastidären Proteinen bereits im Nukleomorph des Vorläufers der Cryptophyten Linie kodiert, bevor es zur Divergenz der beiden Spezies *G. theta* und *H. andersenii* kam.

Die funktionelle Charakterisierung dieser plastidären Proteine stellt dient auch dem Verständnis der Aufgaben und Funktionen von Plastiden im Allgemeinen. Bis zum heutigen Datum konnte einem Teil der anfangs elf funktionell unbekannten Proteine (Douglas et al. 2001) eine genaue Funktion, oder zumindest eine Beteiligung innerhalb diverser plastidärer Prozesse zugeordnet werden. So wurde ein Homolog des Proteins Orf323 aus *G. theta* in der Chlorophyte *Chlamydomonas rheinhardtii* als *PsaB RNA binding protein* beschrieben und spielt möglicherweise eine Schlüsselrolle während der Translation der PS I Core-Komponente PsaB und der Assemblierung des PS I (Dauvillee et al. 2003). Weiterhin ergab die Analyse des Proteins Orf467, dass dieses ein essentieller Bestandteil des plastidär lokalisierten SUF-Systems ist (Hjorth et al. 2005), welches für Synthese und Erhaltung von Eisen-Schwefel Clustern zuständig ist. Der Nukleomorph-kodierten GTPase

Orf496 kann durch die Charakterisierung eines Homologs höchstwahrscheinlich eine Rolle für die Funktionalität von Ribosomen zugeschrieben werden (Bharat et al. 2006). Eine Beteiligung des zu Orf249 homologen Proteins aus *Arabidopsis* während Degradation und/ oder Synthese Schritten von beschädigtem D1 Protein (PsbA) wird durch die Analyse einer T-DNA Insertionsmutante vermutet (Sirpio et al. 2007).

Die im Rahmen dieser Arbeit vorliegende Charakterisierung des Nukleomorph-kodierten Proteins Orf222 als putative Phycoerythrin-Bilin Lyase trägt ihren Teil zu einem besseren Verständnis Nukleomorph-kodierter, plastidärer Proteine bei und liefert zusätzlich einen Teil zur Aufklärung der Biogenese von Phycobiliproteinen in Cryptophyten.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Nukleomorph Genom der Cryptophyte *G. theta* stellt ein Modell für nukleäre Kompaktierung dar und ist eines der kleinsten bekannten eukaryoten Genome. Seine 30 Gene für plastidäre Proteine werden als ein Grund für die derzeitige Erhaltung des Nukleomorphs angesehen. Die Charakterisierung der bislang funktionell unbekannten plastidären Proteine ist daher von höchstem Interesse. Im Rahmen dieser Arbeit konnte das auf Chromosom 1 des Nukleomorphs kodierte Protein Orf222 als funktionelles Ortholog einer spezifischen Bilin Lyase eines Cyanobakteriums charakterisiert werden. Auch konnte durch die Komplementation gezeigt werden, dass einzig ein fehlendes Bilin für den komplexen Phänotyp einer Insertionsmutante verantwortlich ist. Das cryptophytische Protein Orf222 fungiert im heterologen System des Cyanobakteriums *Synechocystis* als Lyase für die Ligation eines Phycocyanobilins an Position Cystein-155 der Phycocyanin β-Untereinheit. Im homologen System der Cryptophyte ist trotz der abweichenden Pigmentkomposition, deren Lokalisation und Organisation eine Lyase-Funktion zu postulieren. Dort kommt es demnach durch das Protein Orf222 zur Ligation eines Phycoerythrocyanins an die homologe Position Cystein-158 der Phycoerythrin β-Untereinheit. Das Protein Orf222, nunmehr als CpeT zu bezeichnen, zeigt durch die funktionelle Aktivität im heterologen System eine eindeutige Regioselektivität in Bezug auf die homologe Cystein-Bindestelle, aber deutlich weniger Spezifizierung auf das jeweilige Bilin und das Apoprotein. Dies ist charakteristisch für cyanobakterielle monomere T-Typ Lyasen, zu welchen das Protein nun gezählt werden kann. Phylogenetische Analysen zeigen eine engere Verwandtschaft des Proteins Orf222 mit homologen Proteinen aus anderen Cryptophyten und Rhodophyten als mit cyanobakteriellen oder pflanzlichen Vertretern. Die cyanobakteriellen Vertreter lassen sich in vier monophyletische Gruppen einteilen, welche mit einem spezifischen Biliprotein und dem genetischen Kontext des jeweiligen Gens in Korrelation steht.

Das Nukleomorph-kodierte CpeT (Orf222) Protein aus *G. theta* stellt die erste funktionell charakterisierte Bilin Lyase eines eukaryoten Organismus dar und leistet einen weiteren Beitrag zur Aufklärung Nukleomorph-kodierter Proteine.

6. MATERIAL

6.1 Chemikalien

Verwendete Chemikalien wurden überwiegend von den Firmen Roth (München), Sigma-Aldrich (München) und Merck (Darmstadt) bezogen. Eventuelle Abweichungen sind im Text kenntlich gemacht.

6.2 Puffer, Medien, Lösungen und Reagenzien

Die Herstellung erfolgte, soweit nicht anders angegeben, nach Sambrook et al. (Sambrook et al. 1989).

6.3 Geräte

6.3.1 Zentrifugen

Kühlzentrifuge Centrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge Micro22R	Hettich, Tettnang
Tischzentrifuge Centrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge mini Spin plus	Eppendorf, Hamburg
PicoFuge	Stratagene, Amsterdam
Sorvall RC-5B	Du Pont Instruments, Bad Homburg
Centrikon T-2060	Kontron Instruments, Groß-Zimmern

6.3.2 Inkubation

Thermomixer Comfort	Eppendorf, Hamburg
Thermocycler 60	Bachofer, Reutlingen
Schüttler GFL 3005	GFL, Großburgwedel
Schüttler SM25	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Percival Advanced Intellus Environmental Controller	CLF Plant Climatics, Emersacker
G24 Environmental Incubator Shaker	NewBrunwickScientific & Co Inc.
Taumel Rollenmischer	IDL, Nidderau

6.3.3 PCR Thermocycler

Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg
Mastercycler Personal	Eppendorf, Hamburg
Mastercycler Realplex	Eppendorf, Hamburg

6.3.4 Stromquellen

GBS 200/400	Amersham Pharmacia, München
ESP 301,601	Amersham Pharmacia, München

6.3.5 Sequenzierautomaten

ABI PRISM 377	Applied Biosystems, Foster City, USA
LiCOR 4200	MWG-Biotech

6.3.6 Elektrophorese-Zubehör

DNA-Elektrophoresekammer	LKB, Stockholm
GelDoc 1000	BioRAD, München
Transluminator	PeqLab, Erlangen
2050 Midget Electrophoresis Unit	LKB, Stockholm
Mighty SmallTM Dual Gel Caster SE245	LKB, Stockholm

6.3.7 Sonstige Gerätschaften

Blottingapparatur TE 77 semi-dry transfer unit	Amersham Pharmacia, Stockholm
Spektralphotometer Ultrospec III	GE Healthcare, München
Nanodrop Spectrophotometer ND100	PeqLab, Erlangen
Mikrotom Ultracut Reichert	Jung, Nussloch
Röntgenfilm Expositionskassetten	Appligene, Illkirch Graffenstaden
UV-Schirm Spectroline® M730 LonglifeTM Filter	Spectronics Corporation
Mikrowellengerät	Philips
Transmissionselektronenmikroskop EM301	Philips
Gradientenmischer Ismatec IPS 8	Heinemann Laborgeräte, Schwäbisch-Gmünd
French Press	

6.3.8 Filter und Membranen

FP 30/0.2 CA-S - 0.2µm Sterilfilter	Schleicher & Schuell BioSience, Dassel
Whatman 3MM	Schleicher & Schuell BioSience, Dassel
Hybond TM-P PDVF-Transfermembran	Amersham Pharmacia, München
Nitrocellulose Membran	Macherey-Nagel, Düren

6.3.9 Photomaterialien

Fuji-Medical-X-ray-Film, 30 x 40cm	Fuji Film, Düsseldorf
Röntgenfilm-Entwickler	Kodak, Stuttgart
Röntgenfilm-Fixierer	Kodak, Stuttgart

6.4 Hard- und Software

Im Rahmen dieser Arbeit gesammelte Daten wurden mit handelsüblichen Personal-Computern mit Standartsoftware verarbeitet. Die Verarbeitung von Sequenzier-Rohdaten (Korrekturlesen, Alignen, etc.) wurden mit dem Programm Sequencher (PC-Version 4.7) der Firma GeneCode (USA) durchgeführt. Häufig genutzte Links zu Internetanwendungen:

CyanoBase	http://bacteria.kazusa.or.jp/cyanobase/
NCBI Blast	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/cgi-bin/BLAST
Expasy	http://www.expasy.ch/
ChloroP	http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP
PSORT	http://www.psort.org/psortb/
TargetP	http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/
SOSUI	http://bp.nuap.nagoya-u.ac.jp/sosui/
TMHMM	http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM-2.0/
MUSCLE	http://www.drive5.com/
ClustalW	http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html
Neighbor-net	http://www.mcb.mcgill.ca/~bryant/NeighborNet
SplitsTree4	http://www.splitstree.org

6.5 molekularbiologische Kits

JETsorb DNA Extraction – Kit	Genomed, Löhne
pGEM-T® Vector-System – Kit	Promega, Mannheim
CloneJET™ PCR Cloning Kit	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
SuperSignal® West Pico Chemoluminescent Substrate – Kit	Pierce, Bonn
T4-DNA-Ligation – Kit	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Thermo-sequenase-fluorescent-labelled-primer-cycle-sequencing - Kit with 7-deaza-dGTP	Amersham Pharmacia, München
TransformAIDTM - Bacterial-Transformation – Kit	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Plasmid-Midi/Maxi-Kit	Quiagen, Hilden

6.6 Enzyme

DNAse I (10U/ml)	Sigma Aldrich, München
DNaseI I (10U/µl)	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
RNAse A (30mg/ml)	Sigma-Aldrich, München
Taq DNA Polymerase (5000U/ml)	Eppendorf, Hamburg
T4 DNA Ligase (1000U/ml) MBI	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
DNaseI I (10U/µl)	MBI-Fermentas, St. Leon-Rot
Ribonuclease Inhibitor (40U/µl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Restriktionsendonukleasen (10U/µl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Superscript II Reverse Transkriptase	Invitrogen, Karlsruhe
RevertAidTMM-MuLV Reverse Transkriptase (200U/µl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Ribonuclease Inhibitor (40U/µl)	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
CompleteTM Proteinase Inhibitor Mix	Roche, Mannheim
RNase-Out Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen, Karlsruhe

6.7 Längen- und Molekulargewicht-Standards

Längenstandards wurden generell von der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen und nach Herstellerangaben eingesetzt.

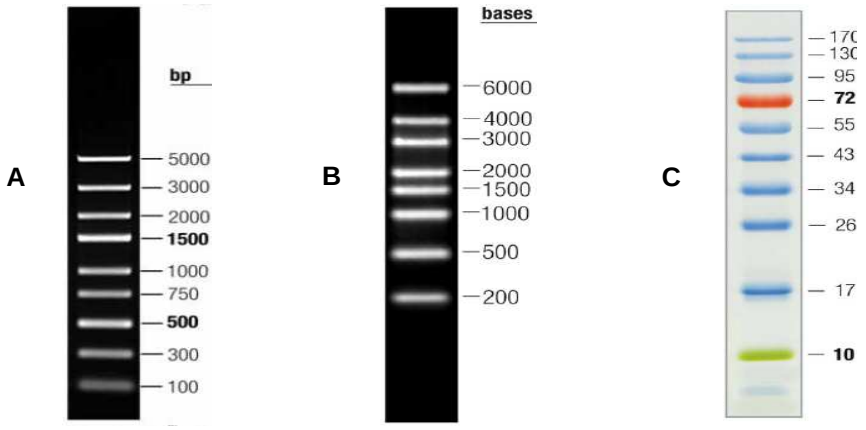

Abb. 6-1: Verwendete Längen- und Molekulargewichtsstandards. **A**, GeneRuler™ Express DNA Ladder. **B**, RiboRuler™ RNA Ladder High Range. C, PageRuler™ Prestained Protein Ladder. Alle MBI-Fermentas (St. Leon-Roth).

6.8 Oligonukleotide

Alle aufgeführten, von der Firma MWG (Ebersberg)hergestellten Oligonukleotide wurden in einer Konzentration von 5pmol/µl eingesetzt. Zur Herstellung von spezifischen Konstrukten wurden die Oligonukleotide nach Bedarf mit Schnittstellen für verschiedene Restriktionsenzyme entworfen.

Name	Sequenz	Schnittstelle	T_M
1649a_f	5'- GGT TAC TGC TCG AGG CGC ATC A -3'	XhoI	63,9°C
1649kompa1_r	5'- CAA TAA CTA CAT ATG TCC CAT TCC -3'	NdeI	57,8°C
222komp_r	5'- GTT AAA ATT AAA TGA ATT CTA ATA A -3'	EcoRI	48,2°C
1649kompa2_f	5'- TTT ATG TCG AAT TCC ACT GAT C -3'	EcoRI	54,6°C
1649b_r	5'- GAG ATT GGC CGC GGC AAT TTC TG -3'		64,2°C
orf222_seq_r	5'- CAA CTA TGG GGA TCA ACA TCT GG -3'		60,6°C
spec5`_r	5'- GGG GAC CTC TAG GGT CCC CA -3'		65,5°C
spec3`_r	5'- GGT CAT TCA AAA GGT CAT CCA CCG -3'		62,7°C
Spec5`_seq	5'- CCC AAT TTG TGT AGG GCT TAT TAT GC -3'		61,6°C

Name	Sequenz	Schnittstelle	T_M
Spec3`_seq	5'- CGA TCA CGG CAC GAT CAT CGT GCG -3'		67,8°C
1649_seq_r	5'- CGA TTT TAG CAA CCA GGC CC -3'		59,4°C
M13 universal	5'- TGT AAA ACG ACG GCC AGT -3'		
M13 reverse	5'-CAG GAA ACA GCT ATG ACC -3'		
Q 16S_5`	5'- GGT AAT ACG GAG GAT GCA AGC G -3'		62,1°C
Q 16S_3`	5'- GGA AGA ACA TCG GTG GCG AAA GC -3'		64,2°C
Q slr1649_5`	5'- CCT ACG ACT TTA TGT TGC AGA GG -3'		60,6°C
Q slr1649_3`	5'- GCA TGG CTG TGA CAT GAT TGT GG -3'		62,4°C
Q orf222_5`	5'- GGC GAT TGG AAT AAT TAT GAC C -3'		56,5°C
Q orf222_3`	5'- CCT ATG ATT ACA TGT TAG ATA AAC C -3'		56,4°C
Q orf222_for	5'- CCA TCA TTG TGG TCA CAC ATT CG -3'		60,6°C
Q orf222_rev	5'- GGA TCA AGA GAT TCT TCT TTG TTG C -3'		59,7°C
Q orf222_5`neu	5'- GGA TCA AGA GAT TCT TCT TTG TTG C -3'		59,7°C
Q orf222_3`neu	5'- CGA GCT GGG ATA TTG GTA GAA GC -3'		62,4°C
Q 18S Nm_5`	5'- GCT CTC AAT CTG TCA ATC CTC C -3'		60,3°C
Q 18S Nm_3`	5'- GCT GAT AGA GTC GTT TAT TTG G -3'		56,5°C

Primer, welche zur Sequenzierreaktion mit dem LiCOR 4200 verwendet wurden waren mit IRD800- (800 nm Kanal) bzw. IRD700-Farbstoff (700 nm Kanal) markiert.

6.9 Antikörper

Folgende mono- bzw. polyklonale Antikörper wurden im Laufe dieser Arbeit verwendet:

rabbit anti Slr1649	Eurogentec, Köln
rabbit anti Slr1470	Eurogentec, Köln
goat anti rabbit IgG, HRP gekoppelt	Rockland, Gilbertsville, USA

6.10 Vektoren

Folgende Vektoren wurden im Laufe dieser Arbeit verwendet:

pGEM-T Vektor; ampr, lacZ`, f1ori, PT7, PSP6	Promega, Mannheim
pBlueScript II KS Vektor; ampr, lacZ`, f1ori, pUCori, PT7, PT3	Stratagene, Amsterdam
pJET1.2 Vektor, ampr, f1ori, rep, PT7	MBI Fermentas, St. Leon-Rot

6.11 Bakterienstämme

E. coli XL1 Bl ue MRF' (mcrA)183 J(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac [F' proAB lacIqZJ15 Tn5 (Kanr)]	Stratagene, Amsterdam
E. coli DH5α, supE44 Lac U169 (?80 LacZM 15)hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1	

7. METHODEN

7.1 Kulturbedingungen der Cryptophyte *Guillardia theta*

Die Kultivierung erfolgte bei 15°C in f/2 - Meersalzmedium (tropic marin®) in einem 14h Tag-/10h Nacht -Rhythmus. Das Animpfen der Alge erfolgte durch wöchentliche Zugabe von 20ml Stammkultur zu 80ml sterilem f/2 - Medium. Mit den Vorkulturen wurde nach Erreichen einer ausreichenden Zelldichte 900ml f/2 - Medium angeimpft. Nach 14-tägiger Anzucht standen die Algen zur Verfügung. Zu autoklaviertem f/2 - Medium wurde f/2 - Spurenelementlösung sowie f/2 - Vitaminlösung (je 1:1000) zugegeben.

f/2 – Medium

Tris/HCl (pH 7,0)	5mM
$NaNO_3$	880µM
NaH_2PO_4	36µM
tropic marin® Meersalz	3% (w/v)

f/2 – Spurenelementlösung

$FeCl_3$	11,65mM
Na_2EDTA	11,71mM
$CuSO_4$	39µM
$ZnSO_4$	77µM
$CoCl_2$	42µM
$MnCl_2$	910µM
Na_2MoO_4	26µM

f/2 – Vitaminlösung

Biotin	2µM
Cyanocobalmin	0,37µM
Thiamin– HCl	297µM

7.2 Kulturbedingungen von *Synechocystis* sp. PCC6803

Synechocystis wurde in BG11 - Kulturmedium (Rippka 1988) bei 30°C und ca. 120 rpm bei Dauerlicht bzw. nach Bedarf in einem 14h Tag-/10h Nacht -Rhythmus mit einer Lichtintensität von 60µE unter atmosphärischem CO_2 kultiviert. Für die Stammhaltung wurden 100ml BG11 - Kulturmedium in 300ml Erlenmeyerkolben mit ca. 10ml einer zwei bis drei Wochen alten Kultur angeimpft. Für verschiedene Experimente variierte die Kolbengröße von 100ml bis 2 l. BG11 - Kulturmedium besteht aus mehreren sterilfiltrierten Stammlösungen, wobei die sterilen Stammlösungen erst nach dem Autoklavieren zugegeben wurden.

BG11 - Kulturmedium

10ml/l	100x B.G.-F.P.C. - Stammlösung
1ml/l	Na_2CO_3 - Stammlösung
1ml/l	K_2HPO_4 x $3H_2O$ - Stammlösung
1ml/l	TES (NaOH, pH 8,0) - Stammlösung
1ml/l	Fe(III)$(NH_4)_2$-Citrat–Stammlösung
1ml/l	Spurenelementlösung 1000x

Stammlösungen (steril filtriert)

Na_2CO_3	189mM
K_2HPO_4 x $3H_2O$	175mM
TES (NaOH, pH 8,0)	1M
Fe (III) $(NH_4)_2$ - Citrat	6mg/ml

100x B.G.-F.P.C. - Stammlösung (steril filtriert)

$CaCl_2$ x $2H_2O$	24,5mM
Citric acid x H_2O	3,12mM
$NaNO_3$	1,76mM
$MgSO_4$ x $7H_2O$	30,4mM
Na- EDTA (pH 8,0)	0,07mM

Spurenelementlösung 1000x, (steril filtriert)

$CuSO_4$ x $5\ H_2O$	0,32mM
$Co(NO_3)_2$ x $6H_2O$	0,17mM
H_3BO_3	46,3mM
$MnCl_2$ x $4H_2O$	4,15mM
$NaMoO_4$ x $2H_2O$	1,16mM
$ZnSO_4$ x $7H_2O$	0,77mM

7.3 Stamm- und Kulturhaltung von *Escherichia coli*

Der in dieser Arbeit verwendete *Escherichia coli* Stamm XL1blue MRF' der Firma Stratagene wurden nach Herstellerangaben bei 37°C in sterilem LB-Flüssigmedium (Sambrook et al. 1989) in der Regel über Nacht kultiviert. Die Stammhaltung der Kulturen erfolgte bei -80°C als 50% Glycerin/LB 1:1 Gemisch. Zur Herstellung von Agarplatten wurde dem Medium 2% (w/v) Agar-Agar hinzugesetzt. Selektionsmedien wurden durch Zugabe der angegebenen Mengen Antibiotika zum Medium hergestellt.

7.4 Netzwerk Konstruktion

Die zur Berechnung des Netzwerkes verwendeten Sequenzen wurden mit dem Programm MUSCLE und aligniert (Edgar 2004). Von diesem Alignment wurden mit dem Programm Splitstree4 Hamming-Distanzen berechnet (Huson und Bryant 2006), ein phylogenetisches Netzwerk berechnet (Bryant und Moulton 2004) und graphisch dargestellt.

7.5 Nukleinsäureanalytik

7.5.1 Isolation von Nukleinsäuren

7.5.1.1 Isolation von genomischer DNA aus *Guillardia theta*

G. theta gesamt - DNA wurde mittels der CTAB - Methode nach Doyle und Doyle (Doyle und Doyle 1990) isoliert. 1 Liter einer 14-tägigen Algenkultur wurden pelletiert (10min, 1000g, RT), in f/2 - Medium gewaschen und in 800µl 2% (w/v) CTAB in Puffer B resuspendiert. Nach einstündiger Inkubation bei 70°C wurden Zelldebris pelletiert (5min, 20000g, RT) und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Proteine wurden durch Zugabe von 1 Volumen PCI (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol; 25:24:1) ausgefällt. Durch Zentrifugation (10min, 20000g, RT) wurde eine Phasentrennung in eine organische und eine DNA-haltige, wässrige Phase bewirkt. Diese wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt (20min, 20000g, 4°C), mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20µl H_2Odd resuspendiert.

Puffer B	Tris/ HCl (pH 8,0)	100mM
	NaCl	1,4M
	Na2EDTA	20mM
	β - Mercaptoethanol	0,2% (v/v)

7.5.1.2 Isolation von DNA aus *Synechocystis* sp. PCC6803

DNA aus *Synechocystis* wurde einem modifizierten Protokoll von Ohad und Hirschberg isoliert (Ohad und Hirschberg 1992). Dazu wurden 4ml einer 14-tägigen Kultur von *Synechocystis* pelletiert (1min, 20000g, RT) und in 400µl TE - Puffer (pH 8,0) resuspendiert. Nach Zugabe von 200µg steriler Glasperlen (Ø 0,2mm), 8µl 10% SDS, 16µl 5% SLS sowie 400µl TE-gesättigtem Phenol wurden die Zellen durch dreimaliges vortexen (je 10s) aufgeschlossen. Glasperlen und Zelltrümmer wurden zusammen mit der organischen Phase pelletiert (10min, 15000g, RT) und der wässrige Überstand zweimal mit 1 Volumen PCI (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol; 25:24:1) gewaschen. Die Fällung der DNA erfolgte durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M NaAc (pH 7,0) und 2 Volumen absoluten Ethanol für 2h bei -20°C. Die DNA wurde pelletiert (20min, 20000g, 4°C) und anschließend mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20µl H_2Odd resuspendiert.

7.5.1.3 Isolation von RNA aus *Synechocystis* sp. PCC6803

Dazu wurden 100-200ml einer 14-tägigen Kultur pelletiert (10min, 7500rpm, 4°C), zur Zelllyse direkt in 2,5ml eiskalter Solution 1 vollständig resuspendiert und mit 2,5ml 65°C warmer Solution 2 vorsichtig gemischt. Anschließend erfolgte die Extraktion durch die Zugabe von 5ml 65°C heißem Phenol und 5-minütiger Inkubation bei 65°C. Die Proben wurden in flüssigem Stickstoff gekühlt und für 5min bei 4700rpm und 4°C zur Phasentrennung zentrifugiert. Die obere Phase wurde erneut mit 5ml 65°C heißem Phenol, anschließend mit 5ml PCI (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol; 25:24:1) und 5ml CI (Chloroform:Isoamylalkohol; 24:1) extrahiert. Der wässrige Überstand wurde anschließend 1/10 Volumen 3M NaAc (pH 4,5) und 2 Volumen absoluten Ethanol für 25min bei -20°C gefällt, mit 75% Ethanol gewaschen und getrocknet. Das Pellet wurde in 100-400µl RNase freiem Wasser gelöst und bei 4°C gelagert.

Solution 1	Saccharose	0.3M
	NaAc	0.01M pH 4.5, adjust pH with acetic acid
Solution 2	SDS	2%
	NaAc	0.01M pH 4.5, adjust pH with acetic acid

7.5.1.4 Isolation von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli*

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus *Escherichia coli* erfolgte nach dem Prinzip der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (Birnboim und Doly 1979).

1,5ml einer ü.N. *E.coli*-Kultur wurden bei 20800g abzentrifugiert, das Pellet in 150µl P1-Puffer resuspensiert. Die Bakterien wurden durch Behandlung mit 200µl P2-Puffer lysiert. Anschließend wurden Proteine, Zellbestandteile und chromosomale DNA nach Zugabe von 200µl P3-Puffer und 30µl Chloroform ausgefällt. Der größte Teil der chromosomalen DNA und Proteine wurden durch 20-minütige Zentrifugation bei 20800g pelletiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Plasmid-DNA wurde abschließend präzipitiert, gewaschen und in 50µl H_2Odd aufgenommen.

P1-Puffer	Tris/HCl, pH 8	50mM
	EDTA	10mM
	RNase A	100µg/ml
P2-Puffer	NaOH	200mM
	SDS	1% (w/v)
P3-Puffer	KAc, pH 5.1	2,8M

7.5.2 Präzipitation von Nukleinsäuren

Die Präzipitation von DNA aus wässrigen Lösungen erfolgte mit Isopropanol oder absolutem Ethanol in Gegenwart einwertiger Ionen durch Zentrifugation. Dazu wurde die DNA-Lösung mit 2/3 Vol. Isopropanol sowie mit 1/10 Vol. 3M NaAc, pH 4,8 versetzt. Durch anschließende Zentrifugation 30min bei 20000g, 4°C wurden die Nukleinsäuren gefällt. Das Salz wurde anschließend durch Waschen der DNA mit 1 Vol. 70% EtOH entfernt (5min Zentrifugation bei 20000g, 4°C), die DNA getrocknet und in einem entsprechenden Volumen H_2Odd aufgenommen. Zur Erhöhung der Fällungseffizienz wurde die DNA ggf. über Nacht bei -20°C gefällt.

7.5.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration von DNA- bzw. RNA-Lösungen wurde photometrisch mit einem Nanodrop Spectrophotometer ND-100 (PeqLab, Erlangen) bestimmt. Nukleinsäuren absorbieren spezifisch bei 260nm Wellenlänge, ihre Konzentration ist proportional zur Absorption und kann daher wie folgt berechnet werden (Sambrook et al. 1989):

DNA c [µg/ml] = OD_{260} x Verdünnungsfaktor x 50
RNA c [µg/ml] = OD_{260} x Verdünnungsfaktor x 40

Die Reinheit einer Nukleinsäure-Lösung wurde aus dem Quotienten von OD_{260} und OD_{280} bestimmt, da aromatische Aminosäuren bei 280nm Wellenlänge ihr Absorptionsmaximum zeigen. Werte von 1,8 bis 2 stehen für eine proteinfreie DNA-Lösung, Werte < 1,5 für eine stark verunreinigte Lösung.

7.5.4 DNaseI Behandlung von Nukleinsäuren

Um eventuelle DNA-Kontaminationen in RNA-Proben zu eliminieren, wurde 20µg RNA mit 20U DNaseI (RNase-frei, MBI Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt, 30min unter gelegentlichem Durchmischen bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die RNA mittels PCI (Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol; 25:24:1) extrahiert und mit absolutem Ethanol präzipitiert.

7.5.5 Amplifikation von Nukleinsäuren

7.5.5.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation von DNA-Fragmenten erfolgte mittels der Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al. 1985). Für die Reaktion wurden Enzyme und zugehörige Puffersysteme der Firma Eppendorf (Hamburg) verwendet. Die Wahl der Annealing-Temperatur, die Dauer der Elongationszeit sowie die einzusetzende Mg^{2+}-Konzentrationen wurden entsprechend der verwendeten Oligonukleotide, der eingesetzten DNA bzw. der erwarteten Amplifikatgröße gewählt. Pro Reaktion wurden ca. 50-100ng DNA eingesetzt. Die Annealing-Temperatur der Oligonukleotide wurde vom Hersteller (MWG, Ebersberg) vorgegeben.

7.5.5.2 Reverse Transkription (RT-PCR)

RNA-Moleküle können mit Hilfe einer reversen Transkriptase in complementaryDNA-Stränge (cDNA) umgeschrieben werden. Ausgehend von derart synthetisierten cDNA-Strängen können in einer nachfolgenden PCR-Reaktion bestimmte cDNA-Abschnitte amplifiziert und analysiert werden.

Zur reversen Transkription wurden 1-10µg RNA mit 5µg Oligohexameren (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) versetzt und zur Denaturierung 10min bei 70°C inkubiert. Nach 8-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte das Binden der Oligohexamere bei Raumtemperatur für mindestens 8 min. Anschließend wurde ein vorbereiteter RT-Mix bestehend aus 10mM DTT, 1mM ddNTP – Mix (MBI Fermentas, St. Leon-Rot), 1x RT-Puffer, 20U RNase-Inhibitor (Invitrogen, Karlsruhe) und 200U Superscript II (Invitrogen, Karlsruhe) zugegeben und der Ansatz für 120min bei 42°C, dann weitere 10min bei 70°C inkubiert und auf Eis gelagert. Kontrollreaktionen wurden parallel ohne Zugabe von Enzym durchgeführt.

7.5.6 Elektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

Die Größen- bzw. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte durch die Auftrennung mittels Agarose-Gelelektrophorese (Sambrook et al. 1989). Je nach erwarteter Größe wurde eine Agarosekonzentration von 0,8-2% (w/v) in 1x TBE Puffer gewählt. Der Gelmatrix wurden 3,75µg/ml Ethidiumbromid zur Visualisierung der Nukleinsäuren hinzugegeben. Die DNA wurde mit Hilfe von Probenpuffer im Verhältnis 1:10 aufgetragen; die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 10V/cm Elektrodenabstand. Zur Bestimmung Fragmentgrößen wurden die aufgeführten Längenstandards verwendet.

7.5.7 Elution niedermolekularer DNA aus Agarose

Die Aufreinigung elektrophoretisch aufgetrennter PCR-Produkte aus Agarose erfolgte mit dem JETsorb DNA Extraction-Kit der Firma Genomed (Löhne) nach Herstellerangaben.

7.5.8 Modifikation von Nukleinsäuren

7.5.8.1 Restriktion von DNA

Die Restriktion von DNA erfolgte mittels spezifisch gewählter Restriktionsendonukleasen (MBI Fermentas, St. Leon-Rot). Pro 1µg eingesetzte DNA wurde 1U Enzym mit einem geeigneten Restriktionspuffer verwendet. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C konnte die Restriktion durch eine Agarose-Gelelektrophorese analysiert werden.

7.5.8.2 Ligation von DNA

Die Ligation von PCR-Produkten bzw. von zuvor restringierten DNA-Fragmenten in geeignete Klonierungs- bzw. Expressionsvektoren entsprechend ihrem A-Überhang bzw. ihrer Restriktionsschnittstellen erfolgte entweder mit dem pGEM-T® Vector-System - Kit der Firma Promega (Mannheim), oder mit dem CloneJET™ PCR Cloning Kit der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot). Alternativ zu den beiden firmeneigenen Ligasen wurde auf das DNA-T4-Ligation-Kit der Firma MBI-Fermentas (St. Leon-Rot) zurückgegriffen. In allen Fällen wurden Ligationsreaktionen nach Angaben der Hersteller durchgeführt.

7.5.9 Transformation von *Escherichia coli*

7.5.9.1 Transformation von *Escherichia coli* XL1-blue MRF'

Die Transformation von *Escherichia coli* XL1-blue MRF' Zellen erfolgte mit dem TransformAid™ - Kit der Firma MBI Fermentas (St. Leon-Rot) nach Herstellerangaben. Pro Ansatz wurden ca. 50ng Plasmid-DNA eingesetzt.

7.5.9.2 Transformation von chemisch kompetenten *Escherichia coli* Zellen

Die Herstellung sowie die Transformation von chemisch kompetenten *Escherichia coli* Zellen erfolgte nach Sambrook et al. (Sambrook et al. 1989).

7.5.10 Transformation von *Synechocystis* sp. PCC6803

Für die Transformation von *Synechocystis* wurden 50ml Wildtypkultur mit einer OD_{750} = 0,3-0,5 durch Zentrifugation (5min, 5000g, RT) auf eine OD_{730} von 2,5 konzentriert. Zu je 1ml dieser Kultur wurden 10µg Plasmid - DNA in zirkulärer Form bzw. durch Restriktion linearisierter Form gegeben und für 5h bei 30°C unter geringem Lichteinfall und gelegentlichem Mischen inkubiert. Die Transformationsansätze wurden in 200µl Aliquots auf nicht selektiven Bg11 - Platten ausplattiert und bei 30°C mit reduzierter Lichtintensität mehrere Tage kultiviert, bis ein gleichmäßig grüner Bakterienrasen vorlag. Die Selektion der putativen Transformanten erfolgte durch Überschichten des Bakterienrasens mit Antibiotika (5µg/ml) - haltigem Topagar und weiterer Kultivierung bei 30°C für ca. 14 Tage. Kolonien, die trotz Selektion weiter wuchsen wurden in 50ml BG11 - Flüssigmedium mit entsprechenden Antibiotika - Konzentration vereinzelt und bei 30°C für weitere zwei bis drei Wochen kultiviert. Bei erfolgreichem Anwuchs wurde die Antibiotika-Konzentration graduell beim Überimpfen gesteigert.

7.5.11 Sequenzanalysen von Nukleinsäuren

Die Sequenzanalysen wurden nach Sanger et al. (Sanger et al. 1977) durchgeführt.

7.5.11.1 Das LiCOR System

Für den LiCOR Sequenzierautomaten (MWG) wurden fluoreszenzgelabelte Oligonukleotide unter Verwendung des Thermo-sequenase-fluorescent-labelled-primer-cycle-sequencing - Kit der Firma Amersham Pharmacia (München) verwendet. Pro 1000Bp zu sequenzierender DNA wurde 1µg DNA eingesetzt, mit H_2Odd auf 11µl verdünnt und mit 1µl Primer-Mix versehen. Je 3µl dieses Ansatzes wurden in Reaktionsgefäße verteilt, in denen je 1µl der einzelnen Nukleotid-spezifischen Terminationslösungen vorgelegt waren. Die elektrophoretische Auftrennung der einzelnen Proben erfolgte mit dem Sequenzierautomaten LI-COR 4200. Die Reaktionslösungen wurden mit Öl überschichtet und 25 Zyklen aufeinander folgender Denaturierungs- (30s), Annealings- (30s) und Extensionsphasen (30s) unterzogen. Nach der Sequenzierreaktion erfolgte die Zugabe von 2µl Ladepuffer (Amersham Pharmacia, München). Jeweils 1 µl pro Reaktion wurde auf ein

0,2mm starkes Polyacrylamidgel aufgetragen und bei 3000V (30mA, 45°C, 1x TBE long run) elektrophoretisch aufgetrennt. Das Korrekturlesen sowie weitere Auswertungen der Daten erfolgte mit dem Programm Sequencher (Version 4.7) der Firma GeneCode (USA).

Gelmatrix	Harnstoff	51% (w/v)
	TBE	0.75% (w/v)
	Rapid Gel XL 40%	0,875% (w/v)
	H_2Odd	4,5% (w/v)

7.5.11.2 Das ABI-System

Für eine Sequenzanalyse mit Hilfe des ABI 377 Sequenzierautomaten (Applied Biosystems, Foster City, USA) wurden 1µg DNA mit 1µl spezifischem Primer (5pmol/µl), 2µl ABI-Sequenziermix (DYEnamic ET terminator Cycle Sequencing Kit, Amersham Pharmacia, München) versetzt und auf 10µl mit H_2Odd aufgefüllt. Nach 30 Zyklen aufeinander folgender Denaturierungs- (15s), Annealings- (30s) und Extensionsphasen (30s) wurden die Sequenzierprodukte wie folgt aufbereitet. Zur Entfernung überschüssiger Terminatoren wurden die Reaktionen mit 8µl H_2Odd und 80µl absolutem EtOH versehen. Das Fällen erfolgte durch 20-minütige Inkubation bei RT mit anschließender Zentrifugation bei 14000g, 4°C für 30min. Nach abschließendem Waschen mit 70% EtOH wurden die Produkte in 3µl Formamide Loading Dye (Amersham Pharmacia, München) aufgenommen werden. Die Analyse der Sequenzierprodukte erfolgte auf einem 0,2mm starken Polyacrylamidgel mit dem Sequenzierautomaten ABI 377. Das Korrekturlesen sowie weitere Auswertungen der Daten erfolgte mit dem Programm Sequencher (Version 4.7) der Firma GeneCode der Firma GeneCode (USA).

7.6 Proteinanalytik

7.6.1 Herstellung von *Synechocystis* Proteinextrakt

Zur Herstellung von homogenem *Synechocystis* Proteinextrakt wurden Kolben mit entsprechenden Mengen an Kultur bei 7500g für 10min bei Raumtemperatur geerntet und anschließend 1x in BG11 Medium gewaschen. Danach wurden die Zellen in max. 6ml BG11 Medium oder einem den jeweiligen Versuchbedingungen entsprechenden Puffer resuspendiert. Zur Inhibierung von zelleigenen Proteasen wurde ein CompleteTM Proteinase Inhibitor Mix (Roche, Mannheim) oder ein Protease-Inhibitor Cocktail (PIC) hinzugefügt, letzterer im Verhältnis 1:200. Der Zellaufschluss erfolgte durch zwei bis drei Passagen mit einer French Press bei 1000Psi. Anschließend wurden nicht aufgeschlossene Zellen bzw. Zelltrümmer durch einen Zentrifugationsschritt (500g, 5min, 4°C) entfernt. Der Überstand wurde entsprechend den weiteren Experimenten behandelt.

PIC (Proteinase Inhibitor Cocktail):
200µg/ml Antipain
200µg/ml Chymostatin
200µg/ml Aprotinin
200µg/ml Trypsin - Inhibitor
200µg/ml Na_2 - EDTA
200µg/ml Pepstatin A
200µg/ml Leupeptin
200µg/ml Elastatinal

7.6.2 Aufkonzentrierung von Proteinen

Zur Verringerung des Probenvolumens bzw. zur Entfernung störender Substanzen wurden Proteinlösungen mit TCA/Aceton/DTT oder alternativ mittels Chloroform-Methanol ausgefällt.

7.6.2.1 TCA-Fällung

Proteinlösungen wurden mit 70% TCA in Aceton versetzt (Endkonzentration 15% TCA). Nach einer 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden die ausgefällten Proteine pelletiert (10min, 10000g, 4°C) und mit 1ml eiskaltem Aceton/20mM DTT mehrmals gewaschen. Das

finale Pellet wurde getrocknet und in einem entsprechendem Volumen geeignetem Puffer oder H_2Odd aufgenommen.

7.6.2.2 Chloroform-Methanol-Fällung

Hierbei wurden Proteinlösungen mit einem 4fachen Volumen Methanol, einem 2-fachen Volumen und einem 2,3-fachen Volumen H_2Odd versetzt, 1min mittels Vortexer gemischt und anschließend bei 20000g für 1min zentrifugiert. Die ausgefällten Proteine setzen sich an der Phasengrenze ab. Nach Abnahme des Überstandes wurde die restliche Lösung erneut mit einem zweifachen Volumen Methanol versetzt, erneut gemischt und für 2min bei 20000g zentrifugiert. Der resultierende Überstand wurde abgenommen, das Pellet getrocknet und in einem geeignetem Volumen und entsprechendem Puffer aufgenommen.

7.6.3 Quantitative Proteinbestimmung

Die Konzentration von Proteinlösungen wurde photometrisch mit dem Ultrospec. 2000 der Firma Pharmacia Biotech (München) in Einmalküvetten (1ml-Fassungsvermögen) bestimmt. Dazu wurde mit Hilfe von definierten Lösungen eine Eichgerade erstellt. Die quantitative Proteinbestimmung wurde mit Hilfe einer Amidoschwarzlösung durchgeführt. Dazu wurden 5µl Proteinlösung mit H_2Od auf 100µl aufgefüllt und mit 400µl Amidoschwarzlösung versetzt. Nach anschließendem Mischen, 15min Zentrifugation bei 20000g, 4°C wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 1ml Waschlösung resuspendiert. Abschließend wurde 15min bei 20000g, 4°C zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet nach kurzem Trocknen in 1ml 200mM NaOH aufgenommen. Die photometrische Bestimmung erfolgte bei einer Wellenlänge von 615nm. Mittels zuvor angefertigter Eichgerade konnte die Probenkonzentration bestimmt werden.

Amidoschwarzlösung	Methanol	90% (v/v)
	Eisessig	10% (v/v)
	Amidoschwarz 10B	0,01% (w/v)
Waschlösung	Methanol	90% (v/v)
	Eisessig	10% (v/v)

7.6.4 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels denaturierender Polyacrylamid-Gelelektrophorese nach Laemmli (Laemmli 1970). Die Polyacrylamidkonzentration im Trenngel wurde abhängig der erwarteten Größen der aufzutrennenden Proteine in einem Bereich von 8-15% (w/v) gewählt. Dazu wurde ein fertiges Gemisch aus Acrylamid und Methylenbisacrylamid der Firma Roth (München) verwendet. Die Auftrennung der Proben erfolgte mit 2050 *Midget Electrophoresis Units* (HoeferScientific Instruments) in 1x SDS-Laufpuffer bei einer Stromstärke von 15–25mA. Vor dem Auftragen wurden die Proben mit einem dem jeweiligen Gelsystem entsprechenden Probenpuffer versetzt und für 10min bei 96°C denaturiert. Nichtlösliche Bestandteile wurden vor dem Auftragen abzentrifugiert (5min, 20000g, 4°C). Zur Größenbestimmung wurde der Protein-Molekulargewichtsstandard (MBI Fermentas, St. Leon-Rot) aufgetragen. Um Proteinkomplexe, deren Untereinheiten in Bezug auf die molekulare Masse variieren, genügend auftrennen zu können, wurden Gradientengele mit variabler Acrylamidkonzentration gewählt. Standardmäßig wurde ein Gradient von 10% (v/v) bis 15% (v/v) verwendet, der mittels eines Gradientenmischers hergestellt wurde.

Sammelgelpuffer, 4x	Tris/ HCl, pH 6,8	500mM
	SDS	0,4% (w/v)
Trenngelpuffer, 4x	Tris/ HCl, pH 8,8	1.5M
	SDS	0,4% (w/v)
SDS-Laufpuffer, 10x	Tris	250mM
	Glycin	2M
	SDS	1% (w/v)

SDS-Probenpuffer, 2x	Glycerin	20% (v/v)
	Sammelgelpuffer	25% (v/v)
	Bromphenolblau	25µg/ml
	H_2Odd	30% (v/v)
	SDS	2% (w/v)
	2-Mercaptoethanol	

Zur besseren Auftrennung von Proteinen kleiner als 15kDa, wurde das Tris-Tricine Gelsystem von Schägger und von Jagow (Schagger und von Jagow 1987) verwendet. Der Acrylamidgehalt des Trenngels richtete sich analog der Tris-Glycerin Gele nach der erforderlichen Trennleistung. Je nach Anforderung wurden in beiden Gel-Systemen

Gradientengele unterschiedlicher Acrylamid-Konzentration angefertigt. Diese wurden bei einer max. Spannung von 250V gefahren.

Tricine Gelpuffer, 3x	Tris-HCl, pH 8,45	3M
	SDS	0,3% (w/v)
	optional Glycerin (für Trenngele)	20% (w/v)
Tricine Kathoden-Puffer, 10x	Tris-HCl, pH 8,25	1M
	Tricin	1M
	SDS	1% (w/v)
Tricine Anoden-Puffer, 10x	Tris-HCl, pH 8,9	2M
Tricin-Ladepuffer, 2x	Tris-HCl, pH 7,0	150mM
	Coomassie blue G-250	0,05% (w/v)
	Glycerin	30% (v/v)
	SDS	12% (w/v)
	2-Mercaptoethanol	6% (v/v)

7.6.5 Nachweis und Quantifizierung

7.6.5.1 Kollodiale Coomassie-Färbung

Die Proteinbanden in Polyacrylamidgelen wurden mit kolloidaler Coomaissie-Färbelösung nachgewiesen. Dazu wurden die Gele nach elektrophoretischer Auftrennung kurz mit H_2Odd gewaschen und anschließend über Nacht in Coomaissie-Färbelösung geschwenkt. Der Hintergrund wurde nach Erreichen der gewünschten Farbintensität durch mehrmaliges Waschen H_2Odd entfärbt.

Coomassie-Färbelösung	Methanol	20% (v/v)
	Solution A	80% (v/v)
	Coomassie blue G-250	5% (w/v)
Solution A	σ-Phosphorsäure	2% (v/v)
	Ammoniumsulfat	10% (w/v)

7.6.5.2 $ZnSO_4$-Färbung

Zur Visualisierung und zum Nachweis chromophorer Gruppen wurden Polyacrylamidgele direkt nach dem Gellauf mit H_2Odd gewaschen und anschließend 30s in 200mM $ZnSO_4$-Lösung inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit H_2Odd erfolgte die Visualisierung mittels UV-Licht mit Hilfe eines Transluminators (PeqLab, Erlangen).

7.6.6 Immobilisierung und Immundetektion von Proteinen

Die Proteinbanden im Polyacrylamidgel wurden mit kolloidaler Coomaissie-Färbelösung (Roti®-Blue, Roth, München) nachgewiesen. Dazu wurden die Gele nach elektrophoretischer Auftrennung kurz mit H_2Odd gewaschen und anschließend über Nacht in Coomaissie-Färbelösung geschwenkt. Der Hintergrund wurde nach Erreichen der gewünschten Farbintensität durch mehrmaliges Waschen mit 50ml Coomaissie-Waschlösung entfärbt.

7.6.7 Semidry Westernblot

Um Proteine mittels spezifischer Antikörper nachzuweisen, wurden diese zuvor durch den Transfer auf *PDVF-transfer* Membranen (Amersham Biosciences) oder alternativ auf Nitrocellulose Membranen (Macherey-Nagel, Düren) immobilisiert. Dazu wurden Membran, Gel und Whatman-Papiere in Transferpuffer äquilibriert und der *semidry* Westernblot in der Blottingapparatur TE 77 *semi-dry transfer unit* aufgebaut. Der Transfer der Proteine erfolgte 1 h bei einer konstanten Spannung von 50V bei 0,8 mA/cm² Membran.

Transferpuffer	Tris	25mM
	Glycin	20mM
	Methanol	20% (v/v)

7.6.8 Immundetektion von Proteinen

Immobilisierte Proteine können durch eine Immunreaktion eines Erstantikörpers mit einem gegen ihn gerichteten Zweitantikörper detektiert werden. Dabei macht man sich die enzymatische Aktivität der *horseradish peroxidase* des Zweitantikörpers zunutze, welche durch Chemolumineszenz nachweisbar ist.

Nach Immobilisierung der Proteine wurde die Membran, um freie Bindungsstellen abzusättigen, 1h in Blocking-Reagenz geschwenkt. Anschließend folgte eine einstündige Inkubation mit dem Erstantikörper, der spezifisch verdünnt wurde. Überschüssiger Antikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit TBS-T von der Membran entfernt. Analog wurde mit dem Zweitantikörper verfahren, welcher in einer Verdünnung von 1:25000 eingesetzt wurde. Nach erneutem Waschen und anschließender 5-minütiger Inkubation in TBS erfolgte der Nachweis mit dem *Enhanced Chemolumineszenz* – Kit (Pierce, Bonn) nach Herstellerangaben.

Blocking-Reagenz	Magermilchpulver in TBS-T	7% (w/v)
TBS	Tris/HCl, pH 7.5	100mM
	NaCl	0,9% (w/v)
TBS-T	Tween20 in TBS	0,1% (v/v)

7.6.9 Isolation intakter Phycobilisomen aus *Synechocystis*

Zur Isolation wurden 1L Kultur geerntet (10min, 7500rpm, RT), in 0.75M Kalium-Phosphat-Puffer (KPP), pH 7,0 resuspendiert und anschließend nach Zugabe eines Protease Inhibitor Cocktails (Roche, Mannheim) durch zweimaligem Durchgang in einer French Press bei 1000Psi aufgeschlossen. Nicht aufgeschlossenen Zellen und Zelltrümmer wurden bei 500g für 5min bei RT pelletiert. Nach 20-minütiger Inkubation mit Triton-X-100 (Endkonzentration 2%) und anschließender Zentrifugation (10min, 20000g, RT) wurde der Überstand auf einen 10-40% kontinuierlichen Saccharose-Gradienten in KPP geladen. Nach einer Zentrifugation für 17h bei 18°C und 17000rpm konnte eine Bande intakter Phycobilisomen für weitere Analysen verwendet werden.

7.6.10 Proteolytische Experimente

Proteolytische Assays wurden durch die Behandlung von Proteinen mit Ameisensäure durchgeführt. Dazu wurden präzipitierte Proteine in 100% Ameisensäure resupendiert und die Lösung mit H_2Odd auf 70% Endkonzentration Ameisensäure eingestellt. Nach einer Inkubation über Nacht bei 37°C wurden die Ansätze bei 50°C getrocknet, das resultierende Pellet mehrmals in Aceton gewaschen, getrocknet und in einem geeigneten Volumen 20%iger SDS-Lösung aufgenommen.

7.6.11 Negativ-Staining isolierter intakter Phycobilisomen

Zur Darstellung der Struktur einzelner intakter Phycobilisomen wurden diese nach Kap.7.6.9 isoliert und direkt für transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen präpariert. Dazu wurden die abgenommenen Phycobilisomenlösungen mit einer 10%igen Saccharoselösung in 0,75M KPP auf eine OD_{620} = 0,3 verdünnt. Es erfolgte ein halb- bis einstündige Fixierung mit 0,2% Glutaraldehyd unter leichtem bewegen. Die fixierten Phycobilisomen wurden auf Kupfernetze (400 *mash grids*) gebracht, zweimal mit H_2Odd gewaschen und in 2% Uranylacetat für 2min kontrastiert. Nach Trocknung der Kupfernetze erfolgte direkt eine Betrachtung mittels Elektronenmikroskop (Philips).

7.6.12 Pigmentanalysen

7.6.12.1 Konzentrationsbestimmung von Chlorophyll

Die Konzentrationsbestimmung von Chlorophyll a erfolgte nach Mackinney (Mackinney 1941). Dazu wurde 10ml der Zellkultur durch Zentrifugation geerntet (3min, 14000rpm, RT) und in 1ml 99% Methanol resuspendiert und für 30min auf Eis im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Zelltrümmer entfernt (1min, 14000rpm, RT) und der klare Chlorophyll a - haltige Überstand für die photometrische Messung bei einer Wellenlänge von 665nm verwendet. Die Chlorophyll a - Konzentration wurde nach folgender Gleichung:

$$\text{Chlorophyll a (mg/ml Kultur)} = [OD_{665} * (V_{Probe} + V_{Methanol})] / (74{,}5 * V_{Probe})$$

7.6.12.2 Konzentrationsbestimmung von Phycocyanin

Der Phycocyanin-Gehalt wurde in Anlehnung an die Methode von Grossman durchgeführt (Grossman et al. 1993). Dazu wurden 10ml Zellsuspension für 10min bei 75°C inkubiert. Danach erfolgte die Absorptionsbestimmung bei 620nm und 750nm mit Hilfe folgender Gleichung:

$$\text{Phycocyanin (mg/ml)} = (A_{620} - A_{750}\ \text{(nicht erhitzt)}) - (A_{620} - A_{750}\ \text{(erhitzt)})$$

8. LITERATUR

Adir N. 2005. Elucidation of the molecular structures of components of the phycobilisome: reconstructing a giant. *Photosynth Res,* 85: 15-32.

Anderson LK, Rayner MC & Eiserling FA. 1987. Mutations that affect structure and assembly of light-harvesting proteins in the cyanobacterium Synechocystis sp. strain 6701. *J Bacteriol,* 169: 102-9.

Anderson LK & Toole CM. 1998. A model for early events in the assembly pathway of cyanobacterial phycobilisomes. *Mol Microbiol,* 30: 467-74.

Apt KE, Zaslavkaia L, Lippmeier JC, Lang M, Kilian O, Wetherbee R, Grossman AR & Kroth PG. 2002. In vivo characterization of diatom multipartite plastid targeting signals. *J Cell Sci,* 115: 4061-9.

Archibald JM. 2007. Nucleomorph genomes: structure, function, origin and evolution. *Bioessays,* 29: 392-402.

Arciero DM, Bryant DA & Glazer AN. 1988. In vitro attachment of bilins to apophycocyanin. I. Specific covalent adduct formation at cysteinyl residues involved in phycocyanobilin binding in C-phycocyanin. *J Biol Chem,* 263: 18343-9.

Armbrust EV, Berges JA, Bowler C, Green BR, Martinez D, Putnam NH, Zhou S, Allen AE, Apt KE, Bechner M, Brzezinski MA, Chaal BK, Chiovitti A, Davis AK, Demarest MS, Detter JC, Glavina T, Goodstein D, Hadi MZ, Hellsten U, Hildebrand M, Jenkins BD, Jurka J, Kapitonov VV, Kroger N, Lau WW, Lane TW, Larimer FW, Lippmeier JC, Lucas S, Medina M, Montsant A, Obornik M, Parker MS, Palenik B, Pazour GJ, Richardson PM, Rynearson TA, Saito MA, Schwartz DC, Thamatrakoln K, Valentin K, Vardi A, Wilkerson FP & Rokhsar DS. 2004. The genome of the diatom Thalassiosira pseudonana: ecology, evolution, and metabolism. *Science,* 306: 79-86.

Asano T, Yoshioka Y, Kurei S, Sakamoto W & Machida Y. 2004. A mutation of the CRUMPLED LEAF gene that encodes a protein localized in the outer envelope membrane of plastids affects the pattern of cell division, cell differentiation, and plastid division in Arabidopsis. *Plant J,* 38: 448-59.

Beuhler RJ, Pierce RC, Friedman L & Siegelman HW. 1976. Cleavage of phycocyanobilin from C-phycocyanin. Separation and mass spectral identification of the products. *J Biol Chem,* 251: 2405-11.

Bharat A, Jiang M, Sullivan SM, Maddock JR & Brown ED. 2006. Cooperative and critical roles for both G domains in the GTPase activity and cellular function of ribosome-associated Escherichia coli EngA. *J Bacteriol,* 188: 7992-6.

Birnboim HC & Doly J. 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res,* 7: 1513-23.

Böhm S, Endres S, Scheer H & Zhao KH. 2007. Biliprotein chromophore attachment: chaperone-like function of the PecE subunit of alpha-phycoerythrocyanin lyase. *J Biol Chem,* 282: 25357-66.

Bolte K, Kawach O, Prechtl J, Gruenheit N, Nyalwidhe J & Maier UG. 2008. Complementation of a phycocyanin-bilin lyase from Synechocystis sp. PCC 6803 with a nucleomorph-encoded open reading frame from the cryptophyte Guillardia theta. *BMC Plant Biol,* 8: 56.

Bolte K, Bullmann L, Hempel F, Bozarth A, Zauner S & Maier UG. 2009. Protein Targeting into Secondary Plastids. *J Eukaryot Microbiol. In Press.*

Bolter B, Soll J, Schulz A, Hinnah S & Wagner R. 1998. Origin of a chloroplast protein importer. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 95: 15831-6.

Broughton MJ, Howe CJ & Hiller RG. 2006. Distinctive organization of genes for light-harvesting proteins in the cryptophyte alga Rhodomonas. *Gene,* 369: 72-9.

Bryant D & Moulton V. 2004. Neighbor-net: an agglomerative method for the construction of phylogenetic networks. *Mol Biol Evol,* 21: 255-65.

Cavalier-Smith T. 1999. Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. *J Eukaryot Microbiol,* 46: 347-66.

Cavalier-Smith T. 2000. Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci,* 5: 174-82.

Cavalier-Smith T. 2001. Obcells as proto-organisms: membrane heredity, lithophosphorylation, and the origins of the genetic code, the first cells, and photosynthesis. *J Mol Evol,* 53: 555-95.

Cavalier-Smith T. 2002a. Chloroplast evolution: secondary symbiogenesis and multiple losses. *Curr Biol,* 12: R62-4.

Cavalier-Smith T. 2002b. Nucleomorphs: enslaved algal nuclei. *Curr Opin Microbiol,* 5: 612-9.

Cavalier-Smith T. 2003. Genomic reduction and evolution of novel genetic membranes and protein-targeting machinery in eukaryote-eukaryote chimaeras (meta-algae). *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci,* 358: 109-33; discussion 133-4.

Cavalier-Smith T. 2006. The tiny enslaved genome of a rhizarian alga. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 103: 9379-80.

Chen F & Lu J. 2002. Genomic sequence and evolution of marine cyanophage P60: a new insight on lytic and lysogenic phages. *Appl Environ Microbiol,* 68: 2589-94.

Chun EHL, Vaughn MH & Rich A. 1963. The isolation and characterization of DNA associated with chloroplast preparations. *J Mol Biol,* 7.

Clokie MR, Shan J, Bailey S, Jia Y, Krisch HM, West S & Mann NH. 2006. Transcription of a 'photosynthetic' T4-type phage during infection of a marine cyanobacterium. *Environ Microbiol,* 8: 827-35.

Crespi HL & Smith UH. 1970. The chromophore-protein bonds in phycocyanin. *Phytochemistry,* 9: 205.

Dammeyer T & Frankenberg-Dinkel N. 2008. Function and distribution of bilin biosynthesis enzymes in photosynthetic organisms. *Photochem Photobiol Sci,* 7: 1121-30.

Dauvillee D, Stampacchia O, Girard-Bascou J & Rochaix JD. 2003. Tab2 is a novel conserved RNA binding protein required for translation of the chloroplast psaB mRNA. *EMBO J,* 22: 6378-88.

de Lorimier R, Bryant DA & Stevens SE, Jr. 1990a. Genetic analysis of a 9 kDa phycocyanin-associated linker polypeptide. *Biochim Biophys Acta,* 1019: 29-41.

de Lorimier R, Guglielmi G, Bryant DA & Stevens SE, Jr. 1990b. Structure and mutation of a gene encoding a Mr 33,000 phycocyanin-associated linker polypeptide. *Arch Microbiol,* 153: 541-9.

de Marsac NT & Cohen-Bazire G. 1977. Molecular composition of cyanobacterial phycobilisomes. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 74: 1635-9.

Deane JA, Fraunholz M, Su V, Maier UG, Martin W, Durnford DG & McFadden GI. 2000. Evidence for nucleomorph to host nucleus gene transfer: light-harvesting complex proteins from cryptomonads and chlorarachniophytes. *Protist,* 151: 239-52.

Delwiche CF & Palmer JD. 1997. The origin of plastids and their spread via secondary symbiosis. *In*: Bhattacharya, D (ed.) Origins of the algae and their plastids. Springer, Wien. 53-86.

DiMagno L & Haselkorn R. 1993. Isolation and characterization of the genes encoding allophycocyanin subunits and two linker proteins from Synechocystis 6714. *Plant Mol Biol,* 21: 835-45.

Dodge JD. 1969. The ultrastructure of Chroomonas mesostigmatica Butcher (Cryptophyceae). *Arch. Mikrobiol.,* 69: 266-80.

Douglas S, Zauner S, Fraunholz M, Beaton M, Penny S, Deng LT, Wu X, Reith M, Cavalier-Smith T & Maier UG. 2001. The highly reduced genome of an enslaved algal nucleus. *Nature,* 410: 1091-6.

Douglas SE & Penny SL. 1999. The plastid genome of the cryptophyte alga, Guillardia theta : complete sequence and conserved synteny groups confirm its common ancestry with red algae. *J Mol Evol,* 48: 236-244.

Doyle JJ & Doyle JL. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus,* 12: 13-15.

Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res,* 32: 1792-7.

Edwards MR & Gantt E. 1971. Phycobilisomes of the thermophilic blue-green alga Synechococcus lividus. *J Cell Biol,* 50: 896-900.

Esenbeck N. 1836. Ueber einen blau-rothen Farbstoff, der sich bei der Zersetzung von Oscillatorien bildet. *Liebigs Ann Chem,* 17: 75-82.

Fairchild CD, Zhao J, Zhou J, Colson SE, Bryant DA & Glazer AN. 1992. Phycocyanin alpha-subunit phycocyanobilin lyase. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 89: 7017-21.

Fairchild CD & Glazer AN. 1994a. Nonenzymatic bilin addition to the alpha subunit of an apophycoerythrin. *J Biol Chem,* 269: 28988-96.

Fairchild CD & Glazer AN. 1994b. Oligomeric structure, enzyme kinetics, and substrate specificity of the phycocyanin alpha subunit phycocyanobilin lyase. *J Biol Chem,* 269: 8686-94.

Ficner R & Huber R. 1993. Refined crystal structure of phycoerythrin from Porphyridium cruentum at 0.23-nm resolution and localization of the gamma subunit. *Eur J Biochem,* 218: 103-6.

Frankenberg N & Lagarias JC. 2003. Biosynthesis and biological functions of bilins. *In*: Kadish, KM, Smith, KM & Guilard, R (eds.) The Porphyrin Handbook. Academic Press, Amsterdam.

Fraunholz MJ, Moerschel E & Maier UG. 1998. The chloroplast division protein FtsZ is encoded by a nucleomorph gene in cryptomonads. *Mol Gen Genet,* 260: 207-11.

Füglistaller P, Rümbeli R, Suter F & Zuber H. 1984. Minor polypeptides from the phycobilisome of the cyanobacterium Mastigocladus laminosus. Isolation, characterization and aminoacid sequences of a colourless 8,9 kDa polypeptide and of a 16.2 kDa phycobiliprotein. *Physiol. Chem,* 365: 1085-1096.

Gantt E & Conti SF. 1965. The ultrastructure of Porphyridium cruentum. *J Cell Biol,* 26: 365-81.

Gantt E & Conti SF. 1966a. Granules associated with the chloroplast lamellae of Porphyridium cruentum. *J Cell Biol,* 29: 423-34.

Gantt E & Conti SF. 1966b. Phycobiliprotein localization in algae. *Brookhaven Symp Biol,* 19: 393-405.

Gillot MA & Gibbs SP. 1980. The cryptomonad nucleomorph: its ultrastructure and evolutionary significance. *J. Phycol.,* 16: 558-568.

Gilson P & McFadden GI. 1995. The chlorarachniophyte: a cell with two different nuclei and two different telomeres. *Chromosoma,* 103: 635-41.

Gilson PR. 2001. Nucleomorph genomes: much ado about practically nothing. *Genome Biol,* 2: REVIEWS1022.

Gilson PR, Su V, Slamovits CH, Reith ME, Keeling PJ & McFadden GI. 2006. Complete nucleotide sequence of the chlorarachniophyte nucleomorph: nature's smallest nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 103: 9566-71.

Glauser M, Stirewalt VL, Bryant DA, Sidler W & Zuber H. 1992. Structure of the genes encoding the rod-core linker polypeptides of Mastigocladus laminosus phycobilisomes and functional aspects of the phycobiliprotein/linker-polypeptide interactions. *Eur J Biochem,* 205: 927-37.

Glazer AN & Apell GS. 1977. A common evolutionary origin for tbe biliproteins of cyanobacteria, rhodophytes and cryptophyta. *Federation of European Microbiology Society Letters,* 1: 113-116.

Glazer AN. 1983. Comparative biochemistry of photosynthetic light-harvesting systems. *Annu Rev Biochem,* 52: 125-57.

Glazer AN. 1985. Light harvesting by phycobilisomes. *Annu Rev Biophys Biophys Chem,* 14: 47-77.

Glazer AN & Wedemayer GJ. 1995. Cryptomonad biliproteins — an evolutionary perspective. *Photosynth Res,* 46: 93-105.

Godovac-Zimmermann J, Sheil M, Wrench PM & Hiller RG. 1992. Amino acid sequence of the beta-subunit of phycoerythrin from the cryptophyte algae Chroomonas CS 24. *Biochim Biophys Acta,* 1120: 117-21.

Gould SB, Sommer MS, Kroth PG, Gile GH, Keeling PJ & Maier UG. 2006a. Nucleus-to-nucleus gene transfer and protein retargeting into a remnant cytoplasm of cryptophytes and diatoms. *Mol Biol Evol,* 23: 2413-22.

Gould SB, Sommer MS, Hadfi K, Zauner S, Kroth PG & Maier UG. 2006b. Protein targeting into the complex plastid of cryptophytes. *J Mol Evol,* 62: 674-81.

Gould SB, Fan E, Hempel F, Maier UG & Klosgen RB. 2007. Translocation of a phycoerythrin alpha subunit across five biological membranes. *J Biol Chem,* 282: 30295-302.

Gould SB, Waller RF & McFadden GI. 2008. Plastid evolution. *Annu Rev Plant Biol,* 59: 491-517.

Greenwood AD, Griffiths HB & Santore UJ. 1977. Chloroplasts and cell compartments in Cryptophyceae. *Br. phycol. Bull, ia,* 119.

Grigorieva G & Shestakov S. 1982. Transformation in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. 6803. *FEMS Microbiol Lett,* 13: 367-70.

Grossman AR, Schaefer MR, Chiang GG & Collier JL. 1993. The phycobilisome, a light-harvesting complex responsive to environmental conditions. *Microbiol Rev,* 57: 725-749.

Grossman AR, Bhaya D, Apt KE & Kehoe DM. 1995. Light-harvesting complexes in oxygenic photosynthesis: diversity, control, and evolution. *Annu Rev Genet,* 29: 231-88.

Guard-Friar D & MacColl R. 1986. Subunit separation (alpha,alpha',beta) of cryptomonad biliproteins. *Photochem Photobiol,* 43: 81-5.

Hansmann S & Martin W. 2000. Phylogeny of 33 ribosomal and six other proteins encoded in an ancient gene cluster that is conserved across prokaryotic genomes: influence of excluding poorly alignable sites from analysis. *Int J Syst Evol Microbiol,* 50 Pt 4: 1655-63.

Harper JT & Keeling PJ. 2003. Nucleus-encoded, plastid-targeted glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) indicates a single origin for chromalveolate plastids. *Mol Biol Evol,* 20: 1730-5.

Harper JT, Waanders E & Keeling PJ. 2005. On the monophyly of chromalveolates using a six-protein phylogeny of eukaryotes. *Int J Syst Evol Microbiol,* 55: 487-96.

Hauth AM, Maier UG, Lang BF & Burger G. 2005. The Rhodomonas salina mitochondrial genome: bacteria-like operons, compact gene arrangement and complex repeat region. *Nucleic Acids Res,* 33: 4433-42.

Haxo FT & Fork DC. 1959. Photosynthetically active accessory pigments of cryptomonads. *Nature,* 184: 1051-2.

Hempel F, Bozarth A, Sommer MS, Zauner S, Przyborski JM & Maier UG. 2007. Transport of nuclear-encoded proteins into secondarily evolved plastids. *Biol Chem,* 388: 899-906.

Hess WR, Steglich C, Lichtle C & Partensky F. 1999. Phycoerythrins of the oxyphotobacterium Prochlorococcus marinus are associated to the thylakoid membrane and are encoded by a single large gene cluster. *Plant Mol Biol,* 40: 507-21.

Hess WR, Rocap G, Ting CS, Larimer F, Stilwagen S, Lamerdin J & Chisholm SW. 2001. The photosynthetic apparatus of Prochlorococcus: Insights through comparative genomics. *Photosynth Res,* 70: 53-71.

Hibbert DJ & Norris RE. 1984. Cytology and ultrastrucure of Chlorarachnion reptans (Chlorarachniophyta divisio nova, Chlorarachniophyceae classis nova). *J Phycol,* 20: 310-30.

Hill DRA & Rowan KS. 1989. The biliproteins of the Cryptophyceae. *Phycologia,* 28: 455-463.

Hjorth E, Hadfi K, Gould SB, Kawach O, Sommer MS, Zauner S & Maier UG. 2004. Zero, one, two, three, and perhaps four Endosymbiosis and the gain and loss of plastids. *Endocytobiosis and Cell Research,* 15: 459-68.

Hjorth E, Hadfi K, Zauner S & Maier UG. 2005. Unique genetic compartmentalization of the SUF system in cryptophytes and characterization of a SufD mutant in Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett,* 579: 1129-35.

Hofmann CJ, Rensing SA, Hauber MM, Martin WF, Muller SB, Couch J, McFadden GI, Igloi GL & Maier UG. 1994. The smallest known eukaryotic genomes encode a protein gene: towards an understanding of nucleomorph functions. *Mol Gen Genet,* 243: 600-4.

Hoiczyk E & Hansel A. 2000. Cyanobacterial cell walls: news from an unusual prokaryotic envelope. *J Bacteriol,* 182: 1191-9.

Hu IC, Lee TR, Lin HF, Chiueh CC & Lyu PC. 2006. Biosynthesis of fluorescent allophycocyanin alpha-subunits by autocatalytic bilin attachment. *Biochemistry,* 45: 7092-9.

Huson DH & Bryant D. 2006. Application of phylogenetic networks in evolutionary studies. *Mol Biol Evol,* 23: 254-67.

Jenkins J, Hiller RG, Speirs J & Godovac-Zimmermann J. 1990. A genomic clone encoding a cryptophyte phycoerythrin alpha-subunit. Evidence for three alpha-subunits and an N-terminal membrane transit sequence. *FEBS Lett,* 273: 191-4.

Kahn K, Mazel D, Houmard J, Tandeau de Marsac N & Schaefer MR. 1997. A role for cpeYZ in cyanobacterial phycoerythrin biosynthesis. *J Bacteriol,* 179: 998-1006.

Kaneko T, Sato S, Kotani H, Tanaka A, Asamizu E, Nakamura Y, Miyajima N, Hirosawa M, Sugiura M, Sasamoto S, Kimura T, Hosouchi T, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Naruo K, Okumura S, Shimpo S, Takeuchi C, Wada T, Watanabe A, Yamada M, Yasuda M & Tabata S. 1996. Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions (supplement). *DNA Res,* 3: 185-209.

Kaneko T & Tabata S. 1997. Complete genome structure of the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. PCC6803. *Plant Cell Physiol,* 38: 1171-6.

Kaneko T, Nakamura Y, Wolk CP, Kuritz T, Sasamoto S, Watanabe A, Iriguchi M, Ishikawa A, Kawashima K, Kimura T, Kishida Y, Kohara M, Matsumoto M, Matsuno A, Muraki A, Nakazaki N, Shimpo S, Sugimoto M, Takazawa M, Yamada M, Yasuda M & Tabata S. 2001. Complete genomic sequence of the filamentous nitrogen-fixing cyanobacterium Anabaena sp. strain PCC 7120. *DNA Res,* 8: 205-13; 227-53.

Kawach O, Voss C, Wolff J, Hadfi K, Maier UG & Zauner S. 2005. Unique tRNA introns of an enslaved algal cell. *Mol Biol Evol,* 22: 1694-701.

Kawach O. 2006. Charakterisierung des Slr1649 aus Synechocystis sp. PCC 6803, ein Homolog zu Orf222 aus Guillardia theta. Dissertation. Philipps-Universität, Marburg.

Khan H, Parks N, Kozera C, Curtis BA, Parsons BJ, Bowman S & Archibald JM. 2007. Plastid genome sequence of the cryptophyte alga Rhodomonas salina CCMP1319: lateral transfer of putative DNA replication machinery and a test of chromist plastid phylogeny. *Mol Biol Evol,* 24: 1832-42.

Kilian O & Kroth PG. 2005. Identification and characterization of a new conserved motif within the presequence of proteins targeted into complex diatom plastids. *Plant J,* 41: 175-83.

Klotz AV, Leary JA & Glazer AN. 1986. Post-translational methylation of asparaginyl residues. Identification of beta-71 gamma-N-methylasparagine in allophycocyanin. *J Biol Chem,* 261: 15891-4.

Klotz AV & Glazer AN. 1987. gamma-N-methylasparagine in phycobiliproteins. Occurrence, location, and biosynthesis. *J Biol Chem,* 262: 17350-5.

Kondo K, Geng XX, Katayama M & Ikeuchi M. 2005. Distinct roles of CpcG1 and CpcG2 in phycobilisome assembly in the cyanobacterium Synechocystis sp. PCC 6803. *Photosynth Res,* 84: 269-73.

Köst-Reyes E, Köst HP & Rüdiger W. 1975. Bonding between chromophore and protein in biliproteins. Detection of Cysteine as binding amino acid in B-phycoerythrin. *Liebigs Ann. Chem.,* 1975: 1594.

Kylin H. 1910. Über Phykoerythrin und Phykocyan bei Ceramium rubrum. *Ag. Hoppe-Seyler's Z Physiol Chem*: 169-239.

Lackner DH & Bahler J. 2008. Translational control of gene expression from transcripts to transcriptomes. *Int Rev Cell Mol Biol,* 271: 199-251.

Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature,* 227: 680-5.

Lagarias JC, Glazer AN & Rapoport H. 1979. Chromopeptides from C-phycocyanin. Structure and linkage of a phycocyanobilin bound to the beta-subunit. *J. Am. Chem. Soc.,* 101: 5030.

Lamparter T. 2004. Evolution of cyanobacterial and plant phytochromes. *FEBS Lett,* 573: 1-5.

Lane CE, van den Heuvel K, Kozera C, Curtis BA, Parsons BJ, Bowman S & Archibald JM. 2007. Nucleomorph genome of Hemiselmis andersenii reveals complete intron loss and compaction as a driver of protein structure and function. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 104: 19908-13.

Lefort M. 1965. Sur le ehromatoplasma d'une cyanophycee endosymbiotique : Glaucocystis nostochinearum. *Compt. rend. Acad. Sc.,* 261: 223.

Lemberg R. 1930. Chromoproteide der Rotalgen. II. Spaltung mit Pepsin und Säuren. Isolierung eines Pyrrolfarbstoffs. *Liebigs Ann Chem,* 477: 195-245.

Liberton M, Howard Berg R, Heuser J, Roth R & Pakrasi HB. 2006. Ultrastructure of the membrane systems in the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC 6803. *Protoplasma,* 227: 129-38.

Lichtle C, Jupin H & Duval JC. 1980. Energy transfers from photosystem II to photosystem I in Cryptomonas rufescens (Cryptophyceae). *Biochim Biophys Acta,* 591: 104-12.

Lichtle C, Duval JC & Lemoine Y. 1987. Comparative biochemical, functional and uitrastructural studies of photosystem particles from a Cryptophycea: Cryptomonas rufescens; isolation of an active phycoerythrin particle. *Biochim Biophys Acta,* 894: 76-90.

Ludwig M & Gibbs SP. 1989. Localization of phycoerythrin at the lumenal surface of the thylakoid membrane in Rhodomonas lens. *J Cell Biol,* 108: 875-84.

Lundell DJ, Williams RC & Glazer AN. 1981. Molecular architecture of a light-harvesting antenna. In vitro assembly of the rod substructures of Synechococcus 6301 phycobilisomes. *J Biol Chem,* 256: 3580-92.

MacColl R & Guard-Friar D. 1987. Phycobiliproteins. *CRC Press*.

MacColl R. 1998. Cyanobacterial phycobilisomes. *J Struct Biol,* 124: 311-34.

Mackinney G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solution. *J Biol Chem,* 140: 322.

Maier UG, Douglas SE & Cavalier-Smith T. 2000. The nucleomorph genomes of cryptophytes and chlorarachniophytes. *Protist,* 151: 103-9.

Mann NH, Clokie MR, Millard A, Cook A, Wilson WH, Wheatley PJ, Letarov A & Krisch HM. 2005. The genome of S-PM2, a "photosynthetic" T4-type bacteriophage that infects marine Synechococcus strains. *J Bacteriol,* 187: 3188-200.

Margulis L. 1970. Origin of eucaryotic cells. *New Haven: Yale University Press*.

Marin B, Nowack EC & Melkonian M. 2005. A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis. *Protist,* 156: 425-32.

Martin CD & Hiller RG. 1987. Subunits and chromophores of a type I phycoerythrin from a Chroomonas-sp Cryptophyceae. *Biochim Biophys Acta,* 923: 88-97.

Martin W & Herrmann RG. 1998. Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol,* 118: 9-17.

Martin W, Stoebe B, Goremykin V, Hapsmann S, Hasegawa M & Kowallik KV. 1998. Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. *Nature,* 393: 162-5.

Martin W, Rujan T, Richly E, Hansen A, Cornelsen S, Lins T, Leister D, Stoebe B, Hasegawa M & Penny D. 2002. Evolutionary analysis of Arabidopsis, cyanobacterial, and chloroplast genomes reveals plastid phylogeny and thousands of cyanobacterial genes in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 99: 12246-51.

McFadden GI & Gilson P. 1995. Something borrowed, something green: lateral transfer of chloroplasts by secondary endosymbiosis. *Trends in Ecology and Evolution*: 12-17.

Mereschkowsky C. 1905. Über Natur und Ursprung der Chromatophoren im Pflanzenreiche. *Biol. Zentralbl.,* 25: 593–604.

Mereschkowsky C. 1910. Theorie der zwei Plasmaarten als Grundlage der Symbiogenesis, einer neuen Lehre von der Entstehung der Organismen. *Biol. Zentralbl.,* 30: 278–367.

Miller CA, Leonard HS, Pinsky IG, Turner BM, Williams SR, Harrison L, Jr., Fletcher AF, Shen G, Bryant DA & Schluchter WM. 2008. Biogenesis of phycobiliproteins. III. CpcM is the asparagine methyltransferase for phycobiliprotein beta-subunits in cyanobacteria. *J Biol Chem,* 283: 19293-300.

Mörschel E & Wehrmeyer W. 1975. Cryptomonad biliprotein: phycocyanin-645 from a Chroomonas species. *Arch Microbiol,* 105: 153-8.

Muckle G, Otto J & Rudiger W. 1978. On the linkages between chromophore and protein in biliproteins, VII. Amino acid sequence in the chromophore regions of C-phycoerythrin from Pseudanabaena W 1173 and Phormidium persicinum. *Hoppe Seylers Z Physiol Chem,* 359: 345-55.

Mullineaux CW. 1992. Excitation energy transfer from phycobilisomes to Photosystem I in a cyanobacterium. *Biochim Biophys Acta,* 1100: 285-92.

Mullineaux CW. 1994. Excitation energy transfer from phycobilisomes to Photosystem I in a cyanobacterial mutant lacking Photosystem II. *Biochim Biophys Acta,* 1184: 71-77.

Nakajima Y, Fujiwara S, Sawai H, Imashimizu M & Tsuzuki M. 2001. A phycocyanin-deficient mutant of synechocystis PCC 6714 with a single-base substitution upstream of the cpc operon. *Plant Cell Physiol,* 42: 992-8.

Nowack EC, Melkonian M & Glockner G. 2008. Chromatophore genome sequence of Paulinella sheds light on acquisition of photosynthesis by eukaryotes. *Curr Biol,* 18: 410-8.

O'Heocha C & Raftery M. 1959. Phycoerythrins and phycocyanins of cryptomonads. *Nature,* 184: 1049-51.

Ohad N & Hirschberg J. 1992. Mutations in the D1 subunit of photosystem II distinguish between quinone and herbicide binding sites. *Plant Cell,* 4: 273-82.

Ohyanagi H, Tanaka T, Sakai H, Shigemoto Y, Yamaguchi K, Habara T, Fujii Y, Antonio BA, Nagamura Y, Imanishi T, Ikeo K, Itoh T, Gojobori T & Sasaki T. 2006. The Rice Annotation Project Database (RAP-DB): hub for Oryza sativa ssp. japonica genome information. *Nucleic Acids Res,* 34: D741-4.

Pastore A & Lesk AM. 1990. Comparison of the structures of globins and phycocyanins: evidence for evolutionary relationship. *Proteins,* 8: 133-55.

Plank T & Anderson LK. 1995. Heterologous assembly and rescue of stranded phycocyanin subunits by expression of a foreign cpcBA operon in Synechocystis sp. strain 6803. *J Bacteriol,* 177: 6804-9.

Plank T, Toole C & Anderson LK. 1995. Subunit interactions and protein stability in the cyanobacterial light-harvesting proteins. *J Bacteriol,* 177: 6798-803.

Reith M & Douglas S. 1990. Localization of beta-phycoerythrin to the thylakoid lumen of Cryptomonas phi does not involve a signal peptide. *Plant Mol Biol,* 15: 585-92.

Reumann S, Davila-Aponte J & Keegstra K. 1999. The evolutionary origin of the protein-translocating channel of chloroplastic envelope membranes: identification of a cyanobacterial homolog. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 96: 784-9.

Reuter W, Westermann M, Brass S, Ernst A, Boger P & Wehrmeyer W. 1994. Structure, composition, and assembly of paracrystalline phycobiliproteins in Synechocystis sp. strain BO 8402 and of phycobilisomes in the derivative strain BO 9201. *J Bacteriol,* 176: 896-904.

Rippka R, Waterbury J & G. C-B. 1974. A Cyanobacterium Which Lacks Thylakoids. *Arch Microbiol,* 100: 419-436.

Rippka R, Deruelles J, Waterbury JB, Herdman M & Stanier RY. 1979. Generic assignments, strain histories and properties of pure cultures of cyanobacteria. *J Gen Microbiol,* 111: 1-61.

Rippka R. 1988. Isolation and purification of cyanobacteria. *Methods Enzymol,* 167: 3-27.

Ris H & Plaut W. 1962. Ultrastructure of DNA-containing areas in the chloroplast of Chlamydomonas. *J Cell Biol,* 13: 383-91.

Rockwell NC, Su YS & Lagarias JC. 2006. Phytochrome structure and signaling mechanisms. *Annu Rev Plant Biol,* 57: 837-58.

Rogers MB, Gilson PR, Su V, McFadden GI & Keeling PJ. 2007. The complete chloroplast genome of the chlorarachniophyte Bigelowiella natans: evidence for independent origins of chlorarachniophyte and euglenid secondary endosymbionts. *Mol Biol Evol,* 24: 54-62.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA & Arnheim N. 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science,* 230: 1350-4.

Sambrook J, Fritsch EF & Maniatis T. 1989. Molecular Cloning. A laboratory manual. *Cold Spring Habor Labatory Press.*

Sanger F, Nicklen S & Coulson AR. 1977. DNA Sequencing with Chain-Terminating Inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 74: 5463-7.

Sarcina M, Tobin MJ & Mullineaux CW. 2001. Diffusion of phycobilisomes on the thylakoid membranes of the cyanobacterium Synechococcus 7942. Effects of phycobilisome size, temperature, and membrane lipid composition. *J Biol Chem,* 276: 46830-4.

Saunee NA, Williams SR, Bryant DA & Schluchter WM. 2008. Biogenesis of phycobiliproteins: II. CpcS-I and CpcU comprise the heterodimeric bilin lyase that attaches phycocyanobilin to CYS-82 OF beta-phycocyanin and CYS-81 of allophycocyanin subunits in Synechococcus sp. PCC 7002. *J Biol Chem,* 283: 7513-22.

Schagger H & von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem,* 166: 368-79.

Scheer H. 1982. Phycobiliproteins: molecular aspects of photosynthetic antenna systems. *In*: Fong, FK (ed.) *Light Reaction Path of Photosynthesis.* Springer, Berlin. 7-45.

Scheer H & Zhao KH. 2008. Biliprotein maturation: the chromophore attachment. *Mol Microbiol,* 68: 263-76.

Schimper AFW. 1883. Über die Entwicklung der Chlorophyllkörner (1.Teil). *Botanische Zeitung,* 41: 105-114.

Schirmer T, Bode W, Huber R, Sidler W & Zuber H. 1985. X-ray crystallographic structure of the light-harvesting biliprotein C-phycocyanin from the thermophilic cyanobacterium Mastigocladus laminosus and its resemblance to globin structures. *J Mol Biol,* 184: 257-77.

Schluchter WM & Glazer AN. 1999. Biosynthesis of phycobiliproteins in cyanobacteria. *In*: Peschek, GA, Löffelhardt, W & Schmetterer, G (eds.) The Phototrophic Prokaryotes. Kluwer/Plenum Press, New York. 83-95.

Schoenleber RW, Lundell DJ, Glazer AN & Rapoport H. 1984. Bilin attachment sites in the alpha and beta subunits of B-phycoerythrin. Structural studies on the singly linked phycoerythrobilins. *J Biol Chem,* 259: 5485-9.

Schopf JW. 1993. Microfossils of the Early Archean Apex chert: new evidence of the antiquity of life. *Science,* 260: 640-6.

Shen G, Saunee NA, Williams SR, Gallo EF, Schluchter WM & Bryant DA. 2006. Identification and characterization of a new class of bilin lyase: the cpcT gene encodes a bilin lyase responsible for attachment of phycocyanobilin to Cys-153 on the beta-subunit of phycocyanin in Synechococcus sp. PCC 7002. *J Biol Chem,* 281: 17768-78.

Shen G, Schluchter WM & Bryant DA. 2008. Biogenesis of phycobiliproteins: I. cpcS-I and cpcU mutants of the cyanobacterium Synechococcus sp. PCC 7002 define a heterodimeric phyococyanobilin lyase specific for beta-phycocyanin and allophycocyanin subunits. *J Biol Chem,* 283: 7503-12.

Sidler W & Zuber H. 1988. Structural and phylogenetic relationships of phycoerythrins from cyanobacteria, red algae and cryptophyceae. *Photosynthetic Light-Harvesting Systems,* Walter de Gruyter & Co., Berlin.

Sidler W, Nutt H, Kumpf B, Frank G, Suter F, Brenzel A, Wehrmeyer W & Zuber H. 1990. The complete amino-acid sequence and the phylogenetic origin of phycocyanin-645 from the cryptophytan alga Chroomonas sp. *Biol Chem Hoppe Seyler,* 371: 537-47.

Sidler WA, Kumpf B, Suter F, Morisset W, Wehrmeyer W & Zuber H. 1985. Structural studies on cryptomonad biliprotein subunits. Two different c~ subunits in Chroomonas phycocyanin-645 and Cryptomonas phycoerythrin-545. *Biol Chem Hoppe Seyler,* 366: 233-44.

Sidler WA. 1994. Phycobilisome and phycobiliprotein structure. *In*: Bryant, DA (ed.) *The Molecular Biology of Cyanobacteria.* Kluwer, Dortrecht. 139-216.

Sirpio S, Allahverdiyeva Y, Suorsa M, Paakkarinen V, Vainonen J, Battchikova N & Aro EM. 2007. TLP18.3, a novel thylakoid lumen protein regulating photosystem II repair cycle. *Biochem J,* 406: 415-25.

Six C, Thomas JC, Thion L, Lemoine Y, Zal F & Partensky F. 2005. Two novel phycoerythrin-associated linker proteins in the marine cyanobacterium Synechococcus sp. strain WH8102. *J Bacteriol,* 187: 1685-94.

Soll J & Schleiff E. 2004. Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol,* 5: 198-208.

Sommer MS, Gould SB, Lehmann P, Gruber A, Przyborski JM & Maier UG. 2007. Der1-mediated preprotein import into the periplastid compartment of chromalveolates? *Mol Biol Evol,* 24: 918-28.

Sorby HC. 1877. On the characteristic colouring-matters of the red groups of algae. *J Linnean Soc Bot,* 15: 34-40.

Stibitz TB, Keeling PJ & Bhattacharya D. 2000. Symbiotic origin of a novel actin gene in the cryptophyte Pyrenomonas helgolandii. *Mol Biol Evol,* 17: 1731-8.

Stoebe B & Maier UG. 2002. One, two, three: nature's tool box for building plastids. *Protoplasma,* 219: 123-30.

Swanson RV & Glazer AN. 1990. Phycobiliprotein methylation. Effect of the gamma-N-methylasparagine residue on energy transfer in phycocyanin and the phycobilisome. *J Mol Biol,* 214: 787-96.

Swanson RV, Zhou J, Leary JA, Williams T, de Lorimier R, Bryant DA & Glazer AN. 1992. Characterization of phycocyanin produced by cpcE and cpcF mutants and identification of an intergenic suppressor of the defect in bilin attachment. *J Biol Chem,* 267: 16146-54.

Terry MJ, Wahleithner JA & Lagarias JC. 1993. Biosynthesis of the plant photoreceptor phytochrome. *Arch Biochem Biophys,* 306: 1-15.

Ting CS, Rocap G, King J & Chisholm SW. 2002. Cyanobacterial photosynthesis in the oceans: the origins and significance of divergent light-harvesting strategies. *Trends Microbiol,* 10: 134-42.

Tomitani A, Knoll AH, Cavanaugh CM & Ohno T. 2006. The evolutionary diversification of cyanobacteria: molecular-phylogenetic and paleontological perspectives. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 103: 5442-7.

Toole CM, Plank TL, Grossman AR & Anderson LK. 1998. Bilin deletions and subunit stability in cyanobacterial light-harvesting proteins. *Mol Microbiol,* 30: 475-86.

Tu JM, Kupka M, Bohm S, Ploscher M, Eichacker L, Zhao KH & Scheer H. 2008. Intermediate binding of phycocyanobilin to the lyase, CpeS1, and transfer to apoprotein. *Photosynth Res,* 95: 163-8.

Tyler BM, Tripathy S, Zhang X, Dehal P, Jiang RH, Aerts A, Arredondo FD, Baxter L, Bensasson D, Beynon JL, Chapman J, Damasceno CM, Dorrance AE, Dou D, Dickerman AW, Dubchak IL, Garbelotto M, Gijzen M, Gordon SG, Govers F, Grunwald NJ, Huang W, Ivors KL, Jones RW, Kamoun S, Krampis K, Lamour KH, Lee MK, McDonald WH, Medina M, Meijer HJ, Nordberg EK, Maclean DJ, Ospina-Giraldo MD, Morris PF, Phuntumart V, Putnam NH, Rash S, Rose JK, Sakihama Y, Salamov AA, Savidor A, Scheuring CF, Smith BM, Sobral BW, Terry A, Torto-Alalibo TA, Win J, Xu Z, Zhang H, Grigoriev IV, Rokhsar DS & Boore JL. 2006. Phytophthora genome sequences uncover evolutionary origins and mechanisms of pathogenesis. *Science,* 313: 1261-6.

Ughy B & Ajlani G. 2004. Phycobilisome rod mutants in Synechocystis sp. strain PCC6803. *Microbiology,* 150: 4147-56.

Vermaas WFJ. (2001) Photosynthesis and respiration in cyanobacteria. *Encyclopedia of Life Sciences.*

Wanner G & Köst H-P. 1980. Investigations on the arrangement of Porphyridium cruentum phycobilisomes. *Protoplasma,* 102: 97-109.

Wastl J, Duin EC, Iuzzolino L, Dorner W, Link T, Hoffmann S, Sticht H, Dau H, Lingelbach K & Maier UG. 2000. Eukaryotically encoded and chloroplast-located rubredoxin is associated with photosystem II. *J Biol Chem,* 275: 30058-63.

Wastl J & Maier UG. 2000. Transport of proteins into cryptomonads complex plastids. *J Biol Chem,* 275: 23194-8.

Waterbury JB & Valois FW. 1993. Resistance to Co-Occurring Phages Enables Marine Synechococcus Communities To Coexist with Cyanophages Abundant in Seawater. *Appl Environ Microbiol,* 59: 3393-3399.

Wedemayer GJ, Kidd DG & N. GA. 1996. Cryptomonad biliproteins: Bilin types and locations. *Photosynth Res,* 48: 163-170.

Wehrmeyer W. 1970. Zur Feinstruktur der Chloroplasten einiger photoautotropher Cryptophyceen. *Arch. Mikrobiol.,* 71: 367-83.

Wilbanks SM, Wedemayer GJ & Glazer AN. 1989. Posttranslational modifications of the beta subunit of a cryptomonad phycoerythrin. Sites of bilin attachment and asparagine methylation. *J Biol Chem,* 264: 17860-7.

Wilbanks SM & Glazer AN. 1993. Rod structure of a phycoerythrin II-containing phycobilisome. II. Complete sequence and bilin attachment site of a phycoerythrin gamma subunit. *J Biol Chem,* 268: 1236-41.

Wildman RB & Bowen CC. 1974. Phycobilisomes in blue-green algae. *J Bacteriol,* 117: 866-81.

Wilk KE, Harrop SJ, Jankova L, Edler D, Keenan G, Sharples F, Hiller RG & Curmi PM. 1999. Evolution of a light-harvesting protein by addition of new subunits and rearrangement of conserved elements: crystal structure of a cryptophyte phycoerythrin at 1.63-A resolution. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 96: 8901-6.

Williams JGK. 1998. Construction of specific mutations in photosystem II photosynthetic reaction center by genetic engineering methods in Synechocystis 6803. *Methods Enzymol,* 167: 766-78.

Wu SH & Lagarias JC. 2000. Defining the bilin lyase domain: lessons from the extended phytochrome superfamily. *Biochemistry,* 39: 13487-95.

Xiong J, Fischer WM, Inoue K, Nakahara M & Bauer CE. 2000. Molecular evidence for the early evolution of photosynthesis. *Science,* 289: 1724-30.

Yoon HS, Hackett JD, Pinto G & Bhattacharya D. 2002. The single, ancient origin of chromist plastids. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 99: 15507-12.

Yoon HS, Hackett JD, Ciniglia C, Pinto G & Bhattacharya D. 2004. A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes. *Mol Biol Evol,* 21: 809-18.

Zauner S, Fraunholz M, Wastl J, Penny S, Beaton M, Cavalier-Smith T, Maier UG & Douglas S. 2000. Chloroplast protein and centrosomal genes, a tRNA intron, and odd telomeres in an unusually compact eukaryotic genome, the cryptomonad nucleomorph. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 97: 200-5.

Zhang Z, Green BR & Cavalier-Smith T. 2000. Phylogeny of ultra-rapidly evolving dinoflagellate chloroplast genes: a possible common origin for sporozoan and dinoflagellate plastids. *J Mol Evol,* 51: 26-40.

Zhao KH, Wu D, Wang L, Zhou M, Storf M, Bubenzer C, Strohmann B & Scheer H. 2002. Characterization of phycoviolobilin phycoerythrocyanin-alpha 84-cystein-lyase-(isomerizing) from Mastigocladus laminosus. *Eur J Biochem,* 269: 4542-50.

Zhao KH, Zhu JP, Song B, Zhou M, Storf M, Bohm S, Bubenzer C & Scheer H. 2004. Nonenzymatic chromophore attachment in biliproteins: conformational control by the detergent Triton X-100. *Biochim Biophys Acta,* 1657: 131-45.

Zhao KH, Wu D, Zhou M, Zhang L, Bohm S, Bubenzer C & Scheer H. 2005a. Amino acid residues associated with enzymatic activities of the isomerizing phycoviolobilin-lyase PecE/F. *Biochemistry,* 44: 8126-37.

Zhao KH, Su P, Bohm S, Song B, Zhou M, Bubenzer C & Scheer H. 2005b. Reconstitution of phycobilisome core-membrane linker, LCM, by autocatalytic chromophore binding to ApcE. *Biochim Biophys Acta,* 1706: 81-7.

Zhao KH, Wu D, Zhang L, Zhou M, Bohm S, Bubenzer C & Scheer H. 2006a. Chromophore attachment in phycocyanin. Functional amino acids of phycocyanobilin--alpha-phycocyanin lyase and evidence for chromophore binding. *FEBS J,* 273: 1262-74.

Zhao KH, Su P, Li J, Tu JM, Zhou M, Bubenzer C & Scheer H. 2006b. Chromophore attachment to phycobiliprotein beta-subunits: phycocyanobilin:cysteine-beta84 phycobiliprotein lyase activity of CpeS-like protein from Anabaena Sp. PCC7120. *J Biol Chem,* 281: 8573-81.

Zhao KH, Zhang J, Tu JM, Bohm S, Ploscher M, Eichacker L, Bubenzer C, Scheer H, Wang X & Zhou M. 2007a. Lyase activities of CpcS- and CpcT-like proteins from Nostoc PCC7120 and sequential reconstitution of binding sites of phycoerythrocyanin and phycocyanin beta-subunits. *J Biol Chem,* 282: 34093-103.

Zhao KH, Su P, Tu JM, Wang X, Liu H, Ploscher M, Eichacker L, Yang B, Zhou M & Scheer H. 2007b. Phycobilin:cystein-84 biliprotein lyase, a near-universal lyase for cysteine-84-binding sites in cyanobacterial phycobiliproteins. *Proc Natl Acad Sci U S A,* 104: 14300-5.

Zhou J, Gasparich GE, Stirewalt VL, de Lorimier R & Bryant DA. 1992. The cpcE and cpcF genes of Synechococcus sp. PCC 7002. Construction and phenotypic characterization of interposon mutants. *J Biol Chem,* 267: 16138-45.

9. Anhang

9.1 Accession Numbers

Tabelle 9-1: Accession Numbers der Proteinsequenzen zur Berechnung des Netzwerks.

Organismus	Protein	Accession Number
Guillardia theta	Orf222	AAK39897
Hemiselmis andersenii	cpeT-like protein	ABW97973
Cyanidioschyzon merolae	CMK263C	
Arabidopsis thaliana	AT5G51020	NP_199915
Oryza sativa	LOC_Os11g32160	ABA93997
Paulinella chromatophora	PCC 0629	ACB43055
Synechocystis sp. PCC6803	Slr1649	NP_441787
Crocosphaera watsonii:	CwatDRAFT_4238	ZP_00515713
	CwatDRAFT_0664	ZP_00518424
	CwatDRAFT_5720	ZP_00514725
Nostoc punctiformes PCC73102	Npun02004130	ZP_00109088
	Npun02004123	ZP_00109082
	Npun02007740	ZP_00106171
Nostoc sp. PCC7120	All5339	NP_489379
	Alr0647	BAB72605
Anabaena variabilis	Ava_2579	YP_323089
	Ava_4579	YP_325071
Thermosynechococcus elongates BP-1	Tlr2156	NP_682946
Synechococcus elongates PCC6301	Syc0738_d	YP_171448
	Syc0764_d	YP_171474
Synechococcus sp. PCC7002	CpcT	ABY63662
Synechococcus sp. CC9311	Sync_0487	ABI46022
	Sync_0509	ABI47049
Synechococcus elongatus PCC7942	Synpcc7942_0772	ABB56804
	Synpcc7942_0800	ABB56832
Synechococcus sp. CC9605	Syncc9605_0440	ABB34216
	Syncc9605_0419	ABB34195
Synechococcus sp. CC9902	Syncc9902_1910	ABB26867
	Syncc9902_1887	ABB26844
Synechococcus sp. WH8102	SYNW2024	NP_898115
	SYNW2003	NP_898094
Trichodesmium erythraeum IMS101	Tery_0543	YP_724425
	Tery_0979	YP_720833
Calothrix PCC7601	CpeT	AAK11648
Gloeobacter violaceus PCC7421	Glr1182	BAC89123
	CpeT	BAC89134
	Glr1538	BAC89479
Prochlorococcus marinus MIT9313	PMT1678	NP_895505
Prochlorococcus marinus NATL2A	PMN2A_1676	YP_292867
Prochlorococcus marinus CCMP1375	Pro0342	CAB52704
Prochlorococcus marinus MIT9211	P9211_07167	ZP_01005965
Prochlorococcus marinus SS120	Pro0342	NP_874736
Bakteriophage S-PM2	S-PM2p215	CAF34280

9.2 Nukleomorph-kodierte plastidäre Proteine

Tabelle 9-2: Auflistung identifizierter Gene Nukleomorph-kodierter plastidärer Proteine. Bekannt sind diese durch die Sequenzierung der Nukleomorph Genome der Cryptophyten *Guillardia theta* (Douglas et al. 2001), *Hemiselmis andersenii* (Lane et al. 2007) und der Chlorarachniophyte *Bigelowiella natans* (Gilson et al. 2006). Die Gene innerhalb einer Zeile sind homolog.

Guillardia theta	Chr. Nr.	*Hemiselmis andersenii*	Chr. Nr.	*Bigelowiella natans*	Chr. Nr.	Funktion des Proteins
clpP1	1	clpP1	1	clpP-2	1	proteolytische Untereinheit der Clp Protease
clpP2	1	clpP2	2	clpP-3	2	proteolytische Untereinheit der Clp Protease
gyrA	1	gyrA	2	--	--	Topoisomerase Untereinheit
gyrB	1	gyrB	1	--	--	Topoisomerase Untereinheit
hlip	1	hlip	1	--	--	Carotin-binding Protein
met	1	met	1	--	--	Methyltransferase
rpoD	1	rpoD	1	sig2	2	Transkriptionsinitiation
rps15	1	rps15	3	--	--	ribosomales Protein
tha4	1	tha4	1	--	--	Protein Translokator (ΔpH Weg)
tic22	1	tic22	3	--	--	Protein Import
cbbX	2	cbbX	2	--	--	CO_2-Fixierung
cpn60	2	cpn60	3	cpn60	1	Chaperon
dnaG	2	dnaG	3	--	--	DNA-Primase
ftsZ	2	ftsZ	3	--	--	Plastidenteilung
gidA	2	gidA	3	--	--	Translation
hcf136	2	hcf136	1	--	--	PSII Assemblierung
iap100	2	iap100	2	--	--	Protein Import
rub	2	rub	2	--	--	Elektronentransport
secE	2	secE	2	--	--	Protein Translokase
orf176	1	orf202	2	--	--	unbekannte Funktion
orf222	1	CpeT-like	1	--	--	putative Phycoerythrin-Bilin Lyase
orf228	1	orf235	1	--	--	unbekannte Funktion
orf467	1	sufD	1	--	--	Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese
orf773	1	orf831	3	--	--	unbekannte Funktion
orf125	2	orf146	3	--	--	unbekannte Funktion
orf163	2	orf173	2	--	--	unbekannte Funktion
orf227	2	orf237	3	--	--	unbekannte Funktion
orf249	2	orf263	2	--	--	unbekannte Funktion
orf323	2	orf337	3	--	--	Translationsinitiator
orf496	2	engA	2	--	--	GTP Bindeprotein
--	--	--	--	clpP-1	1	proteolytische Untereinheit der Clp Protease
--	--	--	--	tatC	1	Thylakoid Protein Translokator
--	--	--	--	sufB	1	Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese
--	--	--	--	clpC	2	ATP-bindende Untereinheit der Clp Protease
--	--	--	--	clpP-4	2	proteolytische Untereinheit der Clp Protease
--	--	--	--	dnaK	2	Chaperon
--	--	--	--	murL	2	UDP-N-Acetylmuramoylalanyl-D-Glutamate--2 6-Diaminopimelate Ligase
--	--	--	--	toc75	2	Protein Import
--	--	--	--	secY	2	Thylakoid Preprotein Translokase
--	--	--	--	clpP-5	3	proteolytische Untereinheit der Clp Protease
--	--	--	--	clpP-6	3	proteolytische Untereinheit der Clp Protease
--	--	--	--	tic20	3	Protein Import
--	--	--	--	sufC	3	Eisen-Schwefel-Cluster Biosynthese

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Uwe Maier für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und der finanziellen Mittel sowie seiner ständigen Diskussionsbereitschaft und dem Interesse am Fortgang dieser Arbeit.
Im Weiteren gilt mein Dank Prof. Dr. Klaus Lingelbach für die Zweitbegutachtung, sowie Prof. Dr. Renate Renkawitz-Pohl und Prof. Dr. Andreas Brune als weiteren Mitgliedern der Prüfungskommission.
Der DFG Graduate School 1216 danke ich als assoziiertes Mitglied für die Möglichkeit zur Teilnahme an Seminaren, Workshops und Kongressen.

Danken möchte ich vielmals Dr. Stefan Zauner für ständige Diskussionbereitschaft, viele Anregungen sowie für das Korrekturlesen der Arbeit.
Julia Prechtl danke ich für die Generierung der cyanobakteriellen Mutanten.
Nicole Grünheit von der Arbeitsgruppe Prof. Martin der Universität Düsseldorf danke ich herzlich für die Konstruktion des Netzwerks, dem Korrekturlesen der Arbeit und dem Beantworten vieler, vieler Fragen. Ein großer Dank geht an Dr. Julius Nyalwhidhe und Dr. Omid Azim-Zadeh aus der Arbeitsgruppe Prof. Lingelbach für die durchgeführte Massenspektrometrie und ihre ständige Hilfe und Unterstützung bei kleinen und großen Problemen. Bei Marianne Johannsen und Prof. Dr. Erhard Mörschel bedanke ich mich für die elektronenmikroskopischen Arbeiten im Rahmen des Negativ-Stainings.
Ein großes Dankeschön gebührt den derzeitigen und ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Prof. Maier für eine angenehme Arbeitsatmosphäre und den vielen interessanten Diskussionen. Besonders möchte ich mich bei Andrew Bozarth für seine Hilfe bei englischen Manuskripten, Vorträgen etc. bedanken. Ein großer Dank geht auch an Judith Köbis, die im Rahmen ihrer Diplomarbeit für Transkriptionsstudien so einige Nächte im Labor verbracht hat.
Nicht zuletzt danke ich herzlichst meiner Familie und meinen Freunden für ihre Unterstützung, Ablenkung und den vielen kleinen und großen Taten, die direkt oder indirekt zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Curriculum vitae

persönliche Daten	
Name	Kathrin Bolte
Promotion	
07/ 2006 – 04/ 2009	Philipps-Universität Marburg Fachbereich Biologie Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Maier, Zellbiologie
	Titel der Promotion: „Die erste funktionelle Charakterisierung einer eukaryot kodierten Bilin Lyase“.
09/ 2005 – 06/ 2006	wissenschaftliche Mitarbeiterin der Philipps-Universität Marburg Fachbereich Biologie Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Maier, Zellbiologie
Hochschulausbildung	
11/ 2004 – 08/ 2005	Philipps-Universität Marburg Diplomarbeit im Fach Zellbiologie
	Titel der Diplomarbeit: „Gen- und Transkriptanalyse zweier plastidär lokalisierter Proteine und Untersuchungen an der hochmolekularen Plastiden – DNA des Dinoflagellaten *Ceratium horridum*“.
10/ 2000 – 10/ 2004	Philipps-Universität Marburg Studium der Biologie mit den Hauptfächern Zellbiologie, Entwicklungsbiologie und Zoologie
Schulbildung	
1997 – 2000	Staatliches Gymnasium Nidda Allgemeine Hochschulreife
1993 – 1997	Gesamtschule Schotten Gymnasialzweig
1991 – 1993	Gesamtschule Schotten Förderstufe
1987 – 1991	Grundschule Schotten

Erklärung

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Die erste funktionelle Charakterisierung einer eukaryot kodierten Bilin Lyase“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg/Lahn den