

**Systematische molekulargenetische Identifizierung von *TAK*
Insertionsmutanten der einzelligen Grünalge
*Chlamydomonas reinhardtii***

Diplomarbeit vorgelegt von
Jan H. Mußgnug

Angefertigt an der Fakultät für Biologie der Universität Bielefeld
unter Anleitung von Herrn *Dr. Olaf Kruse*

1. Oktober 2000

Danksagung

Dank an alle, die mich während der Diplomarbeit unterstützt haben, insbesondere an meine Eltern, *Dr. Hermann Mußgnug* und *Dr. Claudia Mußgnug* für die finanzielle Unterstützung des Studiums, an *Prof. Dr. G.H. Schmid* für die Möglichkeit am Lehrstuhl Zellphysiologie der Universität Bielefeld diplomieren zu können, an *Dr. Olaf Kruse* für die sehr gute Betreuung, an *Christine Strauß* und *Rüdiger Borgstädt* für viele praktische Hilfen sowie an die Mitarbeiter der Gruppe von *Prof. in Ph.D. E.K. Pistorius* für die gute Zusammenarbeit.

Gewidmet meinen Eltern und Geschwistern

Inhalt

Titel _____	i
Danksagung _____	ii
Inhalt _____	iii
Liste der Abbildungen _____	v
Liste der Tabellen _____	vi
Abkürzungen _____	vii
Erklärung _____	ix

1. Kapitel: Einleitung

Inhalt _____	1
1.1. Photosynthese _____	3
1.2. Phosphorylierungen der Thylakoidproteine als regulatorisches Prinzip ____	21
1.3. Serin/Threonin – Proteinkinasen in eukaryontischen photoautotrophen Organismen _____	25
1.4. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> als Versuchsobjekt _____	31
1.5. Zielsetzung der Diplomarbeit _____	44

2. Kapitel: Material und Methoden

Inhalt _____	45
2.1. Stämme und Wachstumsbedingungen _____	47
2.2. Geräteliste _____	52
2.3. Molekularbiologische Methoden _____	53
2.4. Proteinbiochemische Methoden _____	80
2.5. <i>Datenbankscreening</i> zur Identifikation von möglichen Serin/Threonin – Proteinkinasen in Chloroplasten _____	86

3. Kapitel: Ergebnisse und Diskussion

Inhalt _____	87
3.1. Vorversuche _____	88

3.2.	<i>TAK</i> – Kandidatennachweis mit Western blots _____	94
3.3.	<i>PCR</i> – Versuche zur <i>TKN</i> – Genidentifikation _____	97
3.4.	<i>Southern blot/dot blot</i> – Versuche zur <i>TKN</i> – Genidentifikation _____	101
3.5.	<i>Datenbankscreening</i> zur Identifikation von möglichen Serin/Threonin – Proteinkinasen in Chloroplasten _____	104
4.	Kapitel: Zusammenfassung und Ausblick	
	Inhalt _____	108
4.1.	Zusammenfassung _____	109
4.2.	Ausblick _____	110
5.	Kapitel: Literatur	
	Literaturliste _____	111
6.	Kapitel: Anhang	
	Anhang _____	120

Liste der Abbildungen

Kapitel 1

Abbildung 1: ein Chloroplast _____	4
Abbildung 2: Modelle der Proteinkomplexe der Thylakoidmembran _____	7
Abbildung 3: Modell des Photosystems II (ohne LHC II) _____	8
Abbildung 4: Modell des Photosystems I (ohne LHC I) _____	12
Abbildung 5: Modell des Cytochrom b ₆ /f – Komplexes _____	15
Abbildung 6: Modell der ATP Synthase _____	17
Abbildung 7: Z – Schema des photochemischen Elektronentransports _____	19
Abbildung 8: Identifizierung von cDNAs von Proteinen, die mit Zielpeptiden interagieren _____	29
Abbildung 9: Modell des <i>TAK1</i> Proteins _____	30
Abbildung 10: <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> _____	31
Abbildung 11: Schematische Darstellung einer typischen <i>C. reinhardtii</i> Zelle _____	35

Kapitel 2

Abbildung 12: Polymerase Kettenreaktion _____	66
Abbildung 13: Schematischer Aufbau eines <i>Southern blots</i> _____	76

Kapitel 3

Abbildung 14: <i>Pool</i> Versuch <i>Stm1</i> / CC 1618 = 1/1000 _____	88
Abbildung 15: Gesamt – RNA vom Stamm cw10 _____	89
Abbildung 16: Kontroll – <i>PCR</i> der DNase Behandlung _____	90
Abbildung 17: 3' <i>RACE</i> _____	91
Abbildung 18: Klonierung des <i>PCR</i> Produktes mit dem <i>pGEM – T Easy</i> Vektorsystem _____	91
Abbildung 19: Wachstumskurve von <i>CC1618</i> _____	93
Abbildung 20: Anti – <i>TAK1</i> – Western blot _____	94
Abbildung 21: Vergleich von Silberfärbung und Anti – <i>TAK1</i> – <i>Western blot</i> der verschiedenen <i>Stm</i> Mutanten _____	95
Abbildung 22: Anhand des <i>A. thaliana TAK1</i> Gens gewählte <i>Primer</i> _____	97
Abbildung 23: <i>IPCR</i> Versuch _____	99
Abbildung 24: 3' <i>RACE</i> Versuch _____	100
Abbildung 25: <i>Dot blot</i> mit <i>TAK1</i> Sonde _____	101
Abbildung 26: <i>Dot blot</i> mit <i>TAK1</i> Sonde _____	101
Abbildung 27: <i>Screeningverfahren</i> zur Identifikation von potentiellen plastidären Serin/Threoninkinasen _____	105

Liste der Tabellen

Kapitel 1

Tabelle 1: Untereinheiten des Photosystems II _____	9
Tabelle 2: Untereinheiten des LHC II Komplexes _____	10
Tabelle 3: Untereinheiten von Photosystem I und LHC I _____	13
Tabelle 4: Mutmaßliche Transposons des <i>Chlamydomonas</i> Kerngenoms _____	38
Tabelle 5: Consensus – Sequenz des 5' Intronbereichs _____	40
Tabelle 6: Consensus – Sequenz des 3' Intronbereichs _____	40

Kapitel 2

Tabelle 7: Verwendete Stämme von <i>C. reinhardtii</i> _____	49
Tabelle 8: Verwendete Stämme von <i>E. coli</i> _____	50
Tabelle 9: Geräteliste _____	52

Kapitel 3

Tabelle 10: Primerkombinationen mit DNA – Proben unterschiedlicher <i>C. reinhardtii</i> Stämme _____	98
Tabelle 11: Computeranalyse der potentiellen Serin/Threonin – Proteinkinasen _____	106
Tabelle 12: <i>TBLASTN 2.0.14</i> – <i>Alignment</i> von <i>TAK1</i> und der EST – Bank _____	107

Liste der Gleichungen

Kapitel 1

Gleichung 1: Bruttogleichung der Photosynthese _____	4
--	---

Liste der Sequenzen

Kapitel 3

Sequenz 1: Nucleotidsequenz des 3' Endes des identifizierten LHC II Proteins _____	92
--	----

Abkürzungen

Å	Ångström
A. thaliana / A. t.	<i>Arabidopsis thaliana</i>
A ₀	Chlorophyll des Photosystem I
A ₁	Phyllochinon des Photosystems I
AMP	Adenosin-5- monophosphat
AMPS	Ammoniumperoxodisulfat
AP	Alkalischer Phosphatpuffer
ATP	Adenosin-5- triphosphat
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl Phosphat, <i>p</i> -Toluidinsalz
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenol – Blau
C. reinhardtii / C. r.	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>
cDNA	Copy DNA
DBMIB	2,5-dibromo-3-methyl-6-isopropyl- <i>p</i> -benzochinon
DCMU	3-[3,4-dichlorophenyl]-1,1,-dimethylurea
CF	Kopplungsfaktor
Chl	Chlorophyll
Cyt	Cytochrom
dATP	Desoxy – Adenosintriphosphat
dCTP	Desoxy – Cytidintriphosphat
dGTP	Desoxy – Guanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxy – Nucleosidtriphosphat
ds	Doppelsträngig
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxy – Thymidintriphosphat
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure Dinatriumsalz Dihydrat
EST	Expressed sequence tag
F _A	Protein des Photosystems I mit 4Fe – 4S Komplex
F _B	Protein des Photosystems I mit 4Fe – 4S Komplex
Fd	Ferredoxin
F _x	Polypeptid mit 4Fe – 4S Zentrum des Photosystems I
HSM	High salt Medium
IPCR	Inverse PCR
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactosid
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria – Bertani Medium
LHC	Light-harvesting Komplex
mt	<i>Mating type</i>
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NBT	2,2' Di- <i>p</i> -nitrophenyl-5,5' diphenyl-3,3' [3,3' dimethoxy-4,4' diphenylene] ditetrazolium chloride
P ₆₈₀	Chlorophyllpigment 680 im Photosystem II
P ₇₀₀	Chlorophyllpigment 700 im Photosystem I
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Phe	Pheophytin

Abkürzungen

P _i	Phosphat
PK	Pflanzliche Proteinkinase
PQ	Plastochinon
PS	Photosystem
Q _A	Plastochinon am D ₂ Protein im PS II
Q _B	Plastochinon am D ₁ Protein im PS II
Q _O	Plastochinon Bindestelle des Cyt b ₆ /f Komplexes
RACE	Rapid amplification of cDNA ends
RNA	Ribonucleinsäure
RT	Raumtemperatur
S	<i>Svedberg</i> – Einheit
SDS	Natriumdodecyl - Sulfat
ss	einzelsträngig
SSC	Natriumcitrat Salzlösung
TAK	Thylakoid assoziierte Kinase in <i>A. thaliana</i>
TAP	Trisacetat – Phosphatpuffer
TBS	Tris Puffer Salzlösung
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyl-ethylendiamin
TGF	Transforming growth factor
TKN	TAK Kandidat in <i>C. reinhardtii</i>
Tris	2-Amino-2-hydroxy-methylpropan-1,3,-diol
Tween	Polyoxyethylene – Sorbitan – Monolaurate
Vol	Volumen
WAK	Wall associated kinase
WT	Wildtyp
X-Gal	(5-bromo-4-chloro-3-indolyl)-β-D-galactosid
Y	Tyrosin

Erklärung

Die vorliegende Diplomarbeit habe ich selbständig und nur unter Zuhilfenahme der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt.

Bielefeld, den 1.10.2000

Unterschrift _____

(Jan Mußnug)

1. Kapitel

Einleitung

1.1. Photosynthese	3
1.1.1. Chloroplasten	4
1.1.2. Elektronentransportkette	6
1.1.2.1. Proteinkomplexe der Elektronentransportkette	7
1.1.2.1.1. Photosystem II und LHC II	8
1.1.2.1.2. Photosystem I und LHC I	12
1.1.2.1.3. Cytochrom b6/f Komplex	15
1.1.2.1.4. ATP – Synthase	17
1.1.2.2. Elektronentransport vom Wasser zum NADP ⁺	19
1.2. Phosphorylierungen der Thylakoidproteine als regulatorisches Prinzip	21
1.2.1. Phosphoproteine der Thylakoidmembran	21
1.2.2. LHC II „state transition“	22
1.2.3. Photoinhibition und PS II „repair cycle“	23
1.3. Serin/Threonin – Proteinkinasen in eukaryontischen photoautotrophen Organismen	25
1.3.1. PS II – Kinasen	27
1.3.2. LHC II – Kinasen	27
1.3.2.1. <i>TAK1 – 3</i> in <i>Arabidopsis thaliana</i>	28
1.4. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> als Versuchsobjekt	31
1.4.1. Historie	32
1.4.2. Systematik und Morphologie	33
1.4.2.1. Gattung <i>Chlamydomonas</i>	33
1.4.2.2. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	35
1.4.3. Kerngenom und Plasmon	36

1.4.3.1.	Kerngenom _____	37
1.4.3.1.1.	Repetitive Sequenzen und Transposons _____	38
1.4.3.1.2.	<i>Mating type</i> _____	38
1.4.3.1.3.	Proteincodierende Bereiche _____	39
1.4.3.2.	Chloroplastengenom _____	41
1.4.3.3.	Chondriom _____	42
1.5.	Zielsetzung der Diplomarbeit _____	44

1. Kapitel

Einleitung

Zum Verständnis der Aufgabenstellungen der vorliegenden Diplomarbeit seien zunächst einige grundlegende Prinzipien und Organisationsformen photosynthetischer Organismen dargestellt.

1.1. Photosynthese

Im Laufe der Evolution haben eine Vielzahl von Organismen die Fähigkeit entwickelt, die Lichtenergie zu nutzen, um eigene endergonische Stoffwechselreaktionen zu ermöglichen. Dieser Vorgang wird als Photosynthese bezeichnet und ist einer der wichtigsten biologischen Vorgänge unseres Planeten. Die zur Photosynthese befähigten Lebewesen nennt man photoautotroph, weil sie aus anorganischen Stoffen unter Ausnutzung der Energie des Sonnenlichtes alle für ihr Überleben nötigen komplexeren chemischen Verbindungen selber synthetisieren können. Diese Verbindungen bilden dann auch die Lebensgrundlage für die den autotrophen Organismen gegenüber gestellten heterotrophen Organismen [Richter, 1998a].

Folglich sind sämtliche Lebewesen entweder direkt oder indirekt von der Photosynthese abhängig.

Schon manche einfache Archaeobakterien waren in der Lage, durch das lichtabsorbierende Pigment Bakteriorhodopsin [Kühlbrandt, 2000] einen Protonengradienten über eine Membran zu erzeugen, und diesen zur Synthese von ATP als „Währung“ der chemischen Energie zu nutzen.

Von diesen einfachen Formen ausgehend entwickelten sich über die Cyanobakterien und verschiedene Algenarten bis hin zu den Höheren Pflanzen (deren Vorgänger vermutlich Grünalgen waren) unterschiedliche, zum Teil sehr komplexe Formen der Photosynthese.

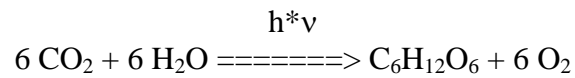
So besitzen die Höheren Pflanzen und einige eukaryontische Einzeller eigens Organelle, die Chloroplasten, welche speziell dieser Aufgabe dienen [s. Kap.1.1.1.].

Hier findet neben der Erzeugung eines Protonengradienten und der dadurch möglichen ATP – Synthese auch die Wasserspaltung und die Produktion von Reduktionsäquivalenten

(die Reduktion von Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADP⁺) zu NADPH + H⁺) statt (Lichtreaktionen).

Die so chemisch gespeicherte Energie kann dann zur Reduktion von atmosphärischem Kohlendioxid zu Zuckern genutzt werden (Dunkelreaktionen).

Dieser Vorgang wird in der Bruttogleichung der Photosynthese ausgedrückt:



h = Plancksche Konstante

ν = Frequenz

Gleichung 1: Bruttogleichung der Photosynthese

1.1.1. Chloroplasten

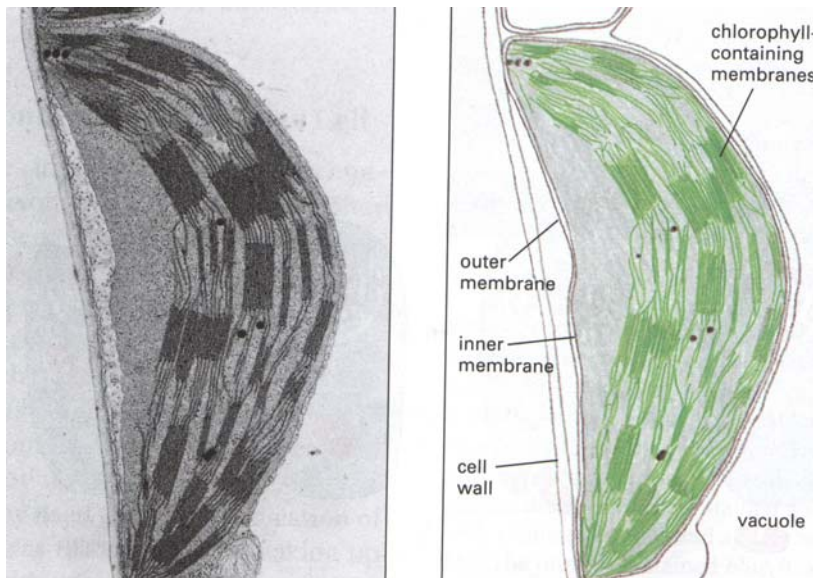


Abbildung 1: ein Chloroplast

links: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Gras – Chloroplasten

rechts: interpretatorische Zeichnung (aus: Alberts et al. „Essential Cell Biology“ ©1998)

Chloroplasten sind in erster Linie auf die photosynthetischen Prozesse spezialisierte Organelle Höherer Pflanzenzellen und mancher eukaryontischer Einzeller.

Hier werden viele der komplexen chemischen Verbindungen produziert, die für das Wachstum und Überleben der Zelle notwendig sind, wie z. B. Aminosäuren, Carotinoide, Fettsäuren und Kohlenhydrate [Richter, 1998b].

Manche der für die Synthese- und Stoffwechsellleistungen benötigten Enzyme werden dabei durch das Plastidengenom selber codiert und im Chloroplasten exprimiert, andere hingegen sind kerncodiert, werden im Cytoplasma exprimiert und durch spezielle Transportmechanismen als Vorläuferproteine in den Chloroplasten importiert, wo durch Prozessierung das reife Protein entsteht [Schnell & Blobel, 1993; Tian et al., 1995].

Gemäß der Endosymbionten – Theorie haben sich die Chloroplasten im Laufe der Evolution aus Vorläufern der Cyanobakterien entwickelt, welche von frühen Eukaryontenzellen aufgenommen worden waren und symbiontisch mit diesen lebten. (Auf analogem Weg sind dieser Hypothese folgend die Mitochondrien aus phagocytotisch aufgenommenen Vorläufern heutiger Purpurbakterien entstanden).

Diese Theorie liefert eine einleuchtende Begründung für die auch heute noch vorhandenen Ähnlichkeiten zwischen Chloroplasten und Prokaryonten.

So besitzen die Chloroplasten neben weiteren Gemeinsamkeiten eine vergleichbare Größe, zwei Hüllmembranen (in auffallendem Gegensatz zu anderen Kompartimenten wie z.B. dem endoplasmatischen Retikulum oder dem Golgi Apparat, die vermutlich aus Plasmamembraninvaginationen hervorgegangen sind und nur eine Membran aufweisen) ein eigenes Genom, welches ohne Histone organisiert ist und ähnliche Transkriptions –und Translationsmechanismen (z.B. die für Prokaryonten typischen 70S Ribosomenkomplexe). Chloroplasten besitzen neben den Hüllmembranen noch ein intraplastidäres Membransystem, die Thylakoide [Menke, 1961].

Die Thylakoide sind als flache Zisternen entweder allein stehend („Stromabereiche“) oder stapelförmig („Granabereiche“) organisiert, und tragen die für die Elektronentransportkette benötigten Komplexe [Ude & Koch, 1994].

1.1.2. Elektronentransportkette

Die Elektronentransportkette bewirkt letztlich den Transport von Elektronen ausgehend von Wasser, welches zu $\frac{1}{2} \text{O}_2$ und 2H^+ oxidiert wird, (bzw. einem anderen Elektronendonator wie H_2S) zum NADP^+ , welches zu $\text{NADPH} + \text{H}^+$ reduziert wird.

Ferner wird durch den gekoppelten Protonentransport vom Stroma der Chloroplasten ins Lumen der Thylakoide ein Konzentrationsgradient erzeugt, welcher eine ATP – Synthese aus $\text{ADP} + \text{P}_i$ erlaubt.

Diese energetisch ungünstigen Prozesse benötigen die Energie des Sonnenlichtes und können nicht in einem Schritt ablaufen.

Vielmehr ist die Gesamtreaktion in viele Teilreaktionen aufgeteilt und die Elektronen durchlaufen eine Vielzahl von Redoxsystemen.

Nachfolgen werden die Proteinkomplexe der Elektronentransportkette und deren Zusammenspiel während des photosynthetischen Elektronentransports dargestellt.

1.1.2.1. Proteinkomplexe der Elektronentransportkette

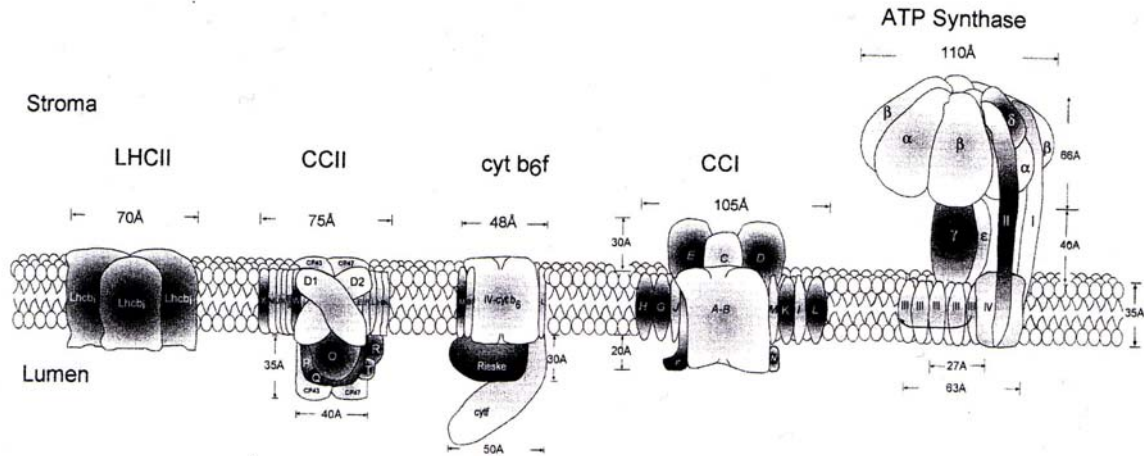


Abbildung 2: Modelle der Proteinkomplexe der Thylakoidmembran

CC I = Photosystem I; CC II = Photosystem II; cyt b₆/f = cytochrom b₆/f Komplex; LHCII = light harvesting complex II; dunkle Untereinheiten = kerncodiert; helle Untereinheiten = plastidär codiert
(aus: Wollman et al. „The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes“
© 1999)

Die Abbildung 2 zeigt Modelle der essentiellen photosynthetischen Komplexe bei Eukaryonten. Photosynthetische Bakterien haben zum Teil sehr ähnliche, zum Teil aber auch divergierende Proteinkomplexe in der für die Photosynthese zuständigen Plasmamembran.

1.1.2.1.1. Photosystem II und LHC II

Ein PS II – Komplex besteht neben weiteren Proteinen aus dem light harvesting Komplex II (LHC II), dem wasserspaltenden Komplex und dem PS II – Kernkomplex mit dem Reaktionszentrum und ist hauptsächlich in den Granabereichen der Thylakoide anzutreffen [Stryer, 1994].

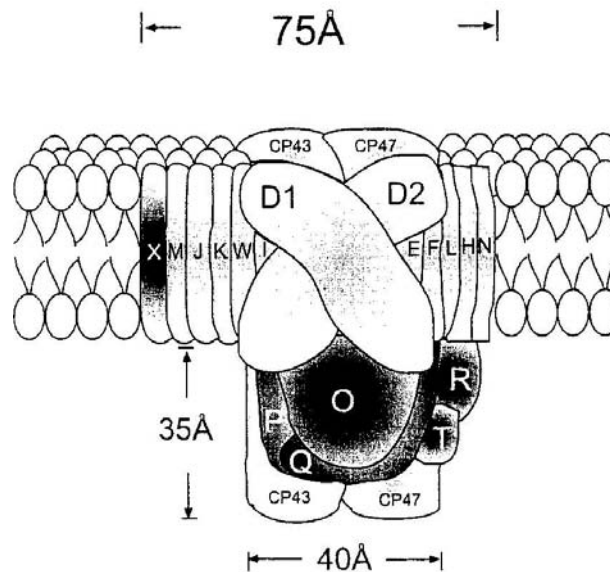


Abbildung 3: Modell des Photosystems II (ohne LHC II)

dunkle Untereinheiten = kerncodiert; helle Untereinheiten = plastidär codiert
 (aus: Wollman et al. „The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes“
 © 1999)

Ein typischer PS II – Komplex Höherer Pflanzen ist aus über 20 verschiedenen Untereinheiten aufgebaut, und beinhaltet 200 – 250 gebundene Chlorophyllmoleküle pro P₆₈₀ im Verhältnis Chl a / Chl b = 2 – 3 [Wollman et al., 1999].

Untereinheit	molekulare Masse (in kDa)	codierendes Gen (c/n)	Funktion
PS II A (D1)	39	psb A (c)	RC II mit Y _Z , bindet P ₆₈₀ , Q _B , 4-6 Chl a, Phe, 1-2 β-Carotine
PS II B (CP43)	56	psb B (c)	Kernantenne, bindet 20 Chl a, 2-4 β-Carotine
PS II C (CP47)	51	psb C (c)	Kernantenne, bindet 20 Chl a, 5 β-Carotine
PS II D (D2)	39	psb D (c)	RC II mit Y _D , bindet P ₆₈₀ , Q _A , 4-6 Chl a, Phe, 1-2 β-Carotine
PS II E	9	psb E (c)	RC II, α Untereinheit vom Cyt b ₅₅₉ Protein
PS II F	4	psb F (c)	RC II, β Untereinheit vom Cyt b ₅₅₉ Protein
PS II H	8	psb H (c)	Regulation vom Q _A – Q _B Elektronentransfer ?
PS II I	4	psb I (c)	RC II
PS II J	4	psb J (c)	?
PS II K	4	psb K (c)	?
PS II L	4,5	psb L (c)	Rolle in Q _A Bindung ?
PS II M	4	psb M (c)	?
PS II N	4,5	psb N (c)	?
PS II O (OE33)	26	psb O (n)	Stabilisiert Mn Cluster; Ca ²⁺ / Cl ⁻ Bindung ?
PS II P (OE23)	20	psb P (n)	Ca ²⁺ / Cl ⁻ Bindung ? (nur in Algen und Höheren Pflanzen vorhanden)
PS II Q (OE16)	16,5	psb Q (n)	Ca ²⁺ / Cl ⁻ Bindung ? (nur in Algen und Höheren Pflanzen vorhanden)
PS II R	10	psb R (n)	? (nur in Algen und Höheren Pflanzen vorhanden)
PS II S	22	psb S (n)	Antennenprotein zwischen PS II und LHC II; bindet 5 Chl a (nur in Algen und Höheren Pflanzen vorhanden)
PS II T (ycf8)	4	psb T (c)	?
PS II T'	3	psb T' (n)	? (nur in Algen und Höheren Pflanzen vorhanden)
PS II U	14	psb U	? (nur in Cyanobakterien vorhanden)
PS II V (cyt c-550)	15	psb V	Rolle in Wasseroxidation ? (nur in Cyanobakterien vorhanden)
PS II W	6	psb W (n)	? (nur in Algen und Höheren Pflanzen vorhanden)
PS II X	4	psb X (n)	?
PS II Y	7	psb Y (n)	Mn – Bindung, H ₂ O – Oxidation ?

Tabelle 1: Untereinheiten des Photosystems II

c/n = chloroplasten- / kerncodiertes Gen; Chl = Chlorophyll; Phe = Pheophytin; Q = Plastochinon; RC II = Bestandteil des Reaktionszentrums; Y = Tyrosinrest (adaptiert von: Wollman et al. „The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes“ © 1999)

Der **LHC II – Komplex** besteht in Höheren Pflanzen aus verschiedenen, zum Teil oligomer organisierten Proteinen, welche mit den Pigmenten Chlorophyll a und b assoziiert sind. Ferner sind die Carotinoide β – Carotin, Lutein, Violaxanthin und Neoxanthin zu finden. Für den LHC II – Komplex ist ein Chl a / Chl b – Wert von 1.4 typisch, ~12 Chlorophylle sind pro LHC II – Protein gebunden.

Untereinheit	molekulare Masse (in kDa)	codierendes Gen (c/n)	Funktion
LCH II Typ 1	25	lhcb1 (n)	LHC II bindet 7 Chl a, 5 Chl b 3-4 Xanthophylle, 2 Luteine und 1 Neoxanthin
LCH II Typ 2	25	lhcb2 (n)	
LCH II Typ 3	24	lhcb3 (n)	
CP 29	28	lhcb4 (n)	bindet 6 Chl a, 2 Chl b, und Xanthophylle
CP 26	27	lhcb5 (n)	bindet 6 Chl a, 3 Chl b, und Xanthophylle
CP 24	23	lhcb6 (n)	bindet 6 Chl a, 4 Chl b, und Xanthophylle

Tabelle 2: Untereinheiten des LHC II – Komplexes

c/n = chloroplasten- / kerncodiertes Gen; Chl = Chlorophyll;

(adaptiert von: Wollman et al. „The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes“ © 1999)

Das abundanteste Protein ist das LHC II – Typ 1 Protein (codiert vom lhcb1 Gen im Kerngenom). Es bildet zusammen mit den LHC II – Typ 2 (lhcb2) und LHC II – Typ 3 (lhcb3) – Proteinen Trimere unterschiedlicher Zusammensetzung.

Weitere Bestandteile des LHC II – Komplexes sind die Monomere CP29 (lhcb4), CP26 (lhcb5) und CP24 (lhcb6) [Jansson, 1999]. Die Struktur konnte bisher bis 3.4 Ångström aufgelöst werden [Kühlbrandt et al., 1994].

Alle Untereinheiten besitzen drei helikale Transmembrandomänen, der N – terminale Bereich befindet sich auf der Stromaseite der Thylakoide.

Die für die sechs verschiedenen Untereinheiten LHC II – Typ 1-3, CP29, CP26 und CP24 zuständigen Gene lhcb 1-6 sind alle kerncodiert, zum Teil in vielfacher Kopienzahl (je nach Art sind bis zu 16 Kopien des lhcb1 Gens gefunden worden [Wollman et al., 1999]).

Die Gene werden im Kern transkribiert, ins Cytoplasma exportiert und translatiert, als Vorläuferproteine in den Chloroplasten importiert und prozessiert. Dann gelangen sie zur Thylakoidmembran wo sie nach Bindung der Cofaktoren in die Membran integriert werden.

Die Funktion des LHC II – Komplexes liegt im Sammeln und nahezu verlustfreien Weiterleiten von Photonen zum Reaktionszentrum des PS II – Komplexes.

Der genaue Aufbau des **wasserspaltenden Komplexes** (auch OEC für oxygen evolving complex genannt) ist noch nicht bekannt.

Die Produkte der Gene psbO, psbP, psbQ und psbR sowie ein 4 Mn^{2+} – Cluster sind eng mit der Akzeptorseite des PS II – Komplexes assoziiert und ermöglichen es, $2 \text{ H}_2\text{O}$ – Moleküle zu $1 \text{ O}_2 + 4 \text{ H}^+$ zu spalten. Dabei bindet die O Untereinheit an intrinsische PS II – Proteine und stabilisiert den Komplex, die Untereinheiten P und Q fördern die Bindung der ionischen Cofaktoren Ca^{2+} und Cl^- , welche für die Wasseroxidation notwendig sind [Wollman et al., 1999; Haumann & Junge, 1999]. Die Elektronen werden über die „Komponente Z“, dem Tyrosin¹⁶¹ des D1 – Proteins, an das PS II – Reaktionszentrum weitergegeben, der molekulare Sauerstoff wird freigesetzt und die Protonen verbleiben im Lumen der Thylakoide wo sie zum H^+ – Gradienten beitragen.

Die für die Untereinheiten O, P, Q und R codierenden Gene sind alle kerncodiert.

Das **Photosystem II Reaktionszentrum** besteht aus dem zentral gelegenen D1/D2 Heterodimer (psbA/psbD) mit dem Pigment₆₈₀ (P_{680}), einem speziellen Chlorophyll a Dimer, weiteren vier Chl a – Molekülen, zwei Molekülen Pheophytin, zwei Molekülen β – Carotin und zwei Molekülen Plastochinon (PQ), von denen eines fest an das D2 Protein gebunden ist (Q_A), wohingegen das andere reversibel an das D1 Protein gebunden vorliegt (Q_B).

In enger Assoziation mit dem D1/D2 Dimer liegen die Chlorophyll bindenden Proteine CP47 (psbB) und CP43 (psbC) als sogenannte Kernantennen vor.

Ein weiterer Bestandteil des PS II – Komplexes ist das Cytochrom b_{559} , ein Dimer (psbE/psbF), mit Häm als prosthetischer Gruppe. Wegen der Nähe zum D1/D2 Dimer wird vermutet, daß es eine Schutzfunktion für das Reaktionszentrum besitzen könnte [Barber & Kühlbrandt, 1999; De Las Rivas et al., 1995].

Für den Komplex aus D1, D2, CP47 und Cyt b_{559} konnte die dreidimensionale Struktur mittels Elektronenkristallographie bis zu 8 \AA aufgelöst werden [Rhee et al., 1998].

Die Mehrzahl der Forscher geht heute auf Grund von elektronenmikroskopischen Bildern und Computeranalysen davon aus, daß die gesamten PS II – Komplexe in funktioneller Form als Dimere organisiert sind [Rögner et al., 1996; Hankamer et al., 1997].

Die codierenden Gene für D1 (psbA), D2 (psbD), CP47 (psbC) sowie die Gene für den Cyt b_{559} Komplex werden alle durch das Chloroplastengenom codiert [s. Tab 1].

1.1.2.1.2. Photosystem I und LHC I

Der PS I – Komplex ist einfacher aufgebaut als das Photosystem II und besteht neben weiteren Proteinen aus LHC I und PS I – Kernkomplex mit dem Reaktionszentrum. Es ist in erster Linie in den Stromabereichen der Thylakoide zu finden [Stryer, 1994].

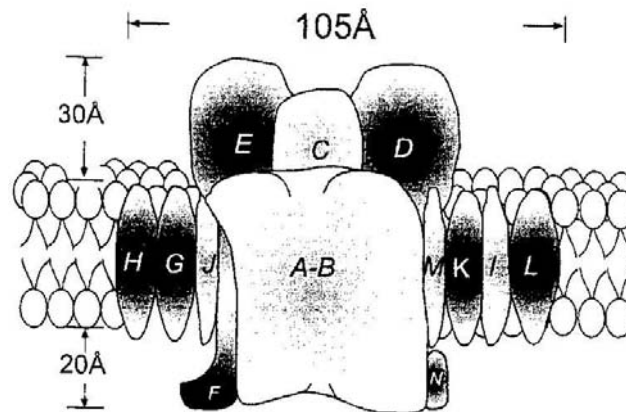


Abbildung 4: Modell des Photosystems I (ohne LHC I)

dunkle Untereinheiten = kerncodiert; helle Untereinheiten = plastidär codiert
(aus: Wollman et al. „The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes“
© 1999)

Insgesamt wird der PS I – Holokomplex aufgebaut aus 11 (Cyanobakterien ohne LHC I – Komplex) bis 17 (Höhere Pflanzen) Untereinheiten.

Die 100 – 200 gebundenen Chlorophyllmoleküle pro Chlorophyllpigment P_{700} treten im Verhältnis

Chl a / Chl b > 5 auf.

Untereinheit	molekulare Masse (in kDa)	codierendes Gen (c/n)	Funktion
PS I A	84	psaA (c)	binden P ₇₀₀ , A ₀ , A ₁ , F _x , ~100 Chl a - und 12-15 β-Carotinmoleküle
PS I B	83	psaB (c)	
PS I C	9	psaC (c)	
PS I D	18	psaD (n)	Ferredoxin - Bindung
PS I E	10	psaE (n)	cyclischer Elektronentransport
PS I F	17	psaF (n)	Plastocyanin - Bindung
PS I G	11	psaG (n)	? (nur in Algen und Höheren Pflanzen vorhanden)
PS I H	11	psaH (n)	? (nur in Algen und Höheren Pflanzen vorhanden)
PS II	4	psaI (c)	Trimerisierung in Cyanobakterien
PS I J	5	psaJ (c)	?
PS I K	9	psaK (n)	?
PS I L	18	psaL (n)	Trimerisierung in Cyanobakterien
PS I M	3	psaM	? (nur in Cyanobakterien vorhanden)
PS I N	10	psaN (n)	? (nur in Algen und Höheren Pflanzen vorhanden)
LHC I Typ 1	22	lhca1 (n)	Light harvesting Antennenproteine, binden Chl a, Chl b und einige Carotinoide
LHC I Typ 2	25	lhca2 (n)	
LHC I Typ 3	26	lhca3 (n)	
LHC I Typ 4	22	lhca4 (n)	

Tabelle 3: Untereinheiten von Photosystem I und LHC I

c/n = chloroplasten- / kerncodiertes Gen;

(adaptiert von: Wollman et al. „The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes“ © 1999)

Der **LHC I – Komplex** besteht bei Höheren Pflanzen in gleichem Verhältnis aus vier verschiedenen Untereinheiten, LHC I – Typ 1-4 (lhca1-4). Jede dieser Untereinheiten ist gekennzeichnet durch drei α helikale Transmembrandomänen wobei der N – terminale Bereich auf der Stromaseite der Thylakoide lokalisiert ist. In der Thylakoidmembran scheinen die Proteine des LHC I – Komplexes in dimerer Form organisiert zu sein [Wollmann et al., 1999].

Für den LHC I – Komplex ist ein Chl a / Chl b – Wert von vier typisch, ~10 Chlorophylle sind pro LHC I – Protein gebunden.

Die für die vier verschiedenen Untereinheiten LHC I – Typ 1-4 codierenden Gene lhca 1-4 liegen allesamt, in ein – bis zweifacher Kopienzahl, im Kerngenom. Folglich werden sie im Kern transkribiert, im Cytoplasma translatiert, als Vorläuferprotein in den Chloroplasten importiert und dort prozessiert. Dann gelangen sie zur Thylakoidmembran wo sie die Cofaktoren binden und in die Membran integriert werden.

Die Funktion des LHC I – Komplexes ist der des LHC II – Komplexes analog; er dient dem Sammeln und Weiterleiten der Energie des Sonnenlichtes zur Versorgung des PS I – Komplexes.

Die Proteine des **Photosystem I Kernkomplexes** (psaA-N) sind zum Teil mit der Stromaseite der Thylakoide (psaC, D, E) oder mit der Lumenseite der Thylakoide (psaF, N) assoziiert, zum Teil handelt es sich um Transmembranproteine (psaA, B, G, I, J, K, L). Sämtliche Cofaktoren sind gebunden an die Untereinheiten A (psaA), B (psaB) oder C (psaC). Untereinheit A und B bilden das zentrale Heterodimer, welches unter anderem das für den Elektronentransport entscheidende Chlorophyll a Dimer P₇₀₀, sowie A₀, A₁, und F_x trägt [s. Kap.1.1.2.2.].

Funktionelle Bedeutsamkeit besitzt auch die Untereinheit C (psaC) mit den zwei 4Fe – 4S Zentren F_A und F_B, über welche die Elektronen auf das Ferredoxin übertragen werden können.

Eine wichtige Rolle spielt ebenfalls Untereinheit F (psaF); hier dockt der bewegliche Elektronendonator Plastocyanin an das Photosystem I an. Die Untereinheiten D (psaD) und E (psaE) stabilisieren diesen Vorgang [Takahashi, 1998].

Die Untereinheiten des Photosystems I werden zum Teil im Kern, zum Teil im Chloroplasten codiert [s. Tab. 3].

1.1.2.1.3. Cytochrom b6/f Komplex

Die Cyt b6/f Komplexe treten im Thylakoidsystem relativ gleichmäßig verteilt zwischen den gestapelten und ungestapelten Bereichen auf [Stryer, 1994]. Sie bestehen aus mindestens sieben verschiedene Untereinheiten.

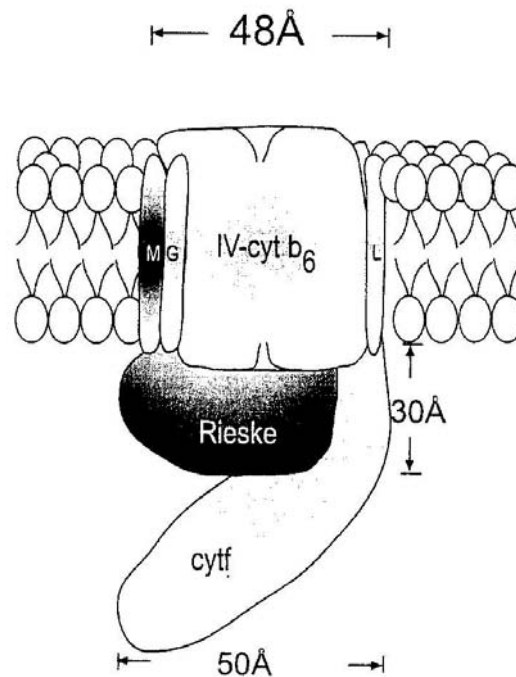


Abbildung 5: Modell des Cytochrom b6/f Komplexes

dunkle Untereinheiten = kerncodiert; helle Untereinheiten = plastidär codiert
 (aus: Wollman et al. „The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes“
 © 1999)

Cytochrom f (petA) und Cytochrom b₆ (petB) sind, wie alle Cytochrome, Eisen – Porphyrin – Proteine. Das Rieske Protein (petC) hingegen trägt einen 2 Fe – 2 S Komplex. Bei Untereinheit IV (petD) handelt es sich um ein Membranprotein ohne Cofaktoren, das zusammen mit Cyt b₆ und dem Rieske Protein an der Bindung des Plastochinons beteiligt ist. Außer diesen Proteinen zählen noch die Produkte der Gene petG, L und M zum Cyt b6/f Komplex [Takahashi, 1998]. Neusten Erkenntnissen zu Folge wird das Vorhandensein von ein bis zwei weiteren Untereinheiten (petN, O) angenommen, wobei das petO – Protein interessanter Weise im Zuge der LHC II „state transition“ phosphoryliert wird [Hamel et al., 2000].

Biochemische Untersuchungen zeigten, daß gereinigte Cyt b6/f Komplexe als Dimere kristallisieren, was ein Indiz dafür ist, daß die Komplexe *in vivo* zu Dimeren aggregiert vorliegen [Wollman et al., 1999].

Die codierenden Gene liegen bei Eukaryonten zum Teil im Kerngenom (petC, M, (O)), überwiegend aber im Plastom (petA, B, D, G, L, (N)).

In Höheren Pflanzen werden sowohl petA als auch petB, petD als polycistronische mRNAs zusammen mit unverwandten Genen transkribiert. Im Unterschied dazu scheinen die Gene petA, B und D in *Chlamydomonas* unabhängig voneinander als monocistronische mRNAs exprimiert zu werden [Wollman et al., 1999].

Eine wesentliche Aufgabe der Cyt b6/f Komplexe besteht im Übertragen der Elektronen von Plastochinolmolekülen, welche zu Plastochinonmolekülen oxidiert werden, auf Plastocyaninmoleküle (bei Prokaryonten und eukaryontischen Einzellern können auch bestimmte Cytochrome als Akzeptoren dienen). Die ins Thylakoidlumen abgegebenen Protonen tragen zum Protonengradienten bei.

Auch eine Rolle in der Regulation der LHC II „state transition“ wird angenommen [Vener et al., 1995; 1997; Hamel et al., 2000].

1.1.2.1.4. ATP – Synthase (CF₀/CF₁ – Komplex)

Die ATP – Synthasekomplexe der Chloroplasten liegen überwiegend in den Stromabereichen der Thylakoide [Stryer, 1994].

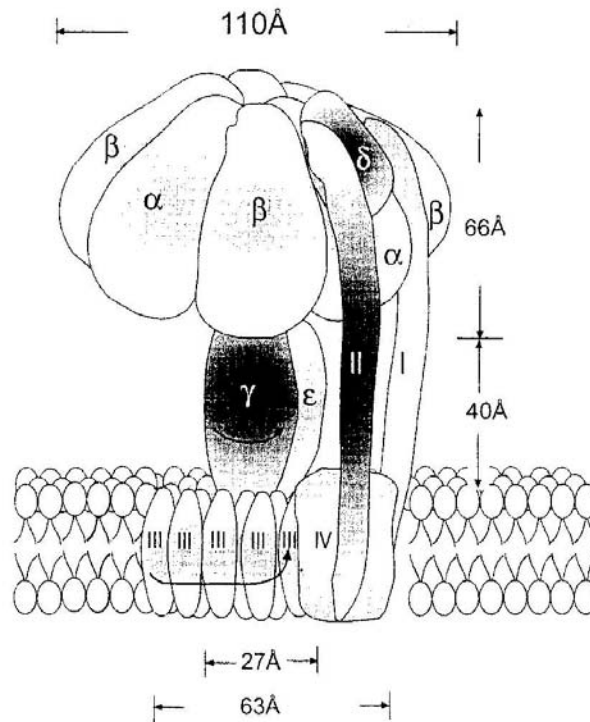


Abbildung 6: Modell der ATP – Synthase

Untereinheiten I, II, III, IV = Untereinheiten b, b', c, a
 dunkle Untereinheiten = kerncodiert; helle Untereinheiten = plastidär codiert
 (aus: Wollman et al. „The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes“
 © 1999)

Eine ATP – Synthase besteht aus dem köpfchenartigen CF₁ – Komplex, welcher aus fünf verschiedenen Polypeptide aufgebaut ist:

α_3 (atpA), β_3 (atpB), γ (atpC), δ (atpD), ϵ (atpE) und dem stielartigen CF₀ – Komplex, welcher aus vier verschiedenen Untereinheiten besteht:

a (atpI), b (atpF), b' (atpG), c₁₂ (atpH).

Die Gene, welche für die ATP – Synthaseproteine codieren, sind größtenteils im Plastom codiert, bei Höheren Pflanzen sind im Laufe der Evolution lediglich die Gene atpC, atpD und atpG ins Kerngenom ausgelagert worden.

Diese werden nun im Cytoplasma translatiert, als Vorläuferproteine in die Chloroplasten importiert und hier zum reifen Protein prozessiert.

Bei Prokaryonten und auch bei vielen Eukaryonten treten die Gene für die CF_0 und CF_1 Komplexe als Cluster auf, eine Ausnahme bildet die Grünalge *Chlamydomonas*, bei der die Gene über das gesamte Plastom verstreut sind [Groth & Strotmann, 1999].

Die Funktion der ATP – Synthasen ist die Produktion von ATP aus $ADP + P_i$, ein Vorgang, welcher vom kontrollierten Ausstrom von Protonen, dem Konzentrationsgefälle folgend aus dem Lumen der Thylakoide ins Stroma der Chloroplasten, angetrieben wird und auch als **Photophosphorylierung** bezeichnet wird. Die Produktion eines ATP Moleküls ist dabei mit dem Austritt von vier Protonen gekoppelt. Ein aktuelles Modell geht davon aus, daß pro Synthasekomplex drei α Untereinheiten zusammen mit drei β Untereinheiten Heterohexamere bilden, welche zusammen drei funktionell unterschiedliche Bindestellen für Adenosinphosphatmoleküle aufweisen.

Die durch den Protonenstrom ausgelöste Rotation der zentral gelegenen γ Untereinheit [Noji et al., 1997] bewirkt strukturelle Änderungen des Heterohexamers und sorgt so für die ATP – Synthese aus ADP und P_i .

Die chloroplastidären ATP – Synthasen unterliegen strikten Kontrollmechanismen; sie sind nur im Licht aktiv, wenn ein Protonengradient über die Membran vorliegt. Ist dieser nicht vorhanden, wird die unerwünschte Gegenreaktion in Form der ATP Hydrolyse durch effiziente Blockierung des Enzyms sichergestellt.

Der Prozeß der Photophosphorylierung erinnert stark an die oxidative Phosphorylierung im Zuge der Atmung, welche bei Eukaryonten an der inneren Membran der Mitochondrien abläuft und mit dem kontrollierten Protonenausstrom aus dem Intermembranraum in die mitochondrielle Matrix gekoppelt ist. Diese funktionelle Analogie ist bedingt durch die strukturelle Homologie der chloroplastidären und der mitochondriellen ATP – Synthasen.

1.1.2.2. Elektronentransport vom Wasser zum NADP[±]

Der **Elektronentransport** von Wasser zum NADP⁺ wird als nichtzyklischer (linearer) Elektronentransport bezeichnet und verläuft wie folgt [Hill & Bendall, 1960]:

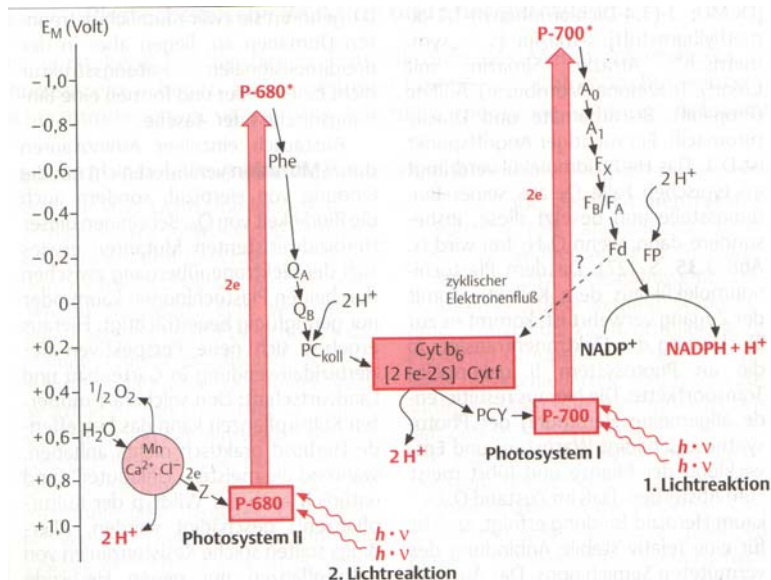


Abbildung 7: Z – Schema des photochemischen Elektronentransports

A₀ = Chl a; A₁ = Phyllochinon; Cyt = Cytochrom; Fd = Ferredoxin; FP = Flavoprotein;
 F_x = Polypeptid mit 4Fe – 4S Zentrum; PC_{koll} = Plastochinon – Kollektiv; PCY = Plastocyanin;
 Phe = Pheophytin a; Q_{A/B} = Plastochinon
 (aus: G. Richter: „Stoffwechselfysiologie der Pflanzen“ ©1998)

Durch die gesammelte Lichtenergie wird ein Elektron des P₆₈₀ Dimers des Photosystems II angeregt und an ein Pheophytinmolekül weitergegeben.

Die positive Ladung des P₆₈₀⁺ wird dann durch ein vom wasserspaltenden Komplex nachgeliefertes Elektron ausgeglichen.

Vom Primärakzeptor Pheophytin gelangt das Elektron dann über das fest an das D2 – Molekül gebundene Plastochinon Q_A zum reversibel an das D1 – Molekül gebundene Plastochinon Q_B.

Nachdem auf gleichem Wege ein zweites Elektron geliefert wurde, reagiert das Plastochinon mit 2 Protonen zu Plastohydrochinon (QH₂) und löst sich vom D1 – Protein, an welches sich nun ein anderes Plastochinon anlagert.

Dem Redoxzustand des PQ – Pools werden entscheidende regulatorische Funktionen zugeschrieben [s. Kap.1.3.].

Das Plastohydrochinon dockt an der Q_o Region am Cytb₆/f Komplex an, von diesem werden zwei Elektronen übernommen und auf Plastocyaninmoleküle übertragen. Das Plastohydrochinon wird so wieder zum Plastochinon oxidiert, die zwei Protonen werden ins Thylakoidlumen abgegeben (→ Protonengradient).

Da das Plastocyanin ein Polypeptid ist, welches ein Kupferion trägt, das zwischen den Valenzzuständen Cu^{2+} und Cu^+ wechselt, kann es die Elektronen als beweglicher Elektronentransporter zum PS I – Komplex transportieren.

Wird nun im Photosystem I ein Elektron des P_{700} durch die Lichtenergie angeregt und auf A_0 übertragen, kann das verbleibende P_{700}^+ durch ein Elektron des Plastocyanins neutralisiert werden.

Vom A_0 gelangt das Elektron dann über A_1 , F_x und F_A/F_B (4Fe – 4S Komplexe) zum Ferredoxin.

Ein Flavoprotein, die Ferredoxin– $NADP^+$ –Oxidoreduktase ist dann in der Lage, die Elektronen vom Fd auf $NADP^+$ zu übertragen, welches unter Aufnahme von Protonen zum stabilen Reduktionsäquivalent $NADPH + H^+$ reduziert wird.

Neben diesem nichtzyklischen Elektronentransport sind auch zyklische Elektronenbewegungen möglich.

So wird ein Elektronentransport vom F_A/F_B zurück zum Plastochinonpool über den Cyt b₆/f Komplex angenommen, welcher demnach auch in der Lage ist, Plastochinon zu reduzieren (Q – Zyklus).

Ein weiterer zyklischer Vorgang spielt sich wahrscheinlich um den PS II – Komplex ab, so wird diskutiert, daß das Cyt b₅₅₉ des Photosystems II Elektronen vom Q_B übernimmt und zum P_{680} Chlorophyll a Dimer zurückführt, evt. um eine zu starke Oxidation des P_{680} nach starkem Lichteinfall zu verhindern [Falkowski et al., 1986; De Las Rivas et al., 1995].

1.2. Phosphorylierungen der Thylakoidproteine als regulatorisches Prinzip

Es ist unabdingbar, daß die komplizierten Vorgänge, die in der Thylakoidmembran zum Teil zeitlich versetzt, zum Teil aber auch gleichzeitig ablaufen, einer genauen Kontrolle unterliegen müssen. Diese Kontrolle wird hier, wie bei vielen anderen regulatorischen Prozessen des Organismus, unter Anderem auch durch reversible Phosphorylierungen von Schlüsselproteinen durch spezielle Kinasen vermittelt.

1.2.1. Phosphoproteine der Thylakoidmembran

Phosphoproteine treten in Chloroplasten in hoher Konzentration und in fast allen Kompartimenten auf, so sind sie z.B. im Stroma, in den Ribosomen, in äußerer und innerer Hüllmembran sowie im dazwischen liegenden Raum und in der Thylakoidmembran nachgewiesen [Bennet, 1991].

In der photosynthetischen Membran treten die phosphorylierten Proteine in erster Linie assoziiert mit dem Photosystem II auf. So werden sowohl Teile des LHC II als auch Proteine des PS II – Komplexes reversibel phosphoryliert.

- LHC II – Phosphoproteine:

In Höheren Pflanzen können die LHC II – Typ 1 (lhcb1) und LHC II – Typ 2 (lhcb2) Proteine in phosphorylierter Form vorkommen, auch eine Phosphorylierung von CP29 (lhcb4) wurde nachgewiesen [Bassi et al., 1997]. In *Chlamydomonas reinhardtii* treten auch die Proteine p9 und p10 (die den Proteinen CP29 (lhcb4) und CP26 (lhcb5) entsprechen sollen) als Phosphoproteine auf [Keren & Ohad, 1998].

- Photosystem II Phosphoproteine:

In Höheren Pflanzen werden die Proteine D1 (psbA), D2 (psbD), CP43 (psbC) und Untereinheit H (psbH) reversibel phosphoryliert.

In *Chlamydomonas reinhardtii* hingegen wird D1 nicht phosphoryliert.

Sowohl die LHC II – als auch die PS II – Proteine werden N – terminal, auf der dem Stroma exponierten Seite, phosphoryliert. Die phosphorylierte Aminosäure ist in jedem Fall ein **Serin** oder **Threonin**, es handelt sich also um eine Esterbindung zwischen der Phosphatgruppe und der Hydroxylgruppe am β – Kohlenstoffatom der Aminosäure.

Funktionell haben die Phosphorylierungen aber unterschiedliche Auswirkungen, so wird die LHC II „state transition“ von der LHC II – Phosphorylierung, der PS II „repair cycle“ von der PS II – Phosphorylierung kontrolliert [Bennet, 1991].

1.2.2. LHC II „state transition“

Der lineare photosynthetische Elektronentransport läuft dann optimal, wenn Photosystem I und Photosystem II in gleichem Maße mit Energie des Sonnenlichtes versorgt werden.

Wird eines der Photosysteme bevorzugt angeregt (z.B. durch künstliche Bestrahlung mit Licht $\lambda = 650$ nm für PS II oder $\lambda = 710$ nm für PS I) so entsteht ein Ungleichgewicht, welches aber zum Teil durch einen adaptiven, nach kurzer Zeit einsetzenden Prozeß ausgeglichen werden kann.

Dieser später als LHC II „state transition“ bezeichnete Vorgang [Allen et al., 1981] wurde erstmals von *Bonaventura* et al. [Bonaventura & Myers, 1969] und *Murata* [Murata, 1969] im Jahr 1969 beschrieben. Er beruht auf der reversiblen Fähigkeit eines Teils des äußeren Antennenkomplexes (LHC II) des PS II – Komplexes diesen zu verlassen und statt dessen das Photosystem I mit Energie zu beliefern.

Der LHC II – Komplex versorgt im nicht phosphorylierten Zustand das Photosystem II mit Lichtenergie (state 1). Die Phosphorylierung der LHC II – Hauptproteine (die Produkte der *lhcb1* und *lhcb2* Gene bei Höheren Pflanzen) erfolgt N – terminal auf der Stromseite der Thylakoidmembran durch spezielle Kinasen [s. Kap. 1.3.2.] und führt zur Monomerisierung des betroffenen trimeren LHC II – Komplexes. Ein Teil des LHC II – Komplexes löst sich vom PS II – Komplex ab und wandert vom Grana- in den Stromabereich der Thylakoide.

Hier versorgt er nun verstärkt den PS I – Komplex mit Lichtenergie (state 2), den Wechsel der Zustände bezeichnet man als state 1 – state 2 transition.

Für die laterale Migration des mobilen LHC II – Teils sind verschiedene Begründungen in der Diskussion [Gal et al., 1997].

Da sowohl die stationären als auch die mobilen Teile des LHC II – Komplexes phosphoryliert werden, wurde ursprünglich angenommen, daß die auftretenden Abstoßungskräfte der Migration zu Grunde liegen.

Ein neueres Erklärungsmodell geht davon aus, daß durch die Phosphorylierung eine strukturelle Veränderung der LHC II – Peptide induziert wird, welche eine Trimerisierung [s. Kap.1.1.2.1.1.] verhindert und somit die laterale Diffusion ermöglicht.

Einer völlig anderen Theorie zu Folge ist der Vorgang der „state transition“ weniger die Konsequenz einer lateralen Migration von LHC II – Teilen als vielmehr die Folge einer begrenzten Auflösung der Grana – Stapel [Georgakopoulos & Argyroudi-Akoyunoglou, 1994].

Wenn die LHC II – Kinasen deaktiviert werden und die antagonistischen Phosphatasen für eine Dephosphorylierung der LHC II – Proteine sorgen, folgt die Reassoziierung der dislozierten LHC II – Teile mit dem Photosystem II, was als state 2 – state 1 transition bezeichnet wird.

Durch den Mechanismus der „state transition“ ist gewährleistet, daß die Energie des Sonnenlichtes bei wechselnden Umwelteinflüssen optimal zwischen den beiden Photosystemen verteilt wird.

So wird nicht nur die Produktion von ATP und NADPH optimiert, sondern auch einer Schädigung der Thylakoidkomplexe vorgebeugt.

Die Kontrolle der „state transition“ erfolgt wahrscheinlich in erster Linie über die verantwortlichen Kinasen [s. Kap.1.3.2.]. Ob die antagonistischen Phosphatasen ebenfalls regulatorische Funktion besitzen oder ob sie konstitutiv aktiv sind ist noch nicht zweifelsfrei geklärt [Allen, 1992].

Der Wechsel zwischen den zwei Assoziationszuständen des LHC II – Komplexes läßt sich auf Grund einer Änderung der Photosystem II Chl a – Fluoreszenz verfolgen.

Die bei Raumtemperatur gemessene Chl a – Fluoreszenz rührt in erster Linie vom Chl a des PS II – Komplexes her. Wenn nun zusätzlich zu den Kernantennen auch der LHC II – Antennenkomplex am Photosystem II andockt und dieses mit Energie versorgt (state 2 – state 1 transition), wird die Fluoreszenzemission durch die zusätzlichen Chl a – Moleküle verstärkt.

Diese Änderung im Fluoreszenzspektrum kann zum routinemäßigen Auffinden von „state transition“ Mutanten herangezogen werden [Kruse et al., 1999].

1.2.3. Photoinhibition und PS II „repair cycle“

Werden photosynthetische Organismen oder auch isolierte Chloroplasten starkem Lichtstreß ausgesetzt, so kann eine Abnahme der gesamten PS II – Aktivität beobachtet werden.

Dieser Vorgang wird als Photoinhibition bezeichnet.

Die Ursache für diesen Vorgang ist der Abbau von funktionellen PS II – Komplexen. Hierbei zerfallen die im funktionellen Zustand als Dimer vorliegenden PS II – Kernkomplexe

[s. Kap.1.1.2.1.1.; Rögner et al., 1996] zuerst zu Monomeren. Dann werden die D1 Untereinheiten ausgebaut und durch de novo synthetisierte D1 Proteine ersetzt [Barbato et al., 1992].

Der D1 – *turnover* und somit die gesamte Photoinhibition unterliegen offenbar einer Redoxregulation.

Ursprünglich wurde auf Grund von Untersuchungen an *Spirodela oligorrhiza* [Callahan et al., 1990; Ghirardi et al., 1992] angenommen, daß die N – terminale Phosphorylierung der D1 Proteine deren Abbau vorausgeht, durch Untersuchungen an Spinat und Erbse geht man aber bei Höheren Pflanzen heute davon aus, daß hier die D1 Phosphorylierung viel eher eine Schutzfunktion gegenüber der Degradation bedeutet. So zeigten *Rintamäki* et al., daß unter Starklichtbedingungen nahezu alle D1 Proteine der PS II – Komplexe in den Granastapeln, also sowohl intakte als auch beschädigte, phosphoryliert sind und daß die D1 Degradation von beschädigten D1 Proteinen davon abhängig ist, daß das phosphorylierte D1 Protein zunächst dephosphoryliert wird [Rintamäki et al., 1996].

Ein aktuelles Modell geht davon aus, daß die Regulation des *turnovers* auch auf der Ebene des Übergangs vom dimeren zum monomeren PS II – Kernkomplex stattfinden. Dies ist die Schlußfolgerung aus der Beobachtung, daß der nicht phosphorylierte PS II – Dimerkomplex bei photoinhibitorischen Bedingungen in Monomere zerfällt, die phosphorylierte Form hingegen ist stabiler und monomerisiert nicht [Kruse et al., 1995; 1997].

Ist nach dem Zerfall des Dimers das D1 Protein offen zugänglich, kann es durch Proteasen angegriffen und abgebaut werden.

Die für die Dephosphorylierung zuständigen Phosphatasen scheinen bei Höheren Pflanzen weder licht- noch redoxkontrolliert zu sein [Silverstein et al., 1993].

Interessanter Weise ist dieses Prinzip der Photoinhibition auf Höhere Pflanzen beschränkt, da eine Phosphorylierung des D1 Proteins bei *Chlamydomonas reinhardtii* und anderen niederen photosynthetischen Organismen nicht auftritt. Hier wird angenommen, daß durch die Phosphorylierung des D2 Proteins eine strukturelle Veränderung des Photosystems II induziert wird, welche die proteolytische Spaltung des D1 Proteins erlaubt [Gal et al.,

1997]. Im physiologischen Kontext ist die Photoinhibition als ein Schutzmechanismus vor oxidativen Schädigungen zu betrachten.

Durch die drastische und energieaufwendige Maßnahme des Abbaus und Wiederaufbaus von D1 Proteinen im „repair cycle“ werden weitere oxidative Schäden an den Thylakoidkomplexen verhindert.

1.3. Serin/Threonin – Proteinkinasen in eukaryontischen photoautotrophen Organismen

Neben anderen wie z.B. den Tyrosin Proteinkinasen [Ullrich & Schlessinger, 1990] haben auch Serin/Threonin – Proteinkinasen wichtige Aufgaben in unterschiedlichsten physiologischen Bereichen der Zelle.

Seitdem die erste cDNA – Sequenz einer Serin/Threonin – Proteinkinase einer Höheren Pflanze im Jahr 1989 veröffentlicht wurde [Lawton et al., 1989] steigt das Interesse an dieser Proteinklasse ständig.

Prinzipiell gibt es vier Ansatzmöglichkeiten, Gene pflanzlicher Proteinkinasen zu identifizieren:

- Ausnutzung von **Nucleotid – Sequenzhomologien**: Genidentifikation mittels Polymerase Kettenreaktion (*PCR*) auf Grund von konservierten Sequenzen oder mittels *Screening* von cDNA – Bänken mit Kinase – DNAs von anderen (nicht pflanzlichen) Organismen
- Ausnutzung von **funktionellen Homologien**: Genidentifikation durch Komplementierung von Mutationen
- Ausnutzung **bekannter Aminosäuresequenzen**: Genidentifikation durch Aufreinigung des Proteins und teilweise Sequenzierung; mittels diverser *PCR* – Methoden kann dann das komplette Gen erhalten werden
- Untersuchungen von **Mutanten**: Genidentifikation durch Methoden wie z.B. *chromosome walking* oder *genetic mapping* bei Mutanten, welche einen interessanten Phänotyp zeigen

Weit mehr als über pflanzliche Kinasen ist über tierische Kinasen und Kinasen des Modellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* bekannt.

Hier erfüllen sie unterschiedliche Aufgaben, sie vermitteln beispielsweise Antwortreaktionen auf extrazelluläre Signalmoleküle oder Kontakt mit Nachbarzellen,

spielen wichtige Rollen bei Immunreaktionen, bei der Regulierung des Zellzyklus oder bei Reaktionen auf Nährstoffmangel.

Homologievergleiche mit diesen Kinasen, deren Funktion geklärt ist, lassen auch Rückschlüsse auf eine mögliche Rolle unbekannter pflanzlicher Kinasen zu.

Pflanzliche Proteinkinasen (PK) lassen sich in verschiedene Gruppen einteilen [Hardie, 1999]:

- Kalzium – abhängige PK: benötigen Kalziumionen oder Calmodulin zur Aktivierung
- SNF1 verwandte PK: werden bei Glukosemangel oder durch AMP aktiviert
- Rezeptor ähnliche PK: sind Transmembranproteinkomplexe, werden durch Ligandenbindung aktiviert und dienen der Signaltransduktion
- MAP Kinasen und Verwandte: werden durch Hormone oder Umweltstimuli aktiviert und funktionieren kaskadenartig.
- Cyclin – abhängige PK: werden durch Bindung mit dem Protein Cyclin aktiviert und sind z.B. bei der Regulation des eukaryontischen Zellzyklus entscheidend. Sie zeichnen verantwortlich für den Eintritt der Zelle in die Synthesephase (S Phase).
- Casein PK: scheinen *in vivo* nicht strikt reguliert zu werden und haben deshalb eine permanente Kinaseaktivität. Sie phosphorylieren Serin- und Threoninreste in Nachbarschaft von sauren Seitenketten.
- GSK3 / Shaggy PK: werden durch Phosphorylierung inaktiviert und sind von Bedeutung im Insulinstoffwechsel (GSK3) bzw. in der Entwicklung (Shaggy).

Der Vollständigkeit halber seien noch die weiteren bei *Arabidopsis thaliana* klonierten Kinasen erwähnt, welche nur kleine Gruppen bilden oder sich nicht definitiv zuordnen lassen:

--- CTR1/Raf ähnliche PK

--- LAMMER PK

--- S6 Kinasenhomologe

--- PVPK1 PK

--- NAK PK

--- Tousled Kinase, NPH1 Kinase

Für die regulatorischen Vorgänge in der Thylakoidmembran von besonderem Interesse sind diejenigen Enzyme, welche Phosphatgruppen auf die PS II – Proteine übertragen (PS II – Kinasen) respektive jene, die für die Phosphorylierung des light harvesting Komplexes zuständig sind (LHC II – Kinasen).

1.3.1. PS II – Kinasen

Die PS II – Kinasen sind bisher nicht identifiziert. Auf Grund von Vergleichen der Phosphorylierungsmuster der PS II – Phosphoproteine mit den LHC II – Phosphoproteinen geht man heute davon aus, daß sowohl die PS II – Kinasen als auch die LHC II – Kinasen einer Redox – Kontrolle unterliegen, diese jedoch nicht identisch ist [Bennet, 1991]:

- photoinhibitorische Bedingungen verhindern nicht die Phosphorylierung von PS II – Proteinen im Gegensatz zur LHC II – Phosphorylierung
- Bicarbonat blockiert die PsbH – und fördert die LHC II – Phosphorylierung
- DBMIB blockiert die LHC II – Phosphorylierung stärker als die PS II – Phosphorylierung
- Der Cyt b6/f Komplex scheint für die PS II – Phosphorylierung nicht nötig zu sein, was durch Analysen von Mutanten belegt wurde

Die Vermutung, daß die PS II – Kinasen *in vivo* durch den Redox Zustand des PQ – Pools kontrolliert werden, wird auch durch die Beobachtung gestützt, daß DCMU (ein chemischer Inhibitor des Elektronentransports, welcher an die Plastochinonbindestelle des D1 Proteins bindet und so eine Reduktion des PQ Pools verhindert) eine Phosphorylierung der PS II – Proteine *in vitro* verhindert.

1.3.2. LHC II – Kinasen

Trotz intensiver Bemühungen sind auch die für die Phosphorylierung der LHC II – Proteine verantwortlichen Kinasen noch nicht eindeutig identifiziert. Interessante Kandidaten sind die von *Snyders* und *Kohorn* in *Arabidopsis thaliana* beschriebenen *TAKs* [s. Kap.1.3.2.1., *Snyders & Kohorn*, 1999].

Da die LHC II – Kinasen auf Änderungen von Umweltbedingungen reagieren, stellen sich die Fragen nach dem verantwortlichem Sensor und der Art der Weiterleitung der Signale.

Zur Klärung dieser Fragen wurden photosynthetische Organismen in unterschiedlichen Licht- und Nährstoffbedingungen angezogen und mit verschiedenen Chemikalien behandelt, die an unterschiedlichen Stellen in der Elektronentransportkette eingreifen. Auch Chloroplasten oder isolierte Thylakoide wurden untersucht.

In vitro konnte die Aktivierung der LHC II – Kinasen sowohl durch Licht als auch im Dunkeln durch Zugabe von reduzierenden Agenzien [Allen et al., 1981] oder durch niedrigen pH Wert [Vener et al., 1995] erzielt werden.

Bisherigen Ergebnisse legen die Vermutung nahe, daß *in vivo* der Redoxzustand des Plastochinonpools als Sensor fungiert und mittelbar kontrollierend auf die LHC II – Kinasen wirkt. Dieses Modell ist einleuchtend, weil der Plastochinonpool die Elektronen in der Transportkette zwischen PS II und PS I vermittelt. Somit spiegeln sich Ungleichgewichte in der Anregung der Photosysteme direkt im Redoxzustand des Plastochinonpools wieder: wird das Photosystem II stark angeregt, folgt eine Reduktion des PQ – Pools, wird das Photosystem I über die Maßen angeregt, folgt eine Oxidation des Pools. Ein reduzierter Plastochinonpool ist allerdings neueren Untersuchungen zufolge alleine nicht ausreichend, um die LHC II – Kinasen zu aktivieren.

Bei Untersuchungen an Spinat – Thylakoiden wurde gezeigt, daß zusätzlich reduzierte Plastochinonmoleküle (=Plastochinolmoleküle) mit der reduzierten Q_o Region des Cyt b6/f Komplexes interagieren müssen, bevor die LHC II – Kinasen aktiv werden [Vener et al., 1995; 1997].

Deaktivierend auf die LHC II – Kinasen wirken photoinhibitorische Bedingungen sowie die Zugabe von DCMU und DBMIB (ein chemischer Inhibitor des Elektronentransports, der die Q_o Region des Cyt b6/f Komplexes blockiert). Durch die Kinaseaktivität werden nicht alle möglichen Phosphorylierungsstellen der LHC II – Proteine mit einer Phosphatgruppe verestert, vielmehr werden nur in etwa 10 – 20 % beladen [Gal et al., 1997].

Substrate der LHC II – Kinasen bei Höheren Pflanzen sind die LHC II – Hauptproteine (die Produkte der *lhcb1* und *lhcb2* Gene). Durch deren Phosphorylierung wird die state 1 – state 2 transition eingeleitet [s. Kap. 1.2.2.].

Da CP 29 sowohl eine eigene Phosphorylierungsstelle besitzt als auch unter photoinhibitorischen Bedingungen und unabhängig vom Cyt b6/f Komplex phosphoryliert wird, scheint hier ein anderer Mechanismus als für die anderen LHC II – Phosphoproteine vorzuliegen [Gal et al., 1997].

1.3.2.1. TAK1 – 3 in *Arabidopsis thaliana*

Im Jahr 1999 führten *Shaun Snyders* und *Bruce Kohorn* von der *Duke University* zur Identifizierung der LHC II – Kinasen in *Arabidopsis thaliana* eine Reihe von Experimenten durch [Snyders & Kohorn, 1999].

In Abwandlung eines von ihnen zur Identifizierung von sequenzspezifischen Proteasen entwickelten Untersuchungssystems [Smith & Kohorn, 1991] mittels der Hefe

Saccharomyces cerevisiae wurde der N – terminale Bereich des LHC II – Hauptproteins, welcher im Zuge der LCH II „state transition“ an einem Threonin phosphoryliert wird, in den Hefetranskriptionsfaktor Gal4 inkloniert. Anschließend wurden die Hefezellen mit Plasmiden transformiert, die eine *Arabidopsis* cDNA – Bank enthielten.

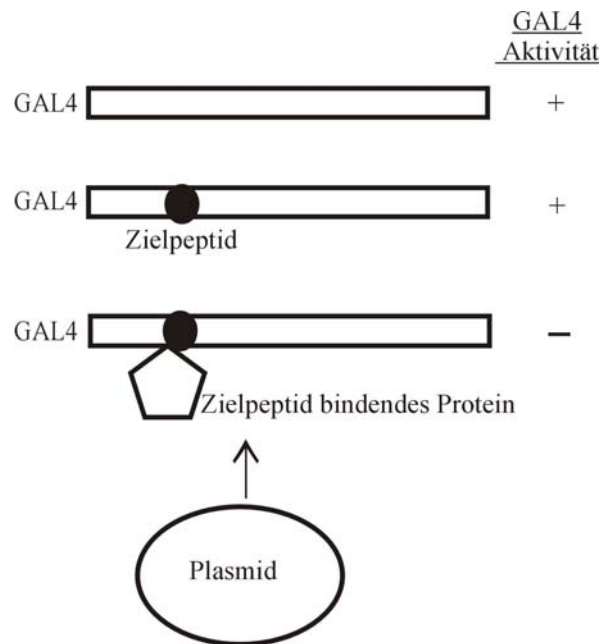


Abbildung 8: Identifizierung von cDNAs von Proteinen, die mit Zielpeptiden interagieren

GAL = Galaktose Transkriptionsfaktor

Die Idee war folgende: sobald eine der cDNAs in den Plasmiden für ein Protein codiert, welches mit dem N – Terminus des LHC II – Proteins interagiert, wird dieses Protein an das Peptidstück binden, welches in den Gal4 Transkriptionsfaktor inkloniert wurde.

Dadurch können diese Zellen selektiert werden, da sie Galaktose nicht mehr metabolisieren können.

Anschließend kann das Plasmid isoliert werden und die entsprechende *Arabidopsis* cDNA – erhalten werden.

Diese Untersuchung lieferte die cDNA, welche für eine Proteinkinase mit einem Molekulargewicht von 68 kDa codiert. Weitere Untersuchungen zeigten allerdings, daß diese Kinase nicht in den Thylakoiden lokalisiert ist, sondern mit der Zellwand assoziiert vorliegt, woraufhin ihr der Name *WAK1* (wall associated kinase) gegeben wurde.

Da die Kinasedomäne von *WAK1* aber der gesuchten LHC II – Kinase ähnlich sein sollte, wurde diese in *E. coli* exprimiert und ein Antikörper gegen das gereinigte Peptid produziert.

Der Antikörper identifizierte in *Arabidopsis* Blattextrakten spezifisch ein 55 kDa Protein. Weitere Experimente zeigten, daß dieses Protein in den Thylakoiden lokalisiert ist, und eine LHC II – spezifische Kinaseaktivität zeigt. Durch Datenbankanalysen konnten zwei weitere Proteine identifiziert werden, welche eine ~90 prozentige Homologie aufwiesen.

Snyders und *Kohorn* nannten die Proteine *TAKs 1-3* (thylakoid associated kinases).

Besonders interessant an *TAK1* ist ein spezielles Aminosäuremotiv, welche durch das abwechselnde Auftreten von Serin und Glycin gekennzeichnet ist (SG – Motiv). Dieses Motiv ist vom TGFβ1 Rezeptor (transforming growth factor) bei Metazoen bekannt.

Nach Bindung eines Signalmoleküls lagern sich die beiden Proteine TGFβ1–Rezeptortyp1 und TGFβ1–Rezeptortyp2 zum Dimer zusammen. Das Typ2 Protein phosphoryliert dann das Typ1 Protein, wobei das SG – Motiv zur Erkennung wichtig ist.

Das Dimer entwickelt dann eine cytoplasmatische Kinaseaktivität und dient so der Signaltransduktion. Laut *Snyders* und *Kohorn* könnte das SG – Motiv bei den *TAKs* eine ähnliche Funktion besitzen. Mit Hilfe von Computeranalysen ließen sich wahrscheinliche funktionelle Bereiche bei *TAK1* identifizieren:

Modell des TAK1 Proteins

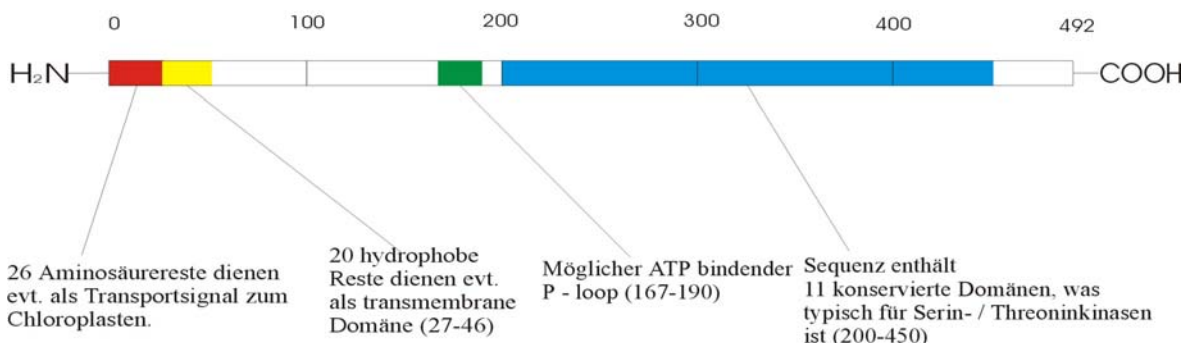


Abbildung 9: Modell des *TAK1* – Proteins

1.4. *Chlamydomonas reinhardtii* als Versuchsobjekt

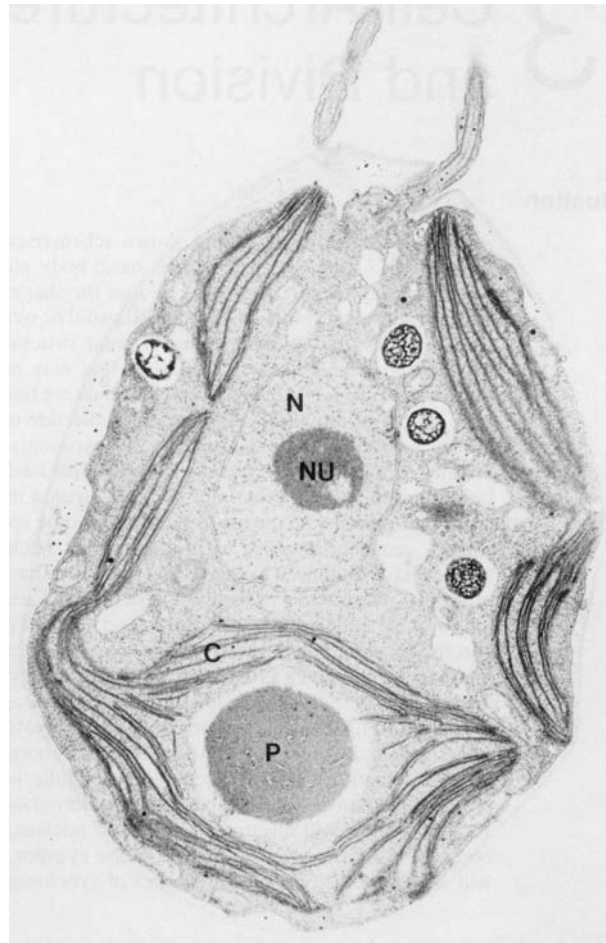


Abbildung 10: *Chlamydomonas reinhardtii*

c = Chloroplast; n = Nucleus; nu = Nucleolus; p = Pyrenoid

(aus: Harris, E.H., „*The Chlamydomonas sourcebook*“ ©1989)

Die einzellige Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii* ist ein beliebtes Untersuchungsobjekt in einer Vielzahl von Forschungsbereichen. So sind anhand dieses Organismus Fortschritte in der Erforschung von Organellen- und Kerngenom, Plastidenentwicklung, Flagellenbau und Funktionsweise, Gametenentwicklung und Paarung, Zellwandsynthese, Phototaxis, zirkadianem Rhythmus, Kohlenstoff-, Stickstoff- und Schwefelmetabolismus und Photosynthese gemacht worden.

Gründe für die Beliebtheit sind neben der einfachen Haltung, Handhabung und schnellen Vermehrung, die sowohl vegetativ als auch in einem einfachen, geschlechtlichen Zyklus ablaufen kann, vor allem das für einen Eukaryonten kleine, haploide Genom, das

Vorhandensein eines Chloroplasten sowie die für die Photosyntheseforschung besonders wichtige Fähigkeit, fakultativ heterotroph mit Acetat als alleiniger Kohlenstoffquelle zu wachsen. Durch letztere Fähigkeit sind Mutationen in der Photosynthese nicht unbedingt letal, so lange Acetat im Nährmedium supplied ist.

Hinzu kommt, daß heute einfache Methoden zur Verfügung stehen, um das Kerngenom und das Plasmon zu transformieren [Hippler et al., 1998].

1.4.1. Historie

Schon im Jahre 1918 wurden mit Mutanten von *Chlamydomonas* erste Isolierungs- und Kreuzungsversuche durchgeführt. Die systematische Erforschung des Organismus beginnt aber ab der Mitte der vierziger Jahre mit der Isolation und Verbreitung der wichtigsten Laborstämme. Diese stammen ab von einer Bodenprobe, die 1945 von *G. M. Smith* nahe Amherst, in Massachusetts (USA) gesammelt und untersucht wurde.

Smith leitete die Stämme an einige Forscher weiter, unter anderem an *R. P. Levine* und *W. T. Ebersold*, an *R. Sager* und an *J. Hartshorne*, die dann unabhängig voneinander arbeiteten. Heute gibt es deshalb drei prinzipielle Abstammungslinien, welche sich alle bis auf die ursprüngliche Probe zurückverfolgen lassen [Harris, 1998].

Neben den Laborstämmen ausgehend von *Smith* sind heute auch verschiedene unabhängig isolierte Stämme im Gebrauch. Als wichtige Unterscheidungsmerkmale dienen neben morphologischen und physiologischen Kriterien auch die Insertionsmuster der Transposons *Gulliver* und *TOC* [s. Kap.1.4.3.1.1.], durch welche sich verwandtschaftliche Beziehungen auf molekularer Basis nachweisen lassen.

In der Photosyntheseforschung wurde *Chlamydomonas* Mitte der sechziger Jahre etabliert [Togasaki & Surzycki 1998]. Zu diesem Zeitpunkt wurden Experimente mit intakten Zellen im Wesentlichen an den einzelligen Grünalgen *Chlorella* und *Scenedesmus*, dem Cyanobakterium *Anacystis* oder dem Flagellaten *Euglena* durchgeführt, wohingegen Chloroplasten oder Thylakoide bevorzugt aus Spinat oder Erbse isoliert wurden.

Chlamydomonas wurde in den Laboratorien von *Levine* und anderen zunächst in erster Linie für Mutantanalysen eingesetzt, erst wurden Aminosäure – auxotrophe Mutanten gesucht, später auch Acetat – benötigende Mutanten. Letztere ermöglichten es, durch Analyse der Mutation Rückschlüsse auf den photosynthetischen Ablauf im Wildtyp zu ziehen und generelle Aussagen über photosynthetische Prozesse zu formulieren.

Ein gutes Beispiel für den Erfolg dieses Ansatzes war die Aufklärung der Anordnung von Cytochrom f und Plastocyanin. Auf Grund einer fehlerhaften Interpretation von experimentellen Daten wurde angenommen, daß Plastocyanin vor dem Cyt f in der Elektronentransportkette angeordnet sei [Fork & Urbach, 1965]. *Gorman* und *Levine* konnten aber durch Experimente an zwei Mutanten, einer Cyt f⁻ Mutante und einer Plastocyanin⁻ Mutante, demonstrieren, daß die Reihenfolge genau umgekehrt ist [Gorman & Levine, 1965].

Bis heute ist die Mutantanalyse eine der wichtigsten Methoden in der Arbeit mit *Chlamydomonas*. Die Möglichkeiten haben sich aber durch die gewaltigen Fortschritte in der Molekularbiologie einerseits und die Entwicklungen von neuen Techniken für *Chlamydomonas* andererseits enorm erweitert.

1.4.2. Systematik und Morphologie

Chlamydomonas reinhardtii wird folgendermaßen systematisch eingeteilt [Harris, 1989; von Sengbusch et al., 1996]:

- Reich: *Regnum phytale* (Pflanzenreich)
- Abteilung: *Chlorophyta* (Grünalgen)
- Klasse: *Chlorophyceae*
- Ordnung: *Volvocales*
- Familie: *Chlamydomonadaceae*
- Gattung: *Chlamydomonas*
- Art: *Reinhardtii*

1.4.2.1. Gattung Chlamydomonas

Die Gattung *Chlamydomonas* (griechisch: *chlamys* = Umhang, Mantel ; *monas* = einsam) wurde von *C.G. Ehrenberg* (1833) benannt.

Chlamydomonas ist Mitglied der Familie der *Chlamydomonadaceae*, die aus insgesamt 33 Gattungen mit ungefähr 800 Arten besteht.

Die zahlreichen *Chlamydomonas* – Arten (>450) können sich in Größe, Form, Flagellenzahl und andere Kriterien unterscheiden, allen gemeinsam ist aber die polare Struktur mit den apikalen Flagellen und dem basalen Chloroplasten, welcher einen oder

mehr Pyrenoide [s. Kap.1.4.2.2.] einschließt. In der Regel sind die Arten der Gattung *Chlamydomonas*, wie alle *Volvocales*, begeißelt und frei beweglich im wässrigen Milieu, manche Arten können aber unter bestimmten Voraussetzungen (z.B. Trockenheit) in ein unbegeißeltes sogenanntes Palmellastadium übergehen [von Sengbusch et al., 1996].

Sie besitzen eine ausgeprägte Zellwand von unterschiedlicher Dicke, manche Arten scheiden auch einen schleimigen Polysaccharidfilm aus. Die meisten Arten weisen einen oftmals roten Augenfleck auf. Auch sind meist zwei oder mehr kontraktile Vakuolen vorhanden.

Asexuelle Vermehrung läuft gewöhnlich in zwei aufeinander folgenden Zellteilungen ab, auf welche die Auflösung der Mutterzellwand folgt. Sexuelle Vermehrung tritt bei manchen Arten auf, ist jedoch kein taxonomisches Merkmal. Die verbreitetste Form der geschlechtlichen Fortpflanzung ist die Isogamie von zwei äußerlich ähnlichen Gameten, bei manchen Arten tritt aber auch Oogamie mit klar zu unterscheidenden Ei- und Spermazellen auf. Die Zygote bildet in jedem Fall eine dicke, robuste Wand aus, die widrigen Umweltbedingungen standhalten kann [Harris, 1989].

Manche Arten können auch asexuelle, robuste Sporen ausbilden.

Die Gattung *Chlamydomonas* ist weltweit verbreitet und kann in verschiedensten Habitaten überleben.

So sind *Chlamydomonas* Arten schon in Süß- und Abwasserteichen, in brackigem und Meerwasser, im Schnee, in Garten- und Ackerböden, im Wald, im Torf, an feuchten Wänden, an Dachziegeln und sogar im Matratzenstaub gefunden und isoliert worden. Auch auf einer Petrischale, die in 1100m Höhe aus einem Flugzeug gehalten wurde, fand sich neben anderen Algen auch *Chlamydomonas* [Harris, 1989].

Der für molekularbiologische Untersuchungen wichtigste Vertreter der Gattung *Chlamydomonas* ist *C. reinhardtii*.

1.4.2.2. *Chlamydomonas reinhardtii*

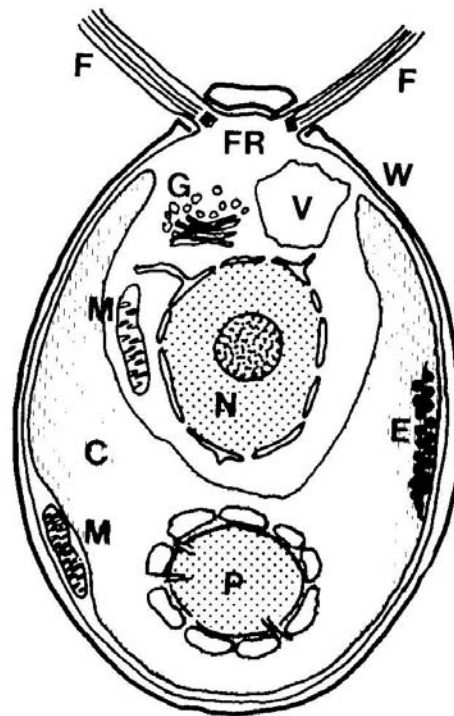


Abbildung 11: Schematische Darstellung einer typischen *C. reinhardtii* Zelle

C = Chloroplast; E = Augenfleck; F = Flagelle; FR = Ort der Flagellenbasis; G = Golgi Apparat; M = Mitochondrien; N = Nucleus; P = Pyrenoid; V = Vakuole; W = Zellwand
(aus: Harris E.H. „The *Chlamydomonas* Sourcebook“ ©1989)

Der Artname *C. reinhardtii* wurde im Jahr 1888 von *P.A. Dangeard* eingeführt. Er benannte die Art nach *L. Reinhard(t)*, einem ukrainischen Botaniker, der 1876 an der sexuellen Vermehrung von *C. pulvisculus* gearbeitet hatte und dabei einen Zyklus beobachtete, den *Dangeard* später einer neuen Spezies zuschrieb welche er folglich *Chlamydomonas reinhardtii* nannte.

Eine typische Zelle hat eine ovale Form, ist 10 µm lang (variierend zwischen 8 – 22 µm im Lauf des vegetativen Zellzyklus) und 3 µm breit [Rochaix, 1995] .

Zwei Flagellen, die etwa 1.5 – 2 Mal so lang wie der Zellkörper sind, sind apikal in zwei Basalkörpern verankert. Diese wiederum sind mit dem Zellkern über Centrinfilamente verbunden. Zwischen Zellkern und Basalkörpern sind gewöhnlich zwei kontraktile Vakuolen lokalisiert.

Besonders auffällig ist der becherförmig um den Zellkern geschlungene Chloroplast, der bis zu 40% des Zellvolumens einnehmen kann. Er beinhaltet den **Pyrenoiden**, ein im

Lichtmikroskop gleichförmig erscheinendes Körperchen, das in vielen eukaryontischen Einzellern gefunden werden kann.

Der im Stroma befindliche Pyrenoid besteht in erster Linie aus Ribulose-1,5-bisphosphat Carboxylase Oxygenase (RUBISCO). Die ihm zugeschriebenen Funktionen reichen vom RUBISCO Depot über die CO₂ Fixierung bis hin zu einer Rolle in der Stärkesynthese [Olive & Wollman, 1998; Spalding, 1998].

Der Augenfleck (Stigma) befindet sich anterior innerhalb der Hüllmembran des Chloroplasten, nahe der Cytoplasmamembran und erscheint wegen der enthaltenen Carotinoide rötlich. Ein hier befindliches spezielles Rhodopsinmolekül ist als Photorezeptor identifiziert worden.

Mitochondrien können in Gruppen oder einzeln, unter bestimmten Bedingungen auch als verzweigtes Netzwerk auftreten [Harris, 1998].

Wildtyp Zellen besitzen eine komplexe Glykoproteinzellwand mit hohem Hydroxyprolinanteil. Zellwand – reduzierte Mutanten sind hergestellt worden, da diese sich leicht transformieren lassen [Kindle, 1990].

Chlamydomonas reinhardtii tritt in zwei geschlechtlichen Formen, als *mating type* plus (mt⁺) oder als *mating type* minus (mt⁻) auf. Der *mating type* wird durch einen speziellen Abschnitt des Kerngenoms determiniert.

1.4.3. Kerngenom und Plasmon

Chlamydomonas reinhardtii besitzt, wie alle Eukaryonten, verschiedene Kompartimente, welche Desoxyribonucleinsäure (DNA), den Speicher der genetischen Information, enthalten.

Diese sind neben dem Zellkern die Chloroplasten und die Mitochondrien. Man bezeichnet die autonomen genetischen Systeme als **Kerngenom**, womit die Gesamtheit der Gene des haploiden Chromosomensatzes im Kern bezeichnet wird, und **Plasmon**, welches sich aus der genetischen Information des Chloroplasten (**Plastom**) und der Mitochondrien (**Chondriom**) zusammensetzt.

1.4.3.1. Kerngenom

Die Größe des bisher noch nicht vollständig sequenzierten Kerngenoms wird auf 100 – 160 Mbp (Millionen Basenpaare) geschätzt. Die bisher entdeckten etwa 200 molekularen *Marker* sind auf 17 Kopplungsgruppen verteilt, was folglich auf maximal 17 verschiedenen Chromosomen schließen läßt.

Die DNA liegt im Zellkern assoziiert mit verschiedenen Proteinen vor (Chromatin), für die Organisation von entscheidender Bedeutung sind die Histone, welche mit der DNA die für Eukaryonten typischen Nucleosome bilden. Die Länge der DNA pro Nucleosom, die je nach Zelltyp und Organismus wegen der unterschiedlich langen *linker* DNA zwischen ~165 bp und ~220 bp schwankt [Knippers, 1997b], beträgt bei *Chlamydomonas* 189 bp.

Ungewöhnlich im Vergleich mit Höheren Pflanzen ist sowohl der außergewöhnlich hohe G/C Gehalt von 62% [s. Kap. 1.4.3.1.3.] als auch die geringe Rate von methyliertem Cytosin im CG Dinucleotid [Silflow, 1998].

Homologe Rekombination von transformierter DNA ins Kerngenom findet praktisch nicht statt [Gumpel et al., 1994].

1.4.3.1.1. Repetitive Sequenzen und Transposons

Verschiedene repetitive DNA – Elemente sind im Genom von *Chlamydomonas* vorhanden. Neben tandemartig wiederholten Sequenzen, die sehr kurz (wie das [CA/GT]_n Motiv) oder auch relativ lang (1.5 – 2.5 kb) sein können, sind auch Satelliten – DNA – Elemente (telomere repeat sequences) an den Telomeren nachgewiesen worden, die sich durch kurze tandem repeats auszeichnen.

Von großem Interesse sind auch die Transposons. Bisher sind folgende Elemente als mutmaßliche Transposons identifiziert worden:

Name	Länge	Transposon Klasse
<i>TOC 1</i>	5.7 kb	1
<i>TOC 2</i>	1.2 kb	2
<i>Gulliver</i>	12 kb	2
<i>Tcr 1</i>	9.4 kb	2
<i>Tcr 2</i>	?	2
<i>Tcr 3</i>	?	2
<i>Pioneer 1</i>	2.8 kb	?

Tabelle 4: Mutmaßliche Transposons des *Chlamydomonas* Kerngenoms

(adaptiert von: Silflow, C.D. „The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in *Chlamydomonas*“ © 1998)

1.4.3.1.2. Mating type

Der *mating type* wird durch den *mating type* locus, einer komplexen Region auf dem linken Arm der Kopplungsgruppe VI festgelegt. Er ist umfaßt ~850 kb und weist eine geringe Rekombinationsrate aus [Armbrust, 1998]. Je nachdem, ob es sich um eine mt⁺ oder mt⁻ Zelle handelt, werden hier unterschiedliche Gene exprimiert, die beispielsweise bei der uniparentalen Plastidenvererbung Kontrollfunktionen ausüben. Einige Beispiele hier lokalisierte Gene sind *ezy1*, *fus1* und *mid*.

1.4.3.1.3. Proteincodierende Bereiche

Im **Promotorbereich** von *Chlamydomonas* – Genen findet sich typischer Weise eine TATA Box, etwa 30 bp upstream des Transkriptionsstartpunktes und gefolgt von einer G/C – reichen Region. Diese Bereiche scheinen aber für eine Basistranskription nicht essentiell zu sein, da nach Mutation sowohl der TATA Box als auch des G/C – reichen Abschnitts des Tubulinpromotors immer noch ein gewisses Transkriptionslevel beobachtet werden konnte. Bei den Tubulingenen konnte dafür ein anderes, 10 bp langes Motiv innerhalb von 35 bp upstream des Transkriptionsstartpunktes, die sogenannte TUB Box, als essentieller Faktor identifiziert werden [Silflow, 1998].

Typisch für das *C. r.* Kerngenom ist das Auftreten vieler kleiner **Introns**. Diese Sequenzen, die nach der Transkription aus dem Primärtranskript durch Spleißen entfernt werden, sind charakteristisch für Eukaryontenzellen. Bei Prokaryonten, die auf schnellstmögliche Vermehrung und optimale Nutzung des Nährstoffangebots ausgerichtet sind, treten Introns nicht auf [Knippers, 1997c].

Die durchschnittliche Länge eines Introns von *C. r.* beträgt 219 bp und pro 1000 bp codierender Bereich sind in etwa vier Introns vertreten. Auch im nicht translatierten Bereich von Genen können Introns vorkommen, so daß typischer Weise der Intron- und der Exonbereich mehr oder weniger von gleichem Umfang sind. Bis auf wenige Ausnahmen (z.B. Histone) enthalten alle *C. r.* Gene Introns.

Die Funktion der Introns ist umstritten, eventuell üben sie auf der Ebene des Spleißens eine Kontrolle der Genexpression aus. So liegen in einem Fall, bei der verwandten Alge *Volvox carteri*, indirekte Hinweise für einen Verstärker – Effekt der Expression, hervorgerufen durch ein Intron im nitA Gen, vor [Gruber et al., 1996].

Die das Intron kennzeichnenden Bereiche von *C. r.* sind denen von Höheren Pflanzen und anderen Eukaryonten homolog, was auf einen ähnlichen Spleißmechanismus schließen läßt [Silflow, 1998].

Eine vergleichende Analyse von 266 Sequenzen ergab folgende Consensus – Sequenzen:

	Exonbereich			Intronstart				
Position	-3	-2	-1	+1	+2	+3	+4	+5
Consensus - Nucleotid	C/A	A/C	G	G	T	G	A/C	G
Wahrscheinlichkeit	.78	.77	.87	1.0	.99	.76	.83	.95

Tabelle 5: Consensus – Sequenz des 5' Intronbereichs

(adaptiert von: Silflow, C.D. „The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in *Chlamydomonas*“ © 1998)

	Intronende				Exonbereich
Position	-4	-3	-2	-1	+1
Consensus	G/A	C	A	G	G/A
Nucleotid	.83	.92	1.0	1.0	.80
Wahrscheinlichkeit					

Tabelle 6: Consensus – Sequenz des 3' Intronbereichs

(adaptiert von: Silflow, C.D. „The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in *Chlamydomonas*“ © 1998)

Wie aus den Tabellen 5 und 6 ersichtlich, gilt auch bei *C. r.* die GT / AG Regel [Knippers, 1997c] für praktisch jedes Intron.

Der Startpunkt der **Translation** ist sowohl bei Pro- als auch bei Eukaryonten in 90% der Fälle das Methionincodon AUG, in ca. 8% der Fälle wird die Translation mit GUG (Valin) und in seltenen Fällen auch mit UUG (Leucin) begonnen.

Grundlage für den korrekten Translationsstart ist das Vorhandensein von zwei kognaten, Methionin – spezifischen tRNA – Varianten. Eine diese tRNAs bindet ausschließlich am Startcodon (bei Prokaryonten: tRNA_f^{MET}), die andere ist für den Methionineinbau im Laufe der Proteinsynthese verantwortlich (bei Prokaryonten: tRNA_m^{MET}).

Beide werden von der selben Methionyl-tRNA-Synthetase erkannt und mit Methionin beladen. Bei Prokaryonten wird das Methionin, welche an die tRNA_f^{MET} gebunden ist, mit einem Formylrest markiert, bei Eukaryonten ist dies nicht der Fall. Der Formylrest wird nach der Initiation der Translation und noch während der Proteinsynthese abgespalten [Knippers, 1997a].

Vergleichende Untersuchungen von 133 Sequenzen bei *C. r.* zeigten in 99% der Fälle das Startcodon AUG, in 1% wurde ACG ermittelt. Eine Consensus Region von 10 Nucleotiden zeigt folgende Basenfolge: A/C-A-A/C-A/C-A-U-G-G/C-C-C/G.

Die Translation wird bei *C. r.* in 70% der Fälle mit UAA, in je 15% der Fälle mit UAG bzw. UGA beendet, was durch Vergleich von 149 Sequenzen belegt wurde. Die Consensus Region am Ende des Translationsbereiches ist G/C-**U-A-A**-G/A [Silflow, 1998].

Auf den codierenden Bereich folgt die **3' Nichtcodierungs – Sequenz** (3' UTR = untranslated region). Ein wichtiges Motiv dieses Abschnitts ist das Polyadenylierungs – Signal. Fast alle kerncodierten mRNAs tragen am 3' Ende eine Poly-(A) Kette von 150 – 250 Adeninresten. Diese Basenfolge ist nicht im Kerngenom codiert und wird nachträglich durch Entfernung des 3' Endes des Primärtranskripts und Anheften von Adeninmolekülen durch das Enzym Poly-(A) Polymerase angefügt. Dieser Vorgang wird durch cis – aktive Elemente kontrolliert.

In Höheren Pflanzen sind drei Klassen dieser cis wirksamen Elemente beschrieben, sie werden als FUE (far-upstream element), NUE (near-upstream element) und CS (cleavage site) bezeichnet. Downstream der Poly-(A) Schnittstelle vorkommende, kontrollierende Elemente, sind bei tierischen Genen vorhanden, nicht jedoch bei Pflanzen oder Pilzen [Li & Hunt, 1997].

In 90% der bisher von *Chlamydomonas reinhardtii* untersuchten mRNAs ist 10 – 20 bp upstream der Prozessierungsstelle die Sequenz **UGUAA** vorhanden. Neben anderen Variationen kommen auch UGUAG oder UGUUA als Signalsequenz vor [Silflow, 1998].

Eine wichtige Besonderheit von *C. r.* ist die **Vorliebe G/C reicher Codons**. Fast alle der 20 proteinogenen Aminosäuren (bis auf Methionin und Tryptophan) können durch verschiedene Codontripletts codiert werden, dabei ist die dritte Base variabel. Der hohe G/C Anteil der DNA im Kern (62%) rührt auch daher, daß überwiegend die Codons mit G oder C an dritter Position verwendet werden. Dieser Umstand ist evt. mit für die Probleme verantwortlich, die bei der Expression von Fremdgenen auftreten [Silflow, 1998].

1.4.3.2. Chloroplastengenom

Das Chloroplastengenom von *Chlamydomonas reinhardtii* ist heute zu fast 100% sequenziert. Es besteht aus einem ringförmigen, ~196 kb langen DNA – Molekül, welches pro Chloroplast in etwa 80 Kopien vorliegt [Rochaix, 1995]. Trotz der Tatsache, daß sich die mt^+ und mt^- Gameten in ihrer Größe kaum unterscheiden und beide einen Chloroplasten besitzen, wird das Chloroplastengenom ausschließlich uniparental vom mt^+ vererbt.

Grund hierfür ist die kurz nach Zygotenbildung einsetzende, selektive Degradation der mt^- Chloroplasten – DNA [Armbrust, 1998]. Der genaue Ablauf dieser selektiven Degradation ist noch nicht aufgeklärt, man geht heute davon aus, daß eine spezifische, vom *mating type* locus kontrollierte Endonuclease für den Abbau zuständig ist, wobei die mt^+ Chloroplasten – DNA durch noch unbekannte Modifikationen geschützt wird.

Das Plastom ist in acht bis zehn Proteinkomplexen organisiert („Nucleoide“).

In auffallendem Gegensatz zur Kern – DNA ist die Chloroplasten – DNA A/T reich, was sich gut mit der Endosymbionten – Theorie in Einklang bringen läßt, da es auf einen unabhängigen Ursprung der Genome hindeutet [s. Kap. 1.1.1.].

Auf dem Plastidengenom sind ~80 Gene codiert, die beispielsweise für Komponenten des Photosyntheseapparates, für tRNAs, für ribosomale RNAs und Proteine, für Untereinheiten einer RNA – Polymerase und andere Proteine codieren [Rochaix, 1995].

Viele der Gene sind durch Introns unterbrochen, so sind z.B. im *psbA* Gen von *C. r.* vier Introns vorhanden.

Ein besonders interessantes Element im Chloroplastengenom von *C. r.* ist *Wendy*, eine in zweifacher Ausführung vorkommende, 2.4 kb lange Sequenz, welche Ähnlichkeiten mit einem Transposon – Element besitzt. Dies ist um so interessanter, als bisher aus keinem Chloroplastengenom einer Höheren Pflanze ein Transposon isoliert werden konnte [Nedelcu & Lee, 1998].

1.4.3.3. Chondriom

Das mitochondrielle Genom von *Chlamydomonas reinhardtii* ist seit 1993 vollständig sequenziert. Es besteht aus einem linearen, ~15.8 kb langen DNA – Molekül, welches in ~50 Kopien pro Zelle vorliegt. Die Vererbung verläuft uniparental, das mitochondrielle Genom wird nur vom mt^- weitergegeben, da die DNA der mt^+ Mitochondrien im Zuge der Reifung der Zygote langsam abgebaut wird [Remacle & Matagne, 1998].

Das Chondriom enthält 13 Gene, acht codieren Proteine, drei tRNAs und zwei rRNAs. Fünf der codierten Proteine sind Untereinheiten der NADH–Ubichinon–Oxidoreduktase, eines ist das Cytochrom b der Ubichinon–Cytochrom c–Oxidoreduktase (Cytochrom bc_1 Komplex), eines Untereinheit I der Cytochrom c–Oxidase und eines ist ein reverse Transkriptase ähnliches Protein unbekannter Funktion. Interessanter Weise werden sowohl Untereinheit II und III der Cytochrom–Oxidase als auch alle Untereinheiten der ATP – Synthase im Kerngenom codiert und posttranslational importiert.

Auch die weiteren tRNAs sind offensichtlich kerncodiert und müssen importiert werden.

Die Gene der rRNAs weisen eine ungewöhnliche Struktur auf, sie sind in kleinen Stücken über nahezu das halbe Chondriom verstreut und so durch protein- und tRNA codierende Bereiche getrennt.

Die kleinen Transkripte lagern sich über spezifische Basenpaarung zu den typischen ribosomalen RNAs zusammen [Rochaix, 1995].

Die Enden der mitochondrialen DNA – Moleküle bestehen aus 531 – 532 bp langen inverted repeats, die einen terminalen 3' Überhang von 39 – 41 Basen gleicher Sequenz aufweisen, was einen Ringschluß verhindert [Remacle & Matagne, 1998].

1.5. Zielsetzung der Diplomarbeit

Das Ziel der Diplomarbeit war es, in Chloroplasten lokalisierte Serin/Threonin – Proteinkinasen bei *Chlamydomonas reinhardtii* zu identifizieren.

Dazu wurden sowohl molekularbiologische und biochemische Verfahren als auch Datenbankrecherchen und Computeranalysen eingesetzt.

Um mögliche Kontrollfunktionen für die LHC II „state transition“ zu untersuchen, sollten anschließend *Knockout* – Mutanten der entsprechenden Kinasegene hergestellt und untersucht werden.

Ausgangspunkt der Arbeit war die von *Snyders* und *Kohorn* bei *Arabidopsis thaliana* beschriebene, potentielle Serin/Threonin – Proteinkinase *TAK* [Snyders & Kohorn, 1999].

2. Kapitel Material und Methoden

2.1. Stämme und Wachstumsbedingungen _____	47
2.1.1. Medien zur Anzucht von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> _____	47
2.1.1.1. Lösungen für TAP – Medium _____	47
2.1.1.2. Lösungen für HSM – Medium _____	48
2.1.2. Verwendete Stämme von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> _____	49
2.1.3. Medien zur Anzucht von <i>Escherichia coli</i> _____	50
2.1.4. Verwendete Stämme von <i>Escherichia coli</i> _____	50
2.2. Geräteliste _____	52
2.3. Molekularbiologische Methoden _____	53
2.3.1. Agarose – Gelelektrophorese für DNA – Fragmente _____	53
2.3.2. Agarose – Gelelektrophorese für RNA – Fragmente _____	54
2.3.3. Autoklavieren _____	55
2.3.4. DIG – Markierung einer DNA – Sonde _____	55
2.3.5. DNA – Extraktion aus Agarose – Gelen _____	56
2.3.6. DNA – Fällungen _____	56
2.3.6.1. Ammoniumacetat – Fällung _____	56
2.3.6.2. n-Butanol – Fällung _____	57
2.3.6.3. Isopropanol – Fällung _____	57
2.3.7. DNA – Isolierung aus <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> _____	58
2.3.8. DNA – Restriktionsspaltung _____	58
2.3.9. DNA – Sequenzierung _____	59
2.3.10. DNA – Verdauung _____	59
2.3.11. Elektroporation von kompetenten <i>E. coli</i> Zellen mit pArg 7.8 ϕ 3 _____	60
2.3.12. Herstellung von kompetenten <i>E. coli</i> Zellen vom Stamm <i>DH5α</i> _____	60
2.3.13. Inverse Polymerase – Kettenreaktion (<i>IPCR</i>) _____	61
2.3.14. Mini HB – Lyse _____	62

2.3.15. pGEM [®] -T Easy Vektor – System	63
2.3.16. Phenol / Chloroform – Proteinextraktion	64
2.3.17. Plasmid – Isolierung	64
2.3.18. Polymerase – Kettenreaktion (<i>PCR</i>)	66
2.3.18.1. Liste der verwendeten <i>PCR</i> – <i>Primer</i>	68
2.3.19. <i>Pool</i> – Versuch	69
2.3.20. 5' / 3' <i>RACE</i>	69
2.3.21. Reverse Transkription	72
2.3.22. RNA – Isolierung von <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	73
2.3.23. RNA – Verdauung	74
2.3.24. <i>Southern blot</i>	75
2.3.25. <i>Southern dot blot</i>	77
2.3.26. Transformation von Zellwand defizienten <i>C. r.</i> Zellen	78
2.4. Proteinbiochemische Methoden	80
2.4.1. <i>Antikörperscreening</i> einer <i>λgt11</i> – Expressionsbank	80
2.4.2. Bestimmung der <i>C. r.</i> Wachstumsphase	82
2.4.3. <i>Western blot</i> Analyse	82
2.5. <i>Datenbankscreening</i> zur Identifikation von möglichen Serin/Threonin – Proteinkinasen in Chloroplasten	86

2. Kapitel Material und Methoden

2.1. Stämme und Wachstumsbedingungen

2.1.1. Medien zur Anzucht von *Chlamydomonas reinhardtii*

Je nach Stamm und gewünschten Selektionsbedingungen werden unterschiedliche Medien verwendet, TAP – Medium erlaubt heterotrophes Wachstum, HSM – Medium nicht.

2.1.1.1. Lösungen für TAP – Medium

[nach Gorman & Levine, 1965]

p Lösung

$K_2HPO_4 \cdot 3H_2O$	28,8 g
KH_2PO_4	14,92 g
auf 100 ml mit H_2O bidest. auffüllen.	

TAP Salze

NH_4Cl	16 g
$MgSO_4 \cdot 7 H_2O$	4 g
$CaCl_2 \cdot 2 H_2O$	2 g

Arginin Stammlösung (1000x)

Arginin	110 mg
---------	--------

- in 1 ml H_2O bidest. lösen
- Steril filtrieren

Hutner's trace

EDTA, Dinatriumsalz	5 g
$ZnSO_4 \cdot 7 H_2O$	2,2 g
H_3BO_3	1,14 g
$MnCl_2 \cdot 4 H_2O$	0,51 g
$FeSO_4 \cdot 7 H_2O$	0,5 g
$CoCl_2 \cdot 6 H_2O$	0,16 g
$CuSO_4 \cdot 5 H_2O$	0,16 g
$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4 H_2O$	0,11 g
H_2O bidest.	75 ml

- bis zum Sieden erhitzen
- pH mit KOH auf 6,5 – 6,8 einstellen
- auf 100 ml mit H_2O bidest. auffüllen

- bei Raumtemperatur (RT) inkubieren, bis ein Farbumschlag von grün zu violett zu beobachten ist.
- in 1 ml Portionen aliquotieren

TAP – Medium

TRIS – Cl	2,42 g
TAP Salze	25 ml
p Lösung	375 µl
<i>Hutner's trace</i>	1 ml
Essigsäure (100%)	1 ml
Agar *	15g
pH = 7	

- Auf 1 l mit H₂O bidest. auffüllen
- Autoklavieren
- * für Agar Platten

2.1.1.2. Lösungen für HSM – Medium [nach Sueoka, 1960]

2 · PO₄ Lösung

K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	7,17 g
KH ₂ PO ₄	3,63 g
pH = 6,9	

- Auf 500 ml mit H₂O bidest. auffüllen
- Autoklavieren

HSM – Medium

TAP Salze	25 ml
<i>Hutner's trace</i>	1 ml
Agar *	15g

- Auf 950 ml auffüllen
- Autoklavieren
- Zugabe von 50 ml 2 · PO₄ Lösung
- * für Agar Platten

2.1.2. Verwendete Stämme von *Chlamydomonas reinhardtii*

Stammsname	CC Nummer	Wildtyp / Mutante	Mating typ	tag
Arg2	CC49	WT	minus	
cw10	CC849	Zellwand dezimiert	minus	
Arg7cw15	CC1618	Zellwand dezimiert	minus	
Arg7cw15	CC1736	Zellwand dezimiert	minus	
Stm1		Mutante von CC1618	minus	pArg7.8 ϕ 3
Stm2		Mutante von CC1618	minus	ble
Stm3		Mutante von CC1618	minus	ble
Stm4		Mutante von CC1618	minus	pArg7.8 ϕ 3

Tabelle 7: Verwendete Stämme von *C. reinhardtii*

Anzucht

Es muß darauf geachtet werden, daß steril gearbeitet wird, da andernfalls leicht Pilz- oder Bakterienkontaminationen auftreten können.

Zur Anzucht werden *Chlamydomonas reinhardtii* Zellen mittels einer Impföse von der Agarplatte in ~15 ml Anzuchtsmedium (TAP, HSM, bei Arginin auxotrophen Mutanten muß Arginin Stammlösung zugegeben werden, bis die Lösung 110 mg/l Arginin enthält) überimpft.

Nach Inkubation für 24 – 48 Std. bei 23° C und $40 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ Tageslicht auf einem Schüttler [G9] bei 130 rpm wird die Stammlösung in einen 1000 ml Erlenmeyer – Kolben mit 500 ml Anzuchtsmedium (TAP, HSM, evt. Arginin) überführt. Der Kolben wird mit einem Luft durchlässigen, Bakterien undurchlässigen Stopfen verschlossen.

Es folgt die Inkubation bei 23° C und $40 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ Tageslicht auf dem Schüttler [G9] bei 130 rpm, bis die gewünschte Zelldichte erreicht ist. Diese wird durch Messung der Absorption bei 750 nm im Photometer [G7] bestimmt.

2.1.3. Medien zur Anzucht von *Escherichia coli*

LB (Luria – Bertani) – Medium

[nach Sambrook et al., 1989]

<i>Bacto – Tryptone</i>	10 g
Hefe Extrakt	5 g
NaCl	10 g
H ₂ O bidest.	950 ml
Agar*	15g
pH = 7	

- Auf 1 l mit H₂O bidest. auffüllen
- Autoklavieren
- * für Agar Platten

Ampicillin Stammlösung (1000x)

Ampicillin	100 mg
------------	--------

- In 1 ml H₂O bidest. lösen
- Steril filtrieren

LB_{Amp}

Ampicillin Stammlösung	1/1000 Vol.(=100 mg/l)
LB – Medium	variabel
Agar*	1,5 % (w/v)

- * für Agar Platten

2.1.4. Verwendete Stämme von *Escherichia coli*

Stammname	DSM Nummer	Genotyp	Plasmid
DH5α		<i>supE44, ΔlacU169 (φ80lacZΔM15), hsdR17, recA1, endA1, gyrA96, thi-1, relA1</i> [Hanahan, 1983]	
Jm109		<i>recA1, endA1, gyr96A, thi, hsdR17, supE44, relA1, lambda-, Δ (lac-, proAB) (F', traD36, proAB, laqI^q, ZΔM15)</i>	
XL1–Blue		<i>recA1, endA1, gyrA96, supE44, hsdR17, thi-1, relA1, lac [F', proAB⁺, lacI^q, lacZΔM15, Tn10(tet^r)]</i> [Sambrook et al., 1989]	
Y1090	6219	<i>supF, hsdR, araD139, Δlon, ΔlacU169, rpsL, trpC22::Tn10(tet^r)</i> [Sambrook et al., 1989]	pMC9

Tabelle 8: Verwendete Stämme von *E. coli*

Anzucht

Zur Anzucht werden *Escherichia coli* Zellen mit einem sterilen Holzstocher von der Agarplatte in 2 ml Anzuchtsmedium (LB, evt. Ampicillin Stammlösung zugeben, bis $c_{\text{Amp}} = 100 \text{ mg/l}$) in ein Greiner[®] 14 ml PP– Tube gegeben.

Dieses rotiert dann für 16 Std. bei 37° C im Inkubationsschrank. Diese Stammlösung wird in die gewünschte Menge LB – Medium (evt. Ampicillin $c = 100 \text{ mg/l}$) gegeben und bei 37° C im Schüttler [G8] inkubiert bis die gewünschten Zelldichte erreicht ist. Die Zelldichte wird durch Messung der Absorption bei 600 nm im Photometer [G6] ermittelt.

2.2. Geräteliste

Gerät	Funktion	Firma	Modell
G1	Autoklav	Fedegari	FNR 3071 E
G2	Elektroporationsgerät	BIO RAD	Gene Pulser™
G3	Magnetrührer	Janke & Kunkel	Combimag RCT
G4	Mikrowelle	Samsung	M633
G5	pH Meter	Radiometer	pHM 84 Research pH Meter
G6	Photometer	Shimadzu	UV – 120 – 02
G7	Photometer	Shimadzu	UV 1202
G8	Schüttler für <i>E. coli</i>	New Brunswick Scientific	
G9	Schüttler für <i>C. reinhardtii</i>	GFL	3017
G10	Stromversorgung für Elektrophorese	Consort	E 431
G11	Thermocycler	MJ – Research	PTC 200
G12	Trockenschrank	Bachofer GmbH	400 HY – E
G13	Vortexer	Janke & Kunkel	VF 2
G14	Waage	Kern	440 – 47
G15	Waage (fein)	Sartorius	2004 MP
G16	Wasserbad	Memmert	
G17	Zentrifuge	Beckmann	J2 – 21
G18	Zentrifuge (kühl)	Eppendorf	Centrifuge 5403
G19	Zentrifuge	Heraeus	Biofuge pico
G20	Zentrifuge	Heraeus	Laborfuge Ae
G21	Zentrifuge	Wilhelm Stock	Rotor V180 A8

Tabelle 9: Geräteliste

2.3. Molekularbiologische Methoden

2.3.1. Agarose – Gelelektrophorese für DNA – Fragmente

Verschieden große DNA – Fragmente können im elektrischen Feld mittels Agarose – Gelen getrennt werden. Der Agarose kommt dabei eine Siebfunktion zu, da kleine Fragmente schneller durch die Matrix wandern als große. Je nach DNA – Größe werden Gele mit 0,8 – 3% Agarose (w/v) verwendet, je kleiner die aufzutrennenden Fragmente, desto höher die zu wählende Agarose – Konzentration.

TA Puffer (50x Stammlösung)

Tris – Cl	242,2 g
Natriumacetat	68,04 g
EDTA	18,61 g
pH = 7,8 (mit Eisessig)	

- Auf 1 l mit H₂O bidest. auffüllen

Bromphenol – Blau (BPB) DNA – Auftragspuffer

TA Puffer (1x)	50 ml
Glyzerin	50 ml
Bromphenol – Blau	0,1 g

- In 1 ml Portionen aufteilen

1 kb DNA – Größenmarker (GibcoBRL[®])

TA Puffer (1x)	155 µl
Bromphenol – Blau Auftragspuffer	40 µl
GibcoBRL [®] 1kb <i>Marker</i> (C _{DNA} = 1µg/µl)	5 µl

- Pro Gel 5 µl verwenden

Ethidiumbromid Färbebad

Ethidiumbromid	0,5 mg
----------------	--------

- Auf 1 l mit H₂O bidest. auffüllen

Agarose – Gel

Agarose	10 g – 30 g
---------	-------------

- Mit 1x TA Puffer auf 1 l auffüllen
- Erhitzen, bis die Agarose gelöst ist
- Lösung in Gelkammer gießen, den Kamm für die Geltaschen stecken und Gel aushärten lassen

- Vorrätiges Agarose – Gel kann durch Erhitzen in der Mikrowelle [G4] wieder gelöst werden
- Die DNA – Proben werden mit BPB – Auftragspuffer im Verhältnis DNA – Probe/BPB – Auftragspuffer = 5-10/1 gemischt und in die Kammern pipettiert.
- Zur Kontrolle sollte immer ein DNA – Größenmarker mitlaufen
- Als Laufpuffer dient 1x TA Puffer
- Mit Spannungsgeber [G10] werden max. 100 V angelegt, die DNA wandert zur Anode (+ Pol)
- Das Gel wird nach der Elektrophorese für 10 – 15 min. in das Ethidiumbromid Bad gegeben, die DNA wird durch nachfolgendes Überführen auf den UV Transilluminator bei 312 nm sichtbar gemacht

2.3.2. Agarose – Gelelektrophorese für RNA – Fragmente

[nach Amundsen (<http://biosci.cbs.umn.edu/~amundsen/chlamy/index.html>)]

Um RNA – Degradierungen durch RNAsen zu verhindern, müssen zur elektrophoretischen Auftrennung von RNAs spezielle Agarose – Gele verwendet werden. Alle Geräte und Lösungen müssen RNase frei sein.

10x E Puffer

Na ₂ HPO ₄	25,56 g
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O	2,76 g
H ₂ O bidest.	auf 1l

Lösung A

Formamid	500 µl
Formaldehyd	162 µl
10x E Puffer	100 µl
Bromphenol – Blau	wenige Körnchen

Low ionic strenght buffer

10x E Puffer	1x
Formaldehyd (37%)	3 %
H ₂ O bidest.	819 ml

Ethidiumbromid

Ethidiumbromid	50 mg/ml
----------------	----------

Agarose – Gel

10x E Puffer	1x
Agarose	1 % (w/v)
H ₂ O bidest.	variabel

- Die Agarose wird im Puffer durch Erhitzen gelöst; Abkühlen auf 65° C; Zugabe von 1/6 Vol. Formaldehyd; Gel gießen und aushärten lassen; Kammer mit *Low ionic strenght buffer* füllen
- RNA – Probe wird mit 3 Vol. Lösung A und 1/10 Vol. Ethidiumbromid (c = 50 mg/ml) versetzt

- Erhitzen für 5 min. auf 60° C; Auf Eis kühlen
- Probe in Gelkammer pipettieren
- Spannung von 40 V anlegen
- Die RNA wird durch nachfolgendes Überführen auf den UV Transilluminator bei 312 nm sichtbar gemacht

2.3.3. Autoklavieren

Durch Autoklavieren werden Geräte und Lösungen im gespannten und gesättigten Wasserdampf sterilisiert. Dies geschieht bei 120 – 130 °C und 1 – 2 bar Druck für 30 – 120 min. [G1].

2.3.4. DIG – Markierung einer DNA – Sonde

Die DIG – Markierung wird mit Hilfe des „DIG DNA Labeling and Detection Kit“ der Firma *Boehringer*[®], Kat. Nr. 1093657, durchgeführt.

Das Steroidhaptan Digoxigenin ist zur DNA – Markierung mit dUTP über eine alkalilabile Esterbrücke gekoppelt. Werden nun einzelsträngige *Template* – DNA – Moleküle mit *Primern*, *Klenow* – Enzym und dNTPs, welche zusätzlich die DIG – dUTPs enthalten, inkubiert, so werden in den komplementäre zweiten Strang auch DIG – dUTPs eingebaut. DIG kann dann über einen Antikörpernachweis detektiert werden.

<u>EDTA – Lösung (0,2M)</u>	
EDTA	0,2M
H ₂ O bidest.	variabel

- Die Sonden – DNA wird durch eine *PCR* hergestellt und aus dem Gel extrahiert
- 0,5-3 µg DNA werden auf 15 µl H₂O bidest. verdünnt
- Denaturierung der dsDNA durch Inkubation für 10 min. in kochendem Wasser; Schockkühlung auf Eis/NaCl
- Gefäß auf Eis stellen, Zugabe von 2 µl Hexanucleotid Mix, 2 µl dNTP Mix (incl. DIG dUTPs) und 1 µl Klenow Enzym; mischen; kurz zentrifugieren
- Inkubation über Nacht bei 37° C [G16]
- Zugabe von 2 µl EDTA Lösung (0,2M) um die Reaktion zu beenden

2.3.5. DNA – Extraktion aus Agarose – Gelen

Die DNA – Extraktion wird mit Hilfe des „QIAquick™ Gel Extraction Kit“ der Firma Qiagen®, Kat. Nr. 28704, durchgeführt. Das Prinzip besteht darin, die gewünschte DNA – Bande aus dem Agarose – Gel auszuschneiden, die Agarose zu lösen und die darin befindlichen DNA – Fragmente an eine Silikamembran zu binden. Durch Waschen der DNA wird diese gereinigt und anschließend eluiert. Die folgenden Schritte werden ausgeführt.

Natriumacetat Lösung (3M)

Natriumacetat	3 M
H ₂ O bidest.	variabel
pH = 5,0	

- Die gewünschte DNA – Bande wird aus dem Agarose – Gel mit einem sauberen Skalpell ausgeschnitten und in ein steriles 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführt
- Die Masse des ausgeschnittenen Gels wird durch Wiegen bestimmt
- Zugabe von 3 Vol. Buffer QG zu 1 Vol. Gel (100 mg ~ 100 µl)
- Inkubation für 10 min. bei 50° C [G16]; alle 2 – 3 min. invertieren
- Zugabe von 10 µl Natriumacetat (3M), falls die Farbe der Lösung nicht mehr gelb ist
- Zugabe von 1 Vol. Isopropanol; mischen
- Überführen der Lösung in QIAquick™ spin column
- Zentrifugation für 1 min. bei 10000 g [G19]; Durchfluß verwerfen
- Zugabe von 0,75 ml Buffer PE; Zentrifugation für 1 min. bei 10000 g [G19]; Durchfluß verwerfen
- Zentrifugation für 1 min. bei >10000 g [G19]
- Überführen der QIAquick™ spin column in steriles 1,5 ml Eppendorf Gefäß
- Elution mit 50 µl H₂O bidest.; Zentrifugation für 1 min. bei 10000 g [G19]

Die DNA – Konzentration und Qualität wird mittels eines Agarose – Gels überprüft.

2.3.6. DNA – Fällung

In Lösung befindliche DNA kann auf unterschiedliche Weise gefällt werden.

2.3.6.1. Ammoniumacetat – Fällung [nach Sambrook et al., 1989]

Ammoniumacetat Lösung (10 M)

Ammoniumacetat	77,08 g
----------------	---------

- Mit H₂O bidest. auf 100 ml auffüllen

- Autoklavieren

Fällung

- Die wässrige DNA – Lösung wird mit ¼ Vol. der Ammoniumacetat Lösung (10 M) versetzt und gemischt
- Zugabe von 2 Vol. Ethanol (70%)
- 10 min. bei RT inkubieren
- Zentrifugation für 5 min. bei 12000 g und 0-4° C [G18]
- Überstand verwerfen
- Zugabe von 200 µl Ethanol (70%; 4° C), vorsichtig mischen [G13]
- Zentrifugation für 2 min. bei 12000 g und 0-4° C [G18]
- Überstand verwerfen
- Pellet bei 60° C trocknen [G12]

(Ammoniumacetat verhindert Fällung von dNTPs; sollte nicht angewendet werden, falls DNA nachträglich phosphoryliert wird)

2.3.6.2. n-Butanol – Fällung [nach Sambrook et al., 1989]

Fällung

- Die wässrige DNA – Lösung wird mit 10 Vol. n-Butanol p.A. versetzt und gemischt
- Zentrifugation für 15min. bei 13000 U/min. und RT [G19]
- Überstand verwerfen
- Mit Ethanol (70%; 4° C) durch Pipettieren waschen
- Zentrifugation für 2 –5 min. bei 13000 U/min. und RT [G19]
- Überstand verwerfen
- Pellet bei 60° C trocknen [G12]

(Salze werden beim Fällen nicht ausgewaschen)

2.3.6.3. Isopropanol – Fällung [nach Sambrook et al., 1989]

Fällung

- Die wässrige DNA – Lösung wird mit 1,5 Vol. Isopropanol p.A. versetzt und gemischt
- Zentrifugation für 30 min. bei 13000 U/min. und RT [G19]; Überstand verwerfen
- Mit 1 ml Ethanol (70%; 4° C) überschichten
- Zentrifugation für 10 min. bei 13000 U/min. und RT [G19]
- Überstand verwerfen
- Pellet bei 60° C trocknen [G12]

2.3.7. DNA – Isolierung aus *Chlamydomonas reinhardtii*

Die DNA – Isolierung wird mit Hilfe des „DNeasy™ Plant Mini Kit“ der Firma Qiagen®, Kat. Nr. 69104, durchgeführt. Das Prinzip besteht in der Lyse der Zellen, RNA – Verdauung, Fällung der Proteine, Polysaccharide und Salze nebst Entfernung der Zellfragmente, Bindung der DNA an eine Silikamembran, Waschen und Trocknen der DNA und schließlich der Elution. Folgende Schritte werden ausgeführt:

- *Chlamydomonas reinhardtii* wird bis zum Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase angezogen
- Zentrifugation von 250 ml für 10 min. bei 3000 U/min. (2200g) [G21]
- Überstand verwerfen, Resuspension der Zellen in 1 ml H₂O bidest.
- Aufteilung in 500 µl Portionen. Pro 500 µl Portion:
- Zugabe von 400 µl Buffer AP1, 4 µl RNase A stock Lösung
- Inkubation für 10 min. bei 65° C [G16]; 2-3 mal invertieren
- Zugabe von 130 µl Buffer AP2; mischen; für 5 min. auf Eis
- Lysat in QIAshredder spin column überführen; 2 min. bei 13000 U/min. zentrifugieren [G19]
- Durchfluß in steriles 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführen
- Zugabe von 0,5 Vol. Buffer AP3 und 1 Vol. Ethanol (96-100%); mischen
- Sukzessives Überführen von je 650 µl in DNeasy spin column; Zentrifugation für 1 min. bei 8000 U/min. [G19]; Durchfluß verwerfen
- Waschen der Säule mit 500 µl Buffer AW; Zentrifugation für 1 min. bei 8000 U/min. [G19]; Durchfluß verwerfen
- Waschen der Säule mit 500 µl Buffer AW; Zentrifugation für 2 min. bei 13000 U/min. [G19]; Durchfluß verwerfen
- Säule in neues Eppendorf Gefäß überführen; Elution der DNA mit 100 µl H₂O bidest. (65° C); Inkubation für 5 min. bei RT; Zentrifugation für 1 min. bei 8000 U/min. [G19]

Die DNA – Konzentration und Qualität wird mittels eines Agarose – Gels überprüft.

2.3.8. DNA – Restriktionsspaltung

Zur molekularbiologischen Arbeit mit DNA ist es oftmals nötig, diese an definierten Stellen zu schneiden. Biologische Hilfsmittel hierfür sind Restriktionsenzyme von unterschiedlichen Organismen, welche an definierten Erkennungssequenzen (oft Palindrome) entweder glatt („blunt end“) oder versetzt („sticky end“) schneiden.

Standartansatz einer DNA – Restriktionsreaktion

<i>C. r.</i> DNA	50 µg
Restriktionsenzym	50 units ^{*1}
10x Puffer (NEBuffer 1-4)	1/10 Vol.
Cofaktoren (z.B. BSA) ^{*2}	variabel

- Die Stoffe werden in einem sterilen Plastik – Reaktionsgefäß gemischt
- Inkubation für 1,5 – 2 Std. bei entsprechender Temperatur
- Manche Restriktionsenzyme können anschließend durch Hitze deaktiviert werden

*¹ Ein unit Restriktionsenzym schneidet 1 µg DNA/Std. bei optimaler Temperatur

*² Soweit vom Hersteller angegeben

Die DNA – Konzentration und Qualität wird mittels eines Agarose – Gels überprüft.

2.3.9. DNA – Sequenzierung

DNA – Sequenzierungen werden von der Firma *ITT* GmbH Biotech / Bioservice Sequenzierservice, Universitätsstraße 25, 33615 Bielefeld, ausgeführt. Dazu wird die DNA aufgereinigt (z.B. mit Hilfe des „QIAquick™ Gel Extraction Kit“ der Firma *Qiagen*®, Kat. Nr. 28704) und die Primer auf 10 µM verdünnt.

2.3.10. DNA – Verdauung

Wenn DNA – Reste in einem Ansatz, z.B. einer RNA – Probe, ausgeschlossen werden sollen, wird eine DNA – Verdauung mit DNase I /RNase free (Roche®) durchgeführt.

Standartansatz zur DNA – Verdauung in einer RNA – Probe

DNA – Kontamination	10 µg
DNase I (RNase free)	60 units
RNase Inhibitor	100 units
MgCl ₂	2mM
H ₂ O bidest.	variabel

- Inkubation für 1 Std. bei 37° C [G16]
- Inkubation für 5 min. bei 90° C [G16]

Die Verdauung kann mittels einer *PCR* – Reaktion überprüft werden.

2.3.11. Elektroporation von kompetenten *E. coli* Zellen mit pArg 7.8 ϕ 3

[nach Sambrook et al., 1989]

Zum Vermehren des Plasmids pArg 7.8 ϕ 3 wird dieses in den *E. coli* Stamm *DH5 α* transformiert.

SOC – Medium

<i>Bacto – Tryptone</i>	5 g
Hefe Extrakt	1,25 g
NaCl	0,15 g
KCl	0,045 g
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	0,51 g
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	0,615 g
Glucose	1 g
H ₂ O bidest.	auf 250 ml
pH = 7; Autoklavieren	

- In eine Elektroporationsküvette werden 1 – 2 ng Plasmid DNA und 100 μ l kompetente *E. coli* Zellen vom Stamm *DH5 α* gegeben
- Elektroporation. bei 400 Ω und 2,5 V [G2]
- Überführen in steriles 1,5 ml Eppendorf Gefäß; Zugabe von 800 μ l SOC Lösung
- Eppendorf Gefäß mit Luftloch für 1 Std. bei 37° C im Wasserbad [G16] inkubieren
- Zentrifugation für 30 sec. bei 13000 U/min. [G19]
- 700 μ l Überstand abnehmen und verwerfen
- Pellet im restlichen Überstand resuspendieren, auf eine LB_{Amp} Agarplatte [s. Kap. 2.1.3.] geben und verteilen
- Inkubation bei 37° C

Das Plasmid von verschiedenen Kolonien sollte überprüft werden, um sicher zu gehen, daß die gewählte *E. coli* Kolonie wirklich das gesamte Plasmid pArg 7.8 ϕ 3 enthält.

2.3.12. Herstellung von kompetenten *E. coli* Zellen vom Stamm *DH5 α*

[nach Hanahan, 1983]

Um *E. coli* Zellen effektiv transformieren zu können, werden diese vorher kompetent gemacht.

- Animpfen einer *E. coli* Einzelkolonie in 5 ml LB; über Nacht im Roller bei 37°C inkubieren
- Überimpfen der Kultur in 500 ml LB im Erlenmeyer Kolben; bis zur o.D.₅₈₀ = 0,5-0,7 bei 37° C unter schütteln [G8] wachsen lassen; Inkubation für 15 min. in Eiswasser, die folgenden Schritte bei 0° C durchführen (Lösungen und Rotoren vorkühlen)

- Zentrifugation von 250 ml Kultur für 15 min. bei 6000 U/min. [G17, Rotor Ja10]; Überstand verwerfen
- Zwei mal vorsichtig mit 20 ml H₂O bidest. spülen ohne das Pellet zu lösen
- Pellet in 5 ml H₂O bidest. lösen und 250 ml H₂O bidest. zugeben
- Zentrifugation der Zellen für 15 min. bei 5000 U/min. [G17, Rotor Ja10]
- Überstand verwerfen; Zellen im Rückfluß resuspendieren
- Suspension in zwei JA17 – Behälter aufteilen und jeweils 25 ml Glycerin (15%) zugeben.
- Zentrifugation für 15 min. bei 5000 U/min. [G17, Rotor Ja17]; Überstand verwerfen
- Pellet in 0,5 – 1 ml (1,5 Vol.) Glycerin (15%) resuspendieren
- Zellen in 100 µl Portionen bei in flüssigem Stickstoff schockgefrieren; bei – 80°C lagern.

2.3.13. Inverse Polymerase – Kettenreaktion (IPCR)

[nach Ochman et al., 1988]

Die inverse *PCR* dient der Ermittlung von unbekanntem DNA – Bereichen welche an eine bekannte Sequenz angrenzen. Dafür wird die DNA mit einem Restriktionsenzym geschnitten, welches nicht in dem bekannten Sequenzbereich schneidet. Anschließend werden die DNA – Fragmente auf geringe Konzentration verdünnt und mit DNA – Ligase behandelt, was die Bildung von DNA – Ringverbindungen zur Folge hat. Auf Grund dieser Zyklisierung kann nun mit sequenzspezifischen, „inversen“ *Primern*, die also aus der bekannten Sequenz herauslesen, der unbekanntem, angrenzende DNA – Bereich amplifiziert werden.

Standardansatz der IPCR

- 14 µg *C. r.* DNA wird mit einem Restriktionsenzym geschnitten
- Entfernung der Enzymmoleküle durch Phenolextraktion, Ammoniumacetat – DNA – Fällung
- Resuspension des DNA – Pellets in 50 µl H₂O bidest. (c ~ 0,1 µg DNA/µl)

IPCR – Ligation in großem Volumen

Ligationspuffer (10x)	50 µl
T4 DNA – Ligase (c = 10 Weiss units/µl)	0,75 µl
geschnittene DNA	5 µl
H ₂ O bidest.	444,25 µl

- Ligation über Nacht bei 14 ° C
- Isopropanol – Fällung

- 3 – Schritt *PCR* [s. Kap. 2.3.18.] mit inversen *Primern* und der zyklisierten Matrizen – DNA, dabei werden bis zu 40 Zyklen zur Amplifikation benötigt.

2.3.14. Mini HB – Lyse

[nach Birnboim & Doly, 1979]

Die Methode eignet sich zum schnellen Plasmid Nachweis, z.B. wenn viele *E.coli* Kolonien überprüft werden sollen.

	<u>Puffer1</u>	
Tris – Cl		50 mM
EDTA		10 mM
pH = 8		
	<u>Puffer2</u>	
NaOH		200 mM
SDS		1 % (w/v)
	<u>Puffer3</u>	
Kaliumacetat		2,55 M
pH = 4,8 (mit Eisessig)		
	<u>TE Puffer</u>	
Tris – Cl		10 mM
EDTA		1 mM
pH = 7,4		

- *E. coli* in 2 ml Anzuchtsmedium über Nacht bei 37° C inkubieren
- Zentrifugation für 15 min. bei 4000 g [G20]; Überstand verwerfen
- Zellen in 200 µl Puffer1 resuspendieren; In steriles 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführen
- Zugabe von 200 µl Puffer2; Mischen
- Zugabe von 200 µl Puffer3; Mischen
- Zentrifugation für 15 min. bei 13000 g [G19]; Überstand in steriles 1,5 ml Eppendorf Gefäß überführen
- Zugabe von 500 µl Isopropanol
- Zentrifugation für 20 min. bei 13000 g [G19]; Überstand verwerfen; Pellet mit Ethanol (70%) waschen
- Zentrifugation für 2 min. bei 13000 g [G19]; Überstand verwerfen; Pellet bei 60° C trocknen [G12]
- Pellet in 10 µl TE Puffer lösen; Zugabe einer RNAse bis zur Konzentration von 20 µg/ml
- Zugabe von 2 Vol. eiskaltem Ethanol (100%)
- Zentrifugation für 20 min. bei 13000 g [G18] und 4° C; Überstand verwerfen; Pellet bei RT trocknen
- Resuspension des Pellets in 10 µl TE Puffer

Die Plasmid DNA wird mittels eines Agarose – Gels überprüft.

2.3.15. pGEM[®]-T Easy Vektor – System

Das „pGEM[®]-T Easy Vector System“ der Firma Promega™, Kat. Nr. A1380, ist geeignet, DNA – Stränge mit einem nicht gepaarten 3´ Adenin an beiden Seiten durch Einklonieren in den Vektor und Transformation in *E. coli* zu vermehren. Das Plasmid kann dann zum Sequenzieren verwendet werden. Dieses System kann angewandt werden, wenn es nicht möglich ist, ein *PCR* – Produkt direkt zu sequenzieren und dieses unter Verwendung einer DNA – Polymerase, die keine 3´–5´ Exonucleaseaktivität besitzt (z.B. Taq) und daher ein ungepaartes Adenin an beiden 3´-Enden hinterläßt, hergestellt wurde. Durch die Insertion des *PCR* – Produktes wird das auf dem Plasmid befindliche Gen für die β-Galaktosidase unterbrochen, so daß über die im Plasmid vorhandene Ampicillinresistenz nur transformierte *E. coli* Zellen, über die X – Gal Farbreaktion nur *E. coli* Klone (weiß) mit dem *PCR* – Insert selektiert werden können.

IPTG Stammlösung (0,1 M)

IPTG	0,1 M
H ₂ O bidest.	variabel

X-Gal (0,122 M)

X-Gal	0,122 M
H ₂ O bidest.	variabel

LB Platten mit Ampicillin, IPTG, X-Gal

Ampicillin	100 mg/l
IPTG	0,5 mM
X-Gal	80 mg/l
Agar	1,5 % (w/v)
LB – Medium	variabel

- Ligation von *PCR* – Produkt und Vektor nach folgendem Ansatz

Ligationsansatz

2x rapid ligation buffer	5 µl
pGem [®] -T Easy Vector	1 µl
<i>PCR</i> – Produkt	variabel
T4 DNA – Ligase	1 µl
H ₂ O bidest.	auf 10 µl

- Ligation über Nacht bei 10° C
- Auf Eis werden 2 µl Ligationsansatz mit kompetenten *E. coli* Zellen (50 µl Jm109 oder 100 µl *XLI-Blue* Zellen) vorsichtig gemischt

- Inkubation für 20 min. auf Eis
- Hitzeschock für 45-50 sec. bei exakt 42° C, dabei nicht schütteln
- Inkubation für 2 min. auf Eis
- Zugabe von 950 µl SOC [s. Kap. 2.3.11.] auf RT
- Rollern für 1,5 Std. bei 37° C
- Ausplattieren von 100-500 µl pro LB_{Amp,IPTG,X-Gal} Platte
- Inkubation über Nacht bei 37° C
- Weiße Kolonien werden in LB_{Amp} [s. Kap. 2.1.3.] zur weiteren Untersuchung angezogen

2.3.16. Phenol / Chloroform – Proteinextraktion

[nach Sambrook et al., 1989]

Diese Methode dient der Proteinextraktion aus wäßrigen DNA – Lösungen. Eingesetzt wird die Methode wenn z. B. Enzyme nach einer DNA – Bearbeitung wieder entfernt werden sollen.

Standartansatz der Phenol / Chloroform – Proteinextraktion

Roti [®] Phenol/Chloroform Lösung (1/1)	1 Vol.
Wäßrige Lösung	1 Vol.

- Mischen der Lösungen
- Zentrifugation für 1 min. bei 13000 U/min. [G19]
- Überführen der wäßrigen Phase in ein neues, steriles Gefäß
- Wiederholen der Extraktion, bis kein Protein an der Grenzfläche mehr sichtbar ist
- Abschließend kann eine Extraktion mit gleichem Volumen Chloroform durchgeführt werden, um sämtliche Phenolreste zu entfernen

2.3.17. Plasmid – Isolierung

Die Plasmid – Isolierung wird mit Hilfe des „E.Z.N.A.[®] Plasmid Miniprep Kit II“ der Firma *peqLab* Biotechnologie GmbH, Kat. Nr. 12-6945-01, durchgeführt. Das Prinzip besteht in der Lyse der Zellen, RNA – Verdauung, Neutralisierung des Lysats, Pelletierung des bakteriellen Debris, Bindung der Plasmid DNA an eine Silikamembran, Entfernung von Kontaminationen durch waschen und trocknen der DNA nebst Elution. Folgende Schritte werden ausgeführt:

- Die *Escherichia coli* Zellen werden über Nacht in 100 ml Anzuchtmedium bei 37 °C im Schüttler [G8] inkubiert.
- Je 50 ml der Lösung wird in ein steriles Corning[®] 50 ml Centrifuge Tube überführt
- Zentrifugation für 10 min. bei 5000 U/min. [G17, Rotor Ja17]; Überstand verwerfen

- Resuspension der Zellen in 500 µl Lösung I /RNase A
- Zugabe von 500 µl Lösung II; 4-6 mal invertieren; u.U. 5 min. bei RT inkubieren
- Zugabe von 700 µl Lösung III; mischen; in sterile 1,5 ml Eppendorf Gefäße portionieren
- Zentrifugation für 5 min. bei 10000 U/min. [G19]
- Sukzessives Überführen von je 800 µl Durchfluß in HiBind®-Miniprep-Zentrifugensäule; Zentrifugation für 1 min. bei 10000 U/min. [G19]; Durchfluß verwerfen
- Zugabe von 500 µl HB – Puffer; Zentrifugation für 1 min. bei 10000 U/min. [G19]; Durchfluß verwerfen
- Zugabe von 750 µl DNA–Waschpuffer; Zentrifugation für 1 min. bei 10000 U/min. [G19]; Durchfluß verwerfen
- Zentrifugation für 1 min. bei 13000 U/min. [G19]
- Überführen der Säule in steriles 1,5 ml Eppendorf Gefäß; Elution mit 50 µl H₂O bidest.; Zentrifugation für 1 min. bei 13000 U/min. [G19]

Die Plasmid – Konzentration und Qualität wird mittels eines Agarose – Gels überprüft.

2.3.18. Polymerase – Kettenreaktion (PCR)

[nach Saiki et al., 1985]

Die Polymerase – Kettenreaktion ist als eine der wichtigsten molekularbiologischen Methoden etabliert.

Sie basiert auf der logarithmischen Vermehrung von definierten DNA – Abschnitten durch *Primer* – vermittelte Aktivität einer hitzestabilen DNA – Polymerase. Mittels dieser Technik lassen sich geringste Mengen DNA (bis hin zu einem einzigen DNA Molekül) in beliebiger Menge synthetisieren und so für weitere Untersuchungen zugänglich machen.

Schema:

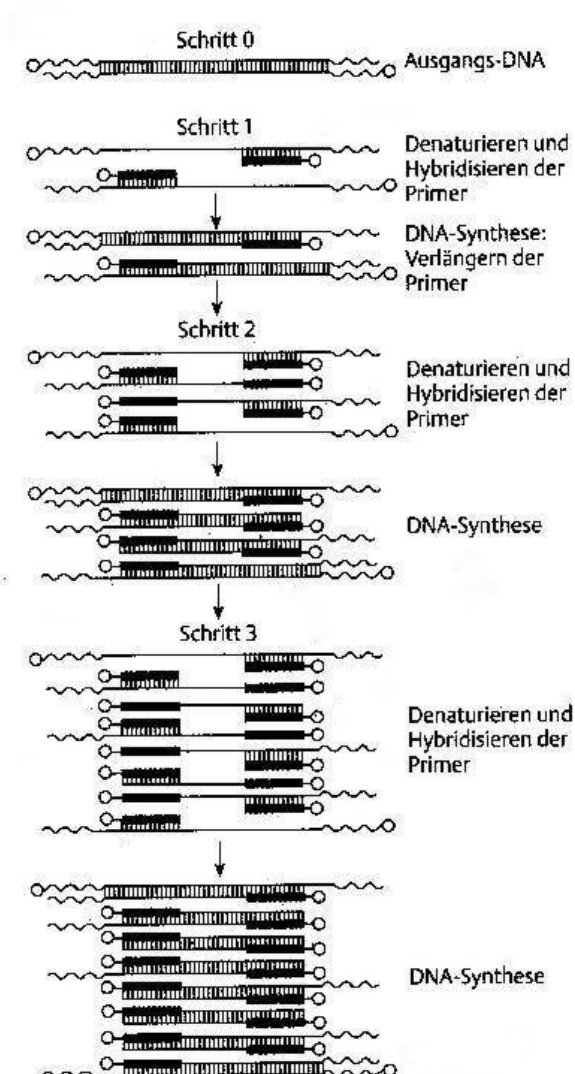


Abbildung 12: Polymerase – Kettenreaktion

gezielte DNA – Amplifikation durch zyklisches Denaturieren, *Primer* annealing und DNA – Synthese (aus: Knippers „Molekulare Genetik“ ©1997)

Standartansatz einer PCR – Reaktion

<i>Primer1</i>	0,2µM
<i>Primer2</i>	0,2µM
dATP, dTTP, dGTP, dCTP	je 200µM
10x PCR – Pufferlösung (<i>Qiagen</i>) (Tris – Cl, KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , 15mM MgCl ₂ , pH=8,7)	5 µl
H ₂ O bidest. auf 50 µl	
Taq Polymerase (<i>Qiagen</i>)	2,5 units
Matrizen – DNA	≤ 0,5 µg/50µl Ansatz

- Die Lösungen werden in PCR – Gefäße pipettiert und im Thermocycler [G11] zyklisch erhitzt. Ein typisches 3 – Schritt PCR – Programm hat folgende Zyklen:

Schritt	1	2	3	4	5	6
Temp.	94° (Denaturierung)	94° (Denaturierung)	variabel (Anneling)	72° (Elongation)	72° (Elongation)	4° (Ende)
Zeit	5 min.	1 min.	45 sec.	~1 min./1000 bp	5 min.	∞

- Die Schritte 2 – 4 werden vom Thermocycler je nach Programm unterschiedlich oft wiederholt, meist 30 – 40 mal.

2.3.18.1. Liste der verwendeten PCR – Primer

1836 SP1;23-mer;Td=78°:
5' GGACGGGCAGTTGCGAGGGAAGC 3'
1836 SP2;20-mer;Td=70°:
5' GCTGGCGGCGCTGCTGTGTC 3'
1836 SP3;24-mer;Td=78°:
5' CGCTAAGCCCGAAGTCCGCAACCT 3'
390434 F;19-mer;Td=60°:
5' TGTTCCACCACCTGGACGT 3'
390434 R;20-mer;Td=58°:
5' AACGAGCATCTCGAAGATGA 3'
391836 F;19-mer;Td=58°:
5' CGCTAGCAATGTGCTGCTT 3'
391836 R;19-mer;Td=58°:
5' TTGCGAGGGAAGCTGAACA 3'
393542 F;20-mer;Td=58°:
5' TTTATCGTAAGCAGCCTTGG 3'
393542 R;20-mer;Td=62°:
5' CGGCTTCACCATGTAGTCCA 3'
396717 F;20-mer;Td=66°:
5' GCACCGCTACCCTCCCTACA 3'
396717 F2;24-mer;Td=80°:
5' GTAGCAGCCCGATGAGCCAGACG 3'
396717 R;20-mer;Td=68°:
5' CCGTCTCGCCGCTTCCACA 3'
397229 F;18-mer;Td=54°:
5' AATGGCCGCCATCATGAA 3'
397229 R;21-mer;Td=62°:
5' AGTCAAGCAGAGTTATGCCGA 3'
ARG7ENDF(11616-11637);22-mer;Td=68°:
5' GCACCAACAACACGACGCATGT 3'
ATPBF 531 (509-531);23-mer;Td=64°:
5' AAGGAGTTATGGGATTGTGTAT 3'
Cab SP1;24-mer;Td=74°:
5' CATCTCCGCTCAATCAGCCAGTA 3'
Cab SP2;24-mer;Td=78°:
5' TAGGCCGAGGGGGTGAACCTGGTG 3'
Cab SP3;22-mer;Td=68°:
5' TCACGATGGCCTGGACGAAGAA 3'
CabTeil F;19-mer;Td=64°:
5' CCGCCTGGCATCGTTCTCC 3'
CabTeil R;19-mer;Td=66°:
5' GGTGCCGCCCGCCTAAGTC 3'
EST IPCR;22-mer;Td=72°:
5' AGCGCTGGTGGTGTCTGTCTG 3'
EST IPCR;20-mer;Td=66°:
5' TCCGGCGCCATGTAGTGAGG 3'
I 390434 F;20-mer;Td=62°:
5' TATCAGGCTCCCGAGGTGAT 3'
I 390434 R;19-mer;Td=60°:
5' ACGTCCAGGTGGTGAACA 3'
I 391836 F;19-mer;Td=58°:
5' TGTTCCAGCTTCCCTCGCAA 3'
I 391836 R;20-mer;Td=60°:
5' CCTGAAGCAGCACATTGCTA 3'
IPCR FWD(1268-1288);21-mer;Td=60°:
5' AGAGGCCAAAAATGGGTCATA 3'
IPCR REV(911-891);21-mer;Td=60°:
5' TTCGAGTTCATTGCTTGTCA 3'

IPCR2 FWD(946-969);24-mer;Td=70°:
5' TCGGAGATGAGCTATGTGACTACT 3'
IPCR2 REV(850-873);24-mer;Td=62°:
5' TTTAATATCTCGGTGAACAACTTT 3'
M13uni (-21);18-mer;Td=54°:
5' TGTAACAAACGACGGCCAGT 3'
M13rev (-29);18-mer;Td=54°:
5' CAGGAAACAGCTATGACC 3'
PBREND(306-283);24-mer;Td=70°:
5' AGTCAGGCACCGTGTATGAAATCT 3'
Phi x174F;25-mer;Td=68°:
5' GTTAACAAAAGTCAGATATGGACC 3'
Phi x174R;24-mer;Td=70°:
5' GTTAACCTCTGCTCATGGAAGCGA 3'
PolyT;17-mer;Td=34°:
5' TTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'
PolyT-RE;26-mer;Td=72°:
5' GGGCGGCCGCTTTTTTTTTTTTTTTT 3'
PrKiF 874 (854-874);21-mer;Td=54°:
5' TTGTTCCCGAGATATTAAT 3'
PrKiR 854 (874-854);21-mer;Td=54°:
5' ATTTAATATCTCGGTGAACAA 3'
R02;18-mer;Td=54°:
5' CATCCTGACTGTCGATGT 3'
T7-Promotor (-43);20-mer;Td=56°:
5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'
T11 F 854 (844-854);11-mer;Td=32°:
5' GAGCCTAAAGT 3'
T11 R 1123 (1133-1123);11-mer;Td=30°:
5' TCCACAAGATT 3'
T13 F 932 (920-932);13-mer;Td=38°:
5' ACTTTGGGTTAGC 3'
T13 R 1139 (1151-1139);13-mer;Td=36°:
5' ACCAATCTCTTCA 3'
TAK-EST F;24-mer;Td=78°:
5' GCCGGGCCAGTCGCAGATACAGAA 3'
TAK-EST R;24-mer;Td=78°:
5' ATCCGCCTCCAGACACGACACCAC 3'
TAK FORW (1-23);23-mer;Td=68°:
5' ATGGCGGATTCTCACTCAGTCAA 3'
TAKFWD2(51-74);24-mer;Td=64°:
5' TTTTGGTTTACGTTTATGGGTTGT 3'
TAK REV(1456-1479);24-mer;Td=68°:
5' CTAGTTCTGCTTATTCTCCAAAGC 3'
TAKTeilF(859-882);24-mer;Td=64°:
5' CACCGAGATATTAATCGAGTAAT 3'
TAKTeilR(1297-1317);21-mer;Td=62°:
5' CAAGTCCTCAGCTTCAAGCAT 3'
TTchen-F(772-791);20-mer;Td=56°:
5' CTTACTTGGGAGATTAGGAT 3'
TTchen-R(1001-982);20-mer;Td=62°:
5' GGAGCCACATAACCCAAACGT 3'
TTeil IF(872-895);24-mer;Td=64°:
5' AATCGAGTAATATCTTGCTTGACA 3'
TTeil IR(1263-1281);19-mer;Td=52°:
5' CATTTTTGGCCTCTTTTGA 3'

2.3.19. Pool – Versuch

Die *Pool* – Versuche dienen dazu, herauszufinden bis zu welcher Verdünnung es noch möglich ist, eine genetische Markierung einer *C. reinhardtii* Zelle mittels *PCR* aufzufinden. Dies ist z.B. für Versuche der reversen Genetik mit Zufallsmutanten von Bedeutung [Krysan et al., 1996; 1999; Winkler et al., 1998].

- Zellen der beiden *C. reinhardtii* Stämme *Stm1* und *CC1618* werden im entsprechenden Anzuchtmedium angesetzt und bis o.D. = 0,5 bei 23° C und 40 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ Tageslicht auf einem Schüttler [G9] bei 130 rpm wachsen gelassen
- Zentrifugation von 250 ml für 10 min. bei 3000 U/min. (2200g) [G21]
- Überstand verwerfen, Resuspension der Zellen in 1 ml H₂O bidest.
- Aufteilung in 500 μl Portionen in sterile 1,5 ml Eppendorf Gefäße
- Zentrifugation für 1 min. bei 10.000g [G19]; Überstand verwerfen
- In sterilen 1,5 ml Eppendorf Gefäßen werden verschiedene Verhältnisse der zwei Lösungen *Stm1/CC1618* (1/10; 1/15; 1/20; 1/50; 1/100; 1/1000) gemischt
- DNA – Isolierung des Gemisches mit „DNeasy™ Plant Mini Kits“ der Firma Qiagen®, Kat. Nr. 69104
- *PCR* – Nachweisreaktion mit den *Primern* Phi x174F/R, welche einen Bereich von 394 bp des bei der *Stm1* Mutante inserierten Plasmids amplifizieren

2.3.20. 5'/3' RACE

[nach Frohman et al., 1988]

Das Akronym *RACE* steht für *rapid amplification of cDNA ends*. Diese Methode erlaubt es, ausgehend von einer bekannten Gensequenz die 5'– und 3' Enden der mRNA zu sequenzieren. Für jedes Ende wird ein eigener Ansatz benötigt:

3' Ende:

Dieses Ende ist technisch leichter zu amplifizieren. Man nutzt hier die Tatsache, daß nahezu alle kerncodierten mRNAs ein Poly-(A) 3' Ende besitzen. So kann ein Poly-(T) *Primer* zur reversen Transkription der mRNAs zu cDNAs genutzt werden. Dieser cDNA – *Pool* wird anschließend als Matrize für eine *PCR* – Reaktion mit dem Poly-(T) *Primer* und einem sequenzspezifischen *Primer* eingesetzt. So wird selektiv das 3' Ende der zu untersuchenden mRNA amplifiziert.

5' Ende:

Für dieses Ende wird ein sequenzspezifischer *Primer* für die cDNA – Synthese eingesetzt, so daß nur die mRNA von Interesse zu cDNA umgeschrieben wird. An das 3' Ende der entstandenen cDNA, daß dem 5' Ende der mRNA komplementär ist, wird mit dem Enzym terminale Transferase ein künstliches Poly-(A) Ende angefügt.

Mittels eines Anker-Poly-(T) *Primers* bestehend aus 5' Ankersequenz und 3' Poly-(T) Ende und dem sequenzspezifischen, zur reversen Transkription genutzten (bzw. einem entsprechenden nested *Primer*) wird die erste *PCR* – Reaktion durchgeführt. Falls diese kein eindeutiges Resultat bringt, wird eine zweite *PCR* – Reaktion, mit dem verdünnten Produkt der ersten *PCR* – Reaktion als Matrize, durchgeführt. Diesmal werden als *Primer* der Ankerprimer (entspricht dem Anker-Poly-(T) *Primer* ohne die 3' Poly-(T) Sequenz) und einem sequenzspezifischen nested *Primer* durchgeführt.

Standartansatz für 3' RACE
[nach Frohman et al., 1988]

- Die RNA – Probe (1-2 µg RNA) wird mit DNase behandelt [s. Kap. 2.3.10.] und revers transkribiert [s. Kap. 2.3.21.]. Dann wird der 3' RACE *PCR* – Ansatz präpariert:

<i>Primer1</i> (sequenzspezifisch)	0,2µM
<i>Primer2</i> (PolyT RE)	0,2µM
dATP, dTTP, dGTP, dCTP	je 200µM
10x <i>PCR</i> – Pufferlösung (<i>Qiagen</i>) (Tris – Cl, KCl, (NH ₄) ₂ SO ₄ , 15mM MgCl ₂ , pH=8,7)	5 µl
H ₂ O bidest. auf 50 µl	
Taq Polymerase (<i>Qiagen</i>)	2,5 units
Matrizen – cDNA – Pool	3 µl Ansatz

- Die *PCR* wird mit folgendem 3 – Schritt Programm durchgeführt [G11]:

Schritt	1	2	3	4	5	6
Temp. (in ° C)	94	94	60	72	72	4
Zeit (in min.)	5	1	0.75	0.5	10	∞

- Die Schritte 2-4 werden 35x wiederholt.
- Nach der *PCR* – Reaktion werden 5 µl des Produkts im 1%-igen Agarose – Gel geprüft

Standartansatz für 5' RACE

[nach Frohman et al., 1988]

- Die RNA – Probe (1-2 µg RNA) wird mit DNase behandelt [s. Kap. 2.3.10.] und revers transkribiert [s. Kap. 2.3.21.]
- Die 5' RACE wird mit Hilfe des „5'/3' RACE Kit“ der Firma Roche, Kat. Nr. 1734792, den Anweisungen folgen durchgeführt, die cDNA – Reinigung wird mit Hilfe des „High pure PCR Product purification Kit“ der Firma Roche, Kat. Nr. 1732668, den Anweisungen folgen durchgeführt

Erststrang cDNA – Synthese

cDNA synthesis buffer	4 µl
deoxynucleotid mixture	2 µl
cDNA synthesis <i>primer</i> SP1	1 µl
RNA (DNase behandelt)	0,2-2 µg
H ₂ O bidest.	auf 20 µl

- Ansatz auf Eis zusammen pipettieren; mischen; kurz zentrifugieren
- Inkubation für 1 Std. bei 55° C
- Inkubation für 10 min. bei 65° C; kurz zentrifugieren

Reinigung der cDNAs

- Zugabe von 100 µl binding buffer zu dem 20 µl cDNA – Ansatz; mischen
- Probe in High pure filter tube geben; Zentrifugation für 30 sec. bei 13000 U/min. [G19]; Durchfluß verwerfen
- Zugabe von 500 µl wash buffer; Zentrifugation für 30 sec. bei 13000 U/min. [G19]; Durchfluß verwerfen
- Zugabe von 200 µl wash buffer; Zentrifugation für 30 sec. bei 13000 U/min. [G19]; Durchfluß verwerfen
- Filter tube in steriles 1,5 ml Eppendorf Gefäß geben
- Elution mit 50 µl Tris – Cl (10 mM); Zentrifugation für 30 sec. bei 13000 U/min. [G19]

Anfügen des Poly-(A) Endes an die cDNA

gereinigte cDNA – Probe	19 µl
reaction buffer	2,5 µl
2 mM dATP	2,5 µl

- Ansatz auf Eis im sterilen Plastikgefäß zusammen pipettieren
- Inkubation für 3 min. bei 94° C [G16]; auf Eis stellen; kurz zentrifugieren
- Zugaben von 1 µl terminale Transferase (10 units); mischen
- Inkubation für 20-30 min. bei 37° C [G16]
- Inkubation für 10 min. bei 70° C [G16]; kurz zentrifugieren; auf Eis stellen

PCR – Amplifikation der d(A) verlängerten cDNA

sequenzspezifischer <i>Primer</i> (12,5 µM)	1 µl
oligo dT anchor <i>primer</i>	1 µl
deoxynucleotid mixture	1 µl
Taq Polymerase (<i>Qiagen</i>)	0,5 µl
reaction buffer	5 µl
Matrize d(A) verlängerte cDNA	5 µl
H ₂ O bidest.	36,5 µl

- Die *PCR* wird mit folgendem 3 – Schritt Programm durchgeführt [G11]:

Schritt	1	2	3	4	5	6
Temp. (in ° C)	94	94	60	72	72	4
Zeit (in min.)	5	1	0.75	2	5	∞

- Die Schritte 2-4 werden 38x wiederholt.

Nach der *PCR* – Reaktion werden 5 µl des Produkts im 1%-igen Agarose – Gel geprüft. Falls das Resultat keine eindeutige Amplifikation ist, wird eine zweite *PCR* mit dem anchor *Primer* (5'/3' *RACE* Kit) und einem nested *Primer* durchgeführt.

2.3.21. Reverse Transkription

Um cDNA aus RNA herzustellen, wird diese revers transkribiert. Dazu bedient man sich der reversen Transkriptase von RNA – Viren wie dem *Avian myeloblastosis virus* (AMV), dem *Moloney murine leukemia virus* (MMLK), dem *Human immunodeficiency virus* (HIV) oder rekombinaten Alternativen wie Omniscript™ Reverse Transkriptase (*Qiagen*®).

In vivo besitzen reverse Transkriptasen neben der Fähigkeit, ssRNA in cDNA zu transkribieren oft eine RNase H Aktivität, welche die RNA im DNA::RNA – Hybriden degradiert und eine DNA – Polymerase – Aktivität, die den cDNA – Strang zu dsDNA komplettiert. *In vitro* werden die ersten beider Aktivitäten zur Produktion von einzelsträngiger cDNA genutzt.

Die Durchführung der reversen Transkription mit Hilfe des „Omniscript™ RT Kits“ der Firma *Qiagen*®, Kat. Nr. 205111, verläuft folgendermaßen:

Standartansatz zur reversen Transkription

10x Buffer RT	2 µl
dNTP Mix (5 mM each dNTP)	2 µl
<i>Primer</i> * (10µM)	2 µl
RNAse Inhibitor (10 units/µl)	1 µl
Omniscrypt Reverse Transkriptase	1 µl
Matrizen – RNA	< 2µg

- Alle Arbeiten werden auf Eis durchgeführt
- Zugabe von RNAse freiem H₂O bidest., bis zum Volumen von 20 µl in sterilem RNAse freiem Plastikgefäß (z.B. PCR – Gefäß); < 5 sec. mischen [G13]; kurz zentrifugieren
- Inkubation für 1 Std. bei 37 ° C [G16]
- Reverse Transkriptase kann inaktiviert werden durch Inkubation für 5 min. bei 93° C gefolgt von schnellem Kühlen auf Eis

*1 Die *Primer* können z.B. Oligo-d(T) *Primer* oder zufällige Hexanucleotide sein

Der Erfolg der cDNA – Synthese kann durch eine geeignete PCR – Reaktion kontrolliert werden.

2.3.22. RNA – Isolierung von *Chlamydomonas reinhardtii*

[nach Wilkerson et al., 1994]

Vorarbeiten

- Alle Geräte und Lösungen müssen vor Benutzung von RNAsen befreit werden [Blumberg, 1987]
- Anzucht von 200 ml *C. r.* Zellen bis zur mittleren bis späten log Phase

Lysis buffer

Tris – Cl (pH = 8)	20 mM
EDTA	20 mM
SDS	5 % (w/v)
Proteinase K	0,1 – 1 mg/ml
H ₂ O bidest. RNAse free	variabel

Natriumacetat Lösung (3M)

Natriumacetat	3 M
H ₂ O bidest. RNAse free	variabel

Ethanol 80%

Ethanol (100%)	48 ml
H ₂ O bidest. RNAse free	12 ml

Lithiumchlorid Lösung (4M)

Lithiumchlorid	4 M
H ₂ O bidest. RNAse free	variabel

- Zentrifugation der 200 ml in 50 ml Portionen in sterilen Corning® 50 ml Centrifuge Tubes für 4 min. bei 4000 U/min. [G17, Ja 17 Rotor]; Überstand verwerfen, in Restflüssigkeit resuspendieren, Suspensionen vereinen
- Gesamte Zellsuspension in dünnen Strahl in 40 ml Lysis buffer geben, dabei rühren
- Inkubation für 4 Std. bei RT
- Zugabe von 5 ml Natriumacetat Lösung (3M); mischen
- In 2 sterile Corning® 50 ml Centrifuge Tubes aufteilen; Zugabe von je 25 ml Roti® Phenol/Chloroform Lösung (1/1); vortexen
- Zentrifugation für 15 min. bei 4000 U/min. [G17, Ja 17 Rotor]
- Wäßrige obere Phase in neues steriles Corning® 50 ml Centrifuge Tube geben;
- Zugabe von 1 Vol. Isopropanol; Inkubation für 15 min. bei RT
- Zentrifugation für 10 min. bei 5000 U/min. [G17, Ja 17 Rotor]
- RNA – Pellets durch Spülen mit Ethanol (80%) waschen
- Zugabe von 5 ml H₂O bidest. RNase free pro Pellet
- Zugabe von 5 ml Lithiumchlorid Lösung (4M) pro Pellet
- Inkubation auf Eis über Nacht
- Zentrifugation für 30 min. bei 5000 U/min. [G17, Ja 17 Rotor]; Überstand restlos verwerfen
- Zugabe von 1,8 ml H₂O bidest. RNase free pro Pellet; Vereinigung der Pellets
- Zugabe von 0,4 ml Natriumacetat Lösung (3M) und 10 ml Ethanol (100%); mischen und bei -70° C lagern

Die RNA – Konzentration und Qualität wird mittels eines Agarose – Gels für RNA [s. Kap. 2.3.2.] überprüft.

2.3.23. RNA – Verdauung

Um RNA – Kontaminationen bei DNA – Isolierungen zu verhindern, kann eine RNA – Verdauung mit einer RNase (z.B. RNase A) durchgeführt werden.

<u>RNase A Lösung (c = 25 mg/ml)</u>	
Tris – Cl	10 mM
NaCl	15 mM
RNase A	25 mg/ml

- RNase A einwiegen und in 1 ml Portionen in Tris – Cl und NaCl Lösungen auflösen
- Für 15 min. auf 100 ° C erhitzen; auf RT abkühlen lassen
- Bei - 20 ° C lagern

Standartansatz zur RNA – Verdauung in einer DNA – Probe

RNase Lösung (c = 25 mg/ml)	auf 25 µg/ml
DNA – Probe	variabel

- Für 1 Std. bei 37° C inkubieren

2.3.24. Southern blot

[nach Southern, 1975]

Das *Southern blot* Verfahren beruht auf der Bindung einer markierten DNA – Sonde an DNA – *Template* Moleküle, die an einer Membran fixiert sind.

Zunächst wird die genomische DNA durch Restriktionsverdauung in viele unterschiedlich große Fragmente gespalten. Diese werden durch ein Agarose – Gel der Größe nach getrennt, denaturiert und auf eine Nitrozellulosemembran *geblottet*. Mit diesen fixierten, einzelsträngigen DNA – Molekülen können dann die markierten, einzelsträngigen DNA – Sonden hybridisieren. Die Stellen, an denen die Sonden gebunden haben, werden dann durch immunologische Methoden oder Autoradiographie nachgewiesen.

Durch das *Southern blot* Verfahren kann beispielsweise überprüft werden, ob ein *Marker* durch eine Transformation mehr als ein Mal in das Genom integriert wurde.

	<u>Denaturierungslösung</u>	
NaCl		1,5 M
NaOH		0,5 M
	<u>Neutralisierungslösung</u>	
Tris – Cl		1 M
NaCl		2 M
pH = 8,0		
	<u>20 x SSC</u>	
Na ₃ – Citrat		0,3 M
NaCl		3 M
pH = 7,0		
	<u>Hybridisierungslösung</u>	
SSC		5 x
Blocking Reagenz (Pharmacia®)		1 % (w/v)
	<u>Waschpuffer 1</u>	
SSC		2 x
SDS		0,1 % (w/v)
	<u>Waschpuffer 2</u>	
SSC		0,1 x
SDS		0,1 % (w/v)
	<u>Puffer 1</u>	
Tris – Cl		100 mM

NaCl	150 mM
pH = 7,5	
<u>Puffer 2</u>	
Puffer 1	
Blocking Reagenz (Pharmacia®)	1 % (w/v)
<u>AP Puffer</u>	
Tris – Cl	6,05 g
NaCl	2,92 g
MgCl ₂ · 6 H ₂ O	5,1 g
H ₂ O bidest.	auf 500 ml
pH = 9,5	

- 1 µg DNA wird mit einem passenden Restriktionsenzym geschnitten
- Die Lösung wird im Agarose – Gel (1% w/v) eingesetzt; Elektrophorese

DNA – Blot

- Das Gel wird aus der Kammer gelöst und in eine Schale überführt
- 2 x Inkubation für 20 min. mit 0,5 l Denaturierungslösung bei RT
- 2 x Inkubation für 20 min. mit 0,5 l Neutralisierungslösung bei RT
- 5 Filterpapiere (Whatman®, 3mm) und eine Hybond® Nitrozellulosemembran (von Gel Größe) werden in 2x SSC Lösung getränkt
- *Druckblot* wird zusammengebaut:

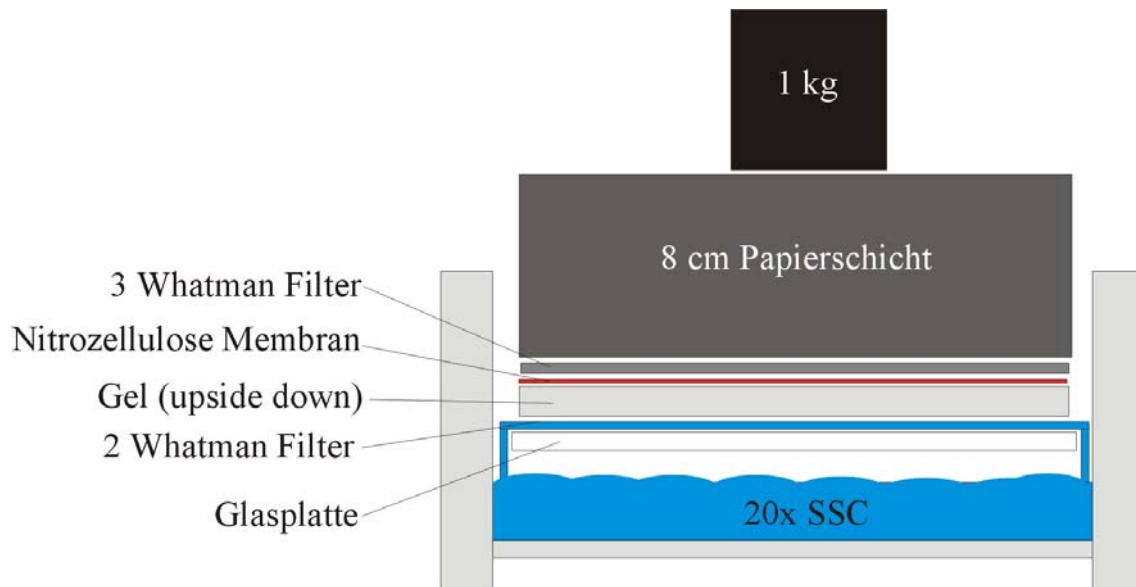


Abbildung 13: Schematischer Aufbau eines *Southern blots*

- Luftblasen auf Whatman[®] Filtern und der Nitrozellulosemembran werden durch glatt rollen mit einem Glasstab entfernt
- Inkubation für 20 Std. bei RT

DNA – Fixierung

- Nitrozellulosemembran wird in Frischhaltefolie gewickelt und für 5 min. bei 312 nm auf dem UV Transilluminator fixiert

Hybridisierung

- Membran wird in ein Hybridisierungsröhrchen gegeben
- Zugabe von 20 ml Hybridisierungslösung; Rollern für 5 Std. bei 68° C; Lösung verwerfen
- Zugabe von 7 ml Hybridisierungslösung und markierte Sonden – DNA; Rollern über Nacht bei 68° C; Lösung sammeln
- 2x waschen für je 10 min. mit 50 ml Waschpuffer 1 bei RT
- 2x waschen für je 10 min. mit 50 ml Waschpuffer 2 bei RT
- Membran trocknen und gegebenenfalls bei 4° C lagern

Immunologischer Nachweis

- Waschen mit Puffer 1
- Zugabe von 20 ml Puffer 2; Rollern für 30 min. bei 68° C; Lösung verwerfen
- Zugabe von 50 ml Puffer 1; Rollern für 10 min. bei RT; Lösung verwerfen
- Zugabe von 20 ml Puffer 1 und 4 µl Anti-Digoxigenin-AP Fab fragments[™] (Boehringer[®]) Antikörperkonjugat; Rollern für 30 min. bei RT; Lösung verwerfen
- 2x waschen für je 15 min. mit 50 ml Puffer 1 bei RT
- Membran in *Blot* – Schale überführen
- Zugabe von 20 ml AP Puffer, 60 µl NBT und 105 µl BCIP; Lösung verwerfen, wenn Banden sichtbar sind
- Waschen mit H₂O bidest. und trocknen

2.3.25. Southern dot blot

[nach Southern, 1975]

Das *dot blot* Verfahren ist eine Variante des *Southern blot* Verfahren, es werden die gleichen Lösungen eingesetzt.

- Eine Hybond[®] Nitrozellulosemembran wird auf gewünschte Größe geschnitten, Felder werden mit einem Bleistift markiert
- Zugabe von 20x SSC Lösung zu den DNA – Proben, bis diese 6x SSC konzentriert sind
- Inkubation für 10 min. in kochendem Wasser; auf Eis; kurz zentrifugieren

- Die Nitrozellulosemembran wird mit 6x SSC gewässert und zum Antrocknen auf eine Lage 3mm Whatman[®] Filterpapier gelegt, Membran dann mit den Ecken auf einen Behälter auflegen
- DNA – Proben werden in 2 µl Portionen aufgetragen
- Die Nitrozellulosemembran wird dann für 10 min. auf drei Lagen 3mm Whatman[®] Filterpapier gelegt, welche vorher mit Denaturierungslösung gewässert wurden
- Übertragen der Membran für 5 min. auf drei Lagen 3mm Whatman[®] Filterpapier, welche vorher mit Neutralisierungslösung gewässert wurden
- Membran etwas trocknen lassen, in Frischhaltefolie verpacken und für 5 min. bei 312 nm auf dem UV Transilluminator fixieren
- Hybridisierung und immunologischer Nachweis werden analog dem *Southern blot* durchgeführt

2.3.26. Transformation von Zellwand defizienten *C. r.* Zellen [nach Kindle, 1990]

Diese Kerntransformationsmethode basiert auf der mechanischen Einführung von Plasmid *Marker* – DNA in Zellwand defiziente *C. r.* Zellen durch vortexen in Gegenwart von Glaskügelchen. Die DNA wird nicht homolog in die genomische DNA eingebaut, die transformierten Zellen können über den *Marker* selektiert werden. Im folgenden Transformationsansatz wird die Argininosuccinat – Lyase [Debuchy et al., 1989] als *Marker* verwendet, die bei Stamm *CC1618* defekt ist, was sich in einer Arginin – Auxotrophie bemerkbar macht.

Vorarbeiten

- Herstellen von TAP Agarplatten, TAP und TAP_{Arg} – Medium
- Die Glaskügelchen werden erst mit HCl (37%), dann bis zum neutralen pH mit H₂O bidest. gewaschen und anschließend getrocknet
- Kleine Glasröhrchen werden mit je 0,3 g Glaskügelchen befüllt, mit Aluminiumfolie verschlossen und über Nacht bei 150 ° C im Trockenschrank [G12] sterilisiert
- Pasteurpipetten werden ebenfalls über Nacht bei 150 ° C im Trockenschrank [G12] sterilisiert
- Die Plasmide (pArg 7.8 φ 3) werden mit einem Restriktionsenzym (Bam H1) linearisiert, gefällt und mit H₂O bidest. auf c = 0,1 µg/µl eingestellt
- Zellwand defiziente *C. r.* Zellen (*CC1618*) werden in TAP_{Arg} – Medium bis zur frühen log Phase (o.D. ₇₅₀ = 0,6-0,8) angezogen, in 50 ml Portionen in sterile Corning[®] 50 ml Centrifuge Tubes abgefüllt, für 10 min. bei 4000 U/min. [G17, Rotor Ja 17] pelletiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 1,5 ml TAP_{Arg} resuspendiert

Transformationsansatz

- Die Arbeiten müssen unter sterilen Bedingungen ausgeführt werden, um Kontaminationen zu minimieren
- 300 μl der Zellsuspension werden pro Glasröhrchen abgefüllt
- Zugabe von 2 μg linearisierter Plasmid – DNA
- Vortexen [G13] für 15 sec. auf mittlerer Stufe
- Zugabe von 500 μl TAP – Medium pro Röhrchen
- Abnahme der über den Glaskugeln stehenden Suspension und Verteilung derselben auf eine TAP Agarplatte mittels eines sterilen Glasschiebers
- Inkubation der Platte für ~ 1 Std. mit halb geöffnetem Deckel, wenig Licht
- Platten verschließen und mit Parafilm versiegeln, unter selektiven Bedingungen werden die Platten upside – down inkubiert

Nach 10 – 14 Tagen Inkubation bei 23° C und 40 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ Tageslicht sollten bei diesem Ansatz Kolonien von transformierten Zellen zu erkennen sein.

2.4. Proteinbiochemische Methoden

2.4.1. Antikörperscreening einer λ gt11 – Expressionsbank

[nach Glover & Hames, 1995]

Die *Chlamydomonas reinhardtii* λ gt11 – Expressionsbank wurde von Dr. Mayfield, Department of Cell Biology, The Scripps Research Institute, La Jolla (USA) zur Verfügung gestellt.

Sie besteht aus λ gt11 – Phagen, welche die cDNAs von *C. r.* im Expressionsvektor unter der Kontrolle des *E. coli* lac Promotors enthalten. Wenn also die Phagen ihre DNA in die *E. coli* Zellen übertragen, kann die Expression der Fremdgene durch Zugabe von IPTG induziert werden [Young & Davis, 1983].

Das *Screening* mit einem Antikörper verläuft nach folgendem Prinzip:

Zunächst infizieren die Phagen der Expressionsbank *E. coli* Zellen. Diese werden auf LB Platten verteilt und bilden einen Bakterienrasen, welcher wegen der Lyse der infizierten Zellen durch Plaques unterbrochen ist. Auf diese Platten werden dann IPTG getränkte Nitrozellulosemembrane aufgelegt, welche die Expression der Fremdgene induzieren. Die Proteine werden auf die Membran übertragen und dann immunologisch analog dem *Western blot* Verfahren [s. Kap. 2.4.3.] durch einen spezifischen Antikörper detektiert. Durch dieses Verfahren kann so die cDNA erhalten werden, deren exprimiertes Protein mit einem bekannten Antikörper interagiert.

benötigte Lösungen

LB – Medium [s. Kap. 2.1.3.]

LB Agarplatten [s. Kap. 2.1.3.]

LB_{Amp} Platte [s. Kap. 2.1.3.]

LB_{Maltose} – Medium

Maltose	0,2 % (w/v)
LB – Medium	variabel

λ diluent

Tris – Cl	10 mM
MgCl ₂	10 mM
pH = 7,5	

	<u>IPTG Lösung</u>	
IPTG		10 mM
H ₂ O bidest.		variabel
	<u>LB soft Agar</u>	
Agar		0,8 % (w/v)
LB – Medium		variabel
	<u>TBS (10x)</u>	
Tris – Cl		0,5 M
NaCl		1,5 M
pH = 7,4		
	<u>TBS_{Tween}</u>	
TBS (10x)		1/10 Vol.
Tween		0,1 %
	<u>AP Puffer</u>	
Tris – Cl		6,05 g
NaCl		2,92 g
MgCl ₂ · 6 H ₂ O		5,1 g
H ₂ O bidest.		auf 500 ml
pH = 9,5		

- *E. coli* Y1090 Zellen werden als Einzelkolonie auf einer LB_{Amp} Platte ausgestrichen und bei 37° C inkubiert. Eine Kolonie wird in 5 ml LB_{Maltose} – Medium über Nacht bei 37° C angezogen
- Zugabe von MgSO₄ bis zur Konzentration von 10 mM
- Pro Platte werden 200 µl der *E. coli* Lösung mit $1 \cdot 10^4 - 3 \cdot 10^4$ p.f.u. der Expressionsbank versetzt; Inkubation für 15 min. bei 37° C ohne zu schütteln;
- Zugabe von 2,5 ml LB soft Agar; Ansatz rasch auf einer LB Platte verteilen
- Inkubation upside – down für 3-4 Std. bei 42° C, nach 15 min. kontrollieren, ob die Platten zu feucht sind und gegebenenfalls den Deckel kurz öffnen
- Wenn Plaques sichtbar sind, wird eine zuvor in der IPTG Lösung gewässerte BA 85 Nitrozellulosemembran (Ø 83 mm; Schleicher & Schüll) blasenfrei aufgelegt.
- Inkubation für 3-4 Std. bei 37° C
- Membran vorsichtig abnehmen, in eine *Blot* – Schale überführen und kurz mit TBS_{Tween} spülen; Lösung verwerfen
- Inkubation für 30 min. in TBS_{Tween} mit 3% Milchpulver (w/v); Lösung verwerfen
- Inkubation über Nacht bei 4° C in 10 ml TBS_{Tween} mit 3% Milchpulver (w/v) und Antikörperserum in entsprechender Verdünnung (z.B. TAK – Antikörper 1/3000)
- 3x 5 min. mit TBS_{Tween} waschen; Lösung verwerfen
- Zugabe von 5 ml 2. Antikörper „Anti-Rabbit IgG (whole molecule) Biotin Conjugate“ (SIGMA[®])/TBS_{Tween} = 1/1000; Inkubation bei RT unter Schütteln [G9] für 30 min.; Lösung verwerfen
- 3x 5 min. mit TBS_{Tween} waschen; Lösung verwerfen

- Zugabe von 5 ml „ExtrAvidin® Alkaline Phosphatase Conjugate“ (SIGMA®)/TBS_{Tween} = 1/2000; Inkubation für 1 Std. bei RT unter Schütteln [G9]; Lösung verwerfen
- 3x 5 min. mit TBS_{Tween} waschen; Lösung verwerfen
- 2x kurz mit AP Puffer spülen
- Zugabe von 5 ml AP Puffer, 33 µl NBT und 16,5 µl BCIP
- Entwickeln, bis die gewünschte Bande zu sehen ist, dann Lösung verwerfen und mit H₂O bidest. waschen

2.4.2. Bestimmung der C. r. Wachstumsphase

- Die Zellkonzentration wird durch Absorptionsmessung bei 750 nm [G7] bestimmt. Durch Aufstellung einer Wachstumskurve könne lag, log und stationäre Phase bestimmt werden

2.4.3. Western blot

[nach Burnette, 1981]

Das *Western blot* Verfahren beruht auf der elektrophoretischen Auftrennung eines Proteingemisches durch ein Polyacrylamid Gel [Laemmli, 1970], anschließendem *blotten* der Proteine auf eine Nitrozellulosemembran und der immunologischen Detektion des interessanten Proteins mittels einer Antikörperreaktion [Turner, 1983].

SDS Gelelektrophorese – Puffer

Tris – Cl	3,03 g
Glycine	14,42 g
SDS	1 % (w/v)
H ₂ O bidest.	auf 1 l

Transferpuffer

Tris – Cl	3,03 g
Glycine	14,42 g
Methanol	20 %
H ₂ O bidest.	auf 1 l

TEMED

N,N,N',N' -Tetramethyl-ethylendiamin	>99 %
--------------------------------------	-------

AMPS (10%)

Ammoniumperoxodisulfat frisch ansetzen	10 % (w/v)
---	------------

Tris – Cl (0,313 M)

Tris – Cl pH = 6,8	0,313 M
-----------------------	---------

Tris – Cl (3 M)

Tris – Cl 3 M
pH = 8,9

TBS (10x), TBS_{Tween}

s. Kap. 2.4.1.

DTT Stammlösung

DTT 77 mg
H₂O bidest. auf 1 ml

Probenpuffer Stammlösung

Tris – Cl 0,2 M
EDTA 5 mM
Sucrose 1 M

Probenpuffer 1:1

Probenpuffer Stammlösung 1 ml
DTT Stammlösung 60 µl
SDS (20% w/v) 200 µl
Glycerol 1 Tropfen
Bromphenol – Blau wenige Körnchen

Harnstoff – Polyacrylamid Gele

(für Mini Protean II™ Gelkammern, BIO RAD)

Gel	Trenngel 10%	Trenngel 17%	Sammelgel
Acrylamid (40%)	3,5 ml	6,75 ml	1,5 ml
Bisacrylamid	62 mg	102 mg	16 mg
Glycerol (80%)	-----	0,7 ml	-----
Harnstoff	5 g	5 g	-----
H ₂ O bidest.	3,25 ml	-----	6,5 ml
TEMED	4 µl	4 µl	7,5 µl
Tris – Cl (0,313M)	-----	-----	4 ml
Tris – Cl (3 M)	3,75 ml	3,75 ml	-----
AMPS (10% w/v)	32,5 µl	32,5 µl	125 µl

- Die Substanzen für das Trenngel werden im Becherglas gemischt, AMPS wird zum Schluß zugegeben; die Lösung wird zügig in die Mini Protean II™ Gelkammern pipettiert; Überschichten des Gels mit wenig n-Butanol (100%)
- Nach ½ bis 1 Std. bei RT wird das Butanol mit einem Filterpapier abgesaugt, das Gel wird mit H₂O bidest. überschichtet und über Nacht bei 4° C gelagert
- Das Sammelgel wird hergestellt, Zugabe von AMPS zum Schluß

- Der Wasserüberstand in der Gelkammer wird verworfen; das Sammelgel wird schnell gegossen und der Kamm für die Geltaschen wird eingeführt; Zwischen Kammenden und Trenngel sollten sich ca. 0,5 cm Sammelgel befinden
- Nach dem Aushärten des Sammelgels wird der SDS Gelelektrophorese – Puffer eingefüllt und die Kämmen werden entfernt; Transferpuffer bei 4° C kaltstellen
- Die Proben werden mit dem Probenpuffer 1:1 (im Verhältnis Probe/Puffer = 1/1) gemischt und in die Geltaschen gefüllt. Bei vergleichenden Untersuchungen sollte darauf geachtet werden, daß gleiche Proteinmengen pro Tasche eingesetzt werden, was sich bei Thylakoidproben über den Chlorophyllgehalt abschätzen läßt; Sollen die Proben nach der Elektrophorese *geblottet* werden, werden ~10 µg Chlorophyll pro Thylakoidprobe eingesetzt, soll eine Silberfärbung des Gels gemacht werden, sind ~2 µg Chlorophyll ausreichend.
- Für 1-1,5 Std. wird Spannung angelegt, die Stromstärke wird auf 30 mA eingestellt; die Elektrophorese läuft bei RT ab
- Die *Blot* – Kammer bzw. die Lösungen für die Silberfärbung werden vorbereitet

Protein *Blot* und Immunodetektion [nach Turner, 1983]

Wird angewandt, wenn spezielle Proteinbanden untersucht werden sollen.

AP Puffer

s. Kap. 2.4.1.

- Das Gel wird aus der Elektrophoresekammer entnommen und in die *Blot* – Kammer auf eine Nitrozellulosemembran überführt (in Transferpuffer arbeiten und Luftblasen vermeiden)
- Für 30 min. bei 4° C und 95V Spannung *blotten*; Membran in eine *Blot* – Schale überführen
- Unspezifische Bindungsstellen für die Antikörperreaktion auf der Membran werden durch 30 min. in TBS_{Tween} + adäquates Protein (z.B. 10% Milchpulver(w/v)) abgesättigt
- 2x kurz mit TBS_{Tween} spülen
- Zugabe von 15 ml Antikörper/TBS_{Tween} = 1/3000 (kann je nach Spezifität des Antikörpers variieren); Inkubation bei RT unter Schütteln [G9] für mind. 2 Std.; Lösung sammeln
- 6x für je 5 min. mit TBS_{Tween} Lösung waschen
- Zugabe von 15 ml 2. Antikörper „Anti-Rabbit IgG (whole molecule) Biotin Conjugate“ (SIGMA[®])/TBS_{Tween} = 1/2000; Inkubation bei RT unter Schütteln [G9] für 1 Std.; Lösung verwerfen
- 6x für je 5 min. mit TBS_{Tween} Lösung waschen
- Zugabe von 15 ml „ExtrAvidin[®] Alkaline Phosphatase Conjugate“ (SIGMA[®])/TBS_{Tween} = 1/2000; Inkubation für 1 Std. bei RT unter Schütteln [G9]; Lösung verwerfen
- 6x für je 5 min. mit TBS_{Tween} Lösung waschen; 2x kurz mit AP Puffer spülen
- Zugabe von 5 ml AP Puffer, 33 µl NBT und 16,5 µl BCIP
- Entwickeln, bis die gewünschte Bande zu sehen ist, dann Lösung verwerfen und mit H₂O bidest. waschen

Silber Färbung („silver stain“)
[nach Kruse et al., 1997]

Mit der Silberfärbung könne alle Proteine angefärbt werden.

<u>Fixierlösung</u>	
Methanol	40 %
Formaldehyd (40%)	3,5 %
dunkel lagern	
<u>Reduzierlösung</u>	
Na ₂ S ₂ O ₄	0,02 % (w/v)
<u>Färbelösung</u>	
AgNO ₃	0,1 % (w/v)
dunkel lagern	
<u>Entwicklerlösung</u>	
Na ₂ CO ₃	3 % (w/v)
Formaldehyd	0,05 %
Na ₂ S ₂ O ₄	0,0004 % (2 ml Red.Lsg/100 ml)
<u>Stopplösung</u>	
Isopropanol	25 %
Essigsäure	10 %
<u>Trockenlösung</u>	
Methanol	30 %
Glycerol	5 %

- Das Gel wird nach der Elektrophorese in eine Glasschale überführt
- Zugabe von 10 ml Fixierlösung; 10 min. schütteln lassen [G9]; Lösung verwerfen
- 2x mit H₂O bidest. waschen
- Inkubation für 1 min. in Reduzierlösung; Lösung verwerfen; 2x mit H₂O bidest. waschen
- Inkubation für 10 min. in Färbelösung; Lösung verwerfen; 2x mit H₂O bidest. waschen; kurz spülen mit etwas Entwicklerlösung; Lösung verwerfen
- In Entwicklerlösung schütteln, bis Banden zu sehen sind; Lösung verwerfen
- Zugabe der Stopplösung
- Über Nacht bei RT in Trockenlösung trocknen

2.5. Datenbankscreening zur Identifikation von möglichen Serin/Threonin – Proteinkinasen in Chloroplasten

Um aus der unter <http://www.kazusa.or.jp/en/plant/chlamy/EST/> von Asamizu et al. veröffentlichten EST – Datenbank [Asamizu et al., 1999] potentielle Serin/Threonin – Proteinkinasen zu identifizieren, wurde ein *Screening* – Verfahren entwickelt.

Dazu wurden zunächst alle 11571 EST Sequenzen, zusammen mit einem von Asamizu und Mitarbeitern durchgeführten *BLASTX 2.0.8* [Altschul et al., 1990; 1997] *Alignment* gegen die nicht redundante Proteindatenbank (nr), auf einen lokalen Rechner geladen. Diese Sequenzen tragen die Bezeichnungen AV386458 bis AV398028.

Für den ersten *Screening* – Schritt wurde das von Asamizu et al. durchgeführte *BLASTX – Alignment* genutzt, indem mittels des Textverarbeitungsprogramms Microsoft® Word97 SR-2 alle *Sequenzalignments* nach dem Begriff „Serine/T*“ durchsucht wurden, da dieser Begriff bei einem *BLASTX – Alignment* angegeben wird, sobald eine Ähnlichkeit der Sequenz mit Serin/Threonin – Proteinkinasen auftritt.

Alle EST – Sequenzen wurden in einem Ordner gespeichert und das Programm Word97 SR-2 gestartet. Über das Menü wurde „Einfügen“ und „Datei...“ ausgewählt. In die Suchmaske wurde der Ordner mit den EST – Sequenzen als Ziel der Suche angegeben, Dateityp wurde auf „alle Dateien“ eingestellt und als Suchbegriff wurde „Serine/T*“ bei „Text oder Eigenschaft“ eingegeben. Dann wurde die Suche gestartet und über Nacht betrieben.

Die resultierende Liste wurde im zweiten *Screening* – Schritt per Hand durchgesehen, um Sequenzen, die sehr hohe Homologien mit anderen Proteinen als Proteinkinasen aufwiesen und folglich eine andere Funktion besitzen dürften, auszusortieren.

Die resultierenden Sequenzen wurden im dritten *Screening* – Schritt mit dem Programm *SMART V3.1* (<http://smart.embl-heidelberg.de/>), in allen drei Leserastern analysiert.

Mit den resultierenden Sequenzen wurde ein *Alignment* mit der *Chlamydomonas reinhardtii* EST Datenbank durchgeführt, um die Sequenz maximal zu verlängern.

Mit den Serin/Threonin Kinasekandidaten wurden weitere Analysen mit verschiedenen Programme und Datenbanken durchgeführt, darunter

SignalP V1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) [Nielsen et al., 1997],

ChloroP V1.1 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/ChloroP/>) [Emanuelsson et al., 1999] und die *TAIR Arabidopsis thaliana* Datenbank (<http://www.arabidopsis.org/>).

3. Kapitel

Ergebnisse und Diskussion

3.1. Vorversuche _____	88
3.1.1. <i>Pool</i> – Versuch _____	88
3.1.2. Etablierung der 3' <i>RACE</i> – Methode _____	89
3.1.3. Wachstumskurve von <i>CCI618</i> _____	93
3.2. <i>TAK</i> – Kandidatennachweis mit <i>Western blots</i> _____	94
3.3. <i>PCR</i> – Versuche zur <i>TKN</i> – Genidentifikation _____	97
3.3.1. 3–Schritt <i>PCR</i> – Versuche _____	98
3.3.2. Inverse <i>PCR</i> – Reaktionen _____	99
3.3.3. 3' <i>RACE</i> – Reaktionen _____	100
3.4. <i>Southern blot/dot blot</i> – Versuche zur <i>TKN</i> – Genidentifikation _____	101
3.5. <i>Datenbankscreening</i> zur Identifikation von möglichen Serin/Threonin – Proteinkinasen in Chloroplasten _____	104

3. Kapitel Ergebnisse und Diskussion

3.1. Vorversuche

3.1.1. Pool – Versuch

Um zu untersuchen, ob sich ein genetischer *Marker* einer *Chlamydomonas* – Zelle unter vielen Zellen ohne diesen *Marker* mittels *PCR* nachweisen läßt, wurden *Pool* – Versuche unternommen [s. Kap. 2.3.19.].

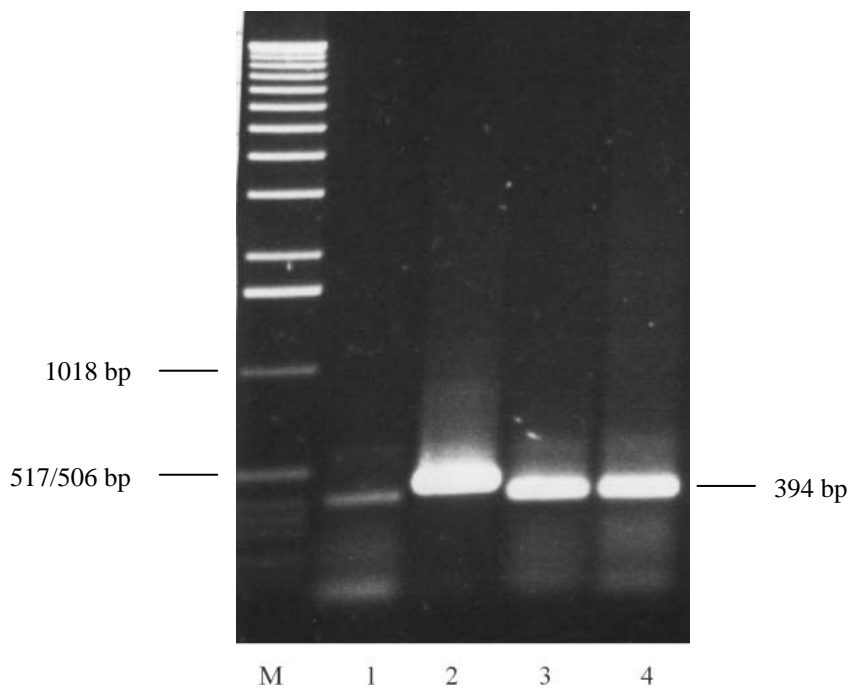


Abbildung 14: Pool – Versuch *Stm1* / *CC1618* = 1/1000

- 1 = Negativ Kontrolle (*CC1618* – DNA mit *PhiX174* Primern)
- 2 = Positiv Kontrolle (Cab Nachweis (445 bp) bei der 1/1000 *Pool* – DNA)
- 3 = Positiv Kontrolle (Nachweis des *Phi tags* (394 bp) bei *Stm1* – DNA mit *PhiX174* Primern)
- 4 = Nachweis des *Phi tags* (394 bp) bei der 1/1000 *Pool* – DNA mit *PhiX174* Primern
- M = DNA – Größenmarker X

Die Mutante *Stm1* wurde hergestellt durch Transformation des Plasmids pArg 7.8 ϕ 3 [Auchincloss, 1999] in das Kerngenom einer *CC1618* – Zelle. Im Plasmid enthalten ist DNA des Phagen *PhiX174* („Phi tag“). Ein 394 Basen langes Stück dieser DNA wird durch die *Primer PhiX174 F/R* amplifiziert und wurde hier als *Marker* benutzt.

Der *Marker* war bis zur höchsten getesteten Verdünnung von 1/1000 noch deutlich nachzuweisen (s. Abb.14).

3.1.2. Etablierung der 3' RACE – Methode

Zunächst wurde RNA vom *Chlamydomonas reinhardtii* Stamm *CC849* isoliert.

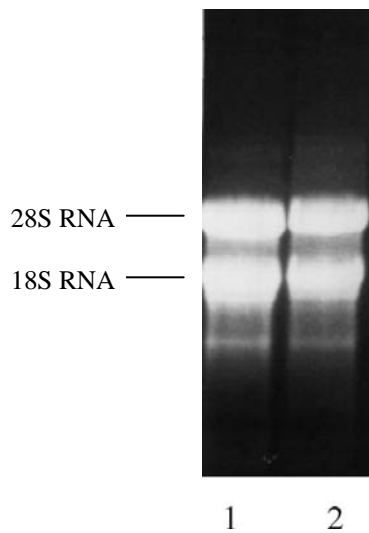


Abbildung 15: Gesamt – RNA vom Stamm *CC849*

- 1 = *CC849* Probe 1
- 2 = *CC849* Probe 2

Um kontaminierende DNA zu entfernen, die in den folgenden Versuchen zu fehlerhaften Amplifikationen führen könnte, wurde ein Teil der RNA einer DNase Behandlung unterzogen. Der Erfolg der Behandlung wurde mit einer *PCR* – Reaktion überprüft.

Als *Primer* wurden dafür die *Primer CabTeil F/R* eingesetzt, welche einen 445 bp langen Bereich des *cabII-1* – Gens von *C. reinhardtii* amplifizieren.

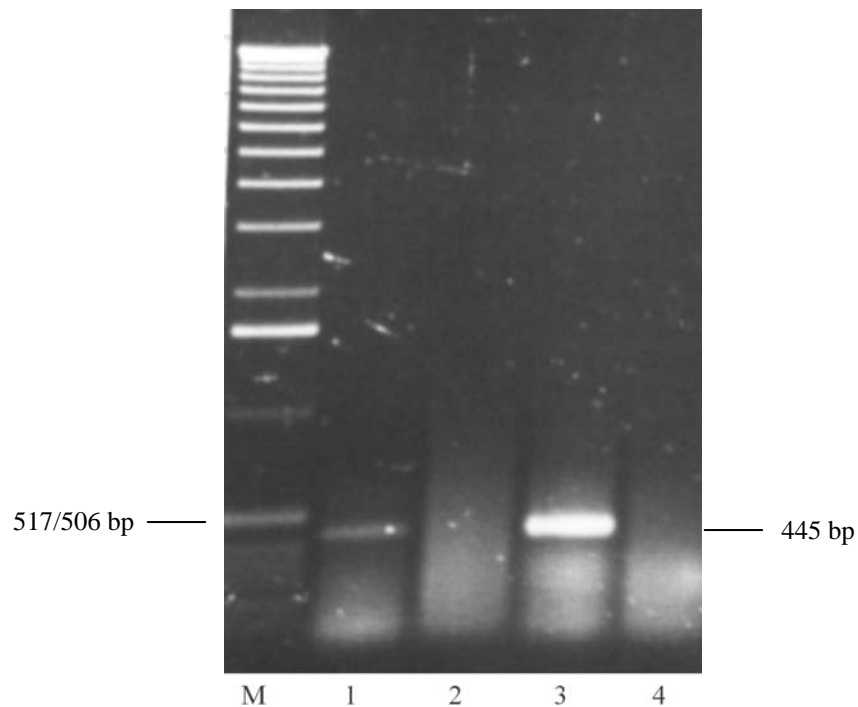


Abbildung 16: Kontroll – PCR der DNase Behandlung

- 1 = Positiv Kontrolle mit CabTeil F/R *Primern* und *CC849* DNA
- 2 = Negativ Kontrolle
- 3 = RNA – Probe vor DNase Behandlung
- 4 = RNA – Probe nach DNase Behandlung
- M = DNA – Größenmarker X

Der Vergleich der Bahnen 3 und 4 der Abbildung 16 belegt, daß die isolierte RNA vor der DNase Behandlung mit DNA kontaminiert war. Die Kontamination wurde jedoch durch die DNase Behandlung restlos beseitigt.

Die mit DNase behandelte RNA wurde mit dem Poly-(T) RE *Primer* revers transkribiert. Anschließend wurde der cDNA – *Pool* für die 3' *RACE* – Reaktion mit den *Primern* CabTeil F und Poly-(T) RE verwendet.

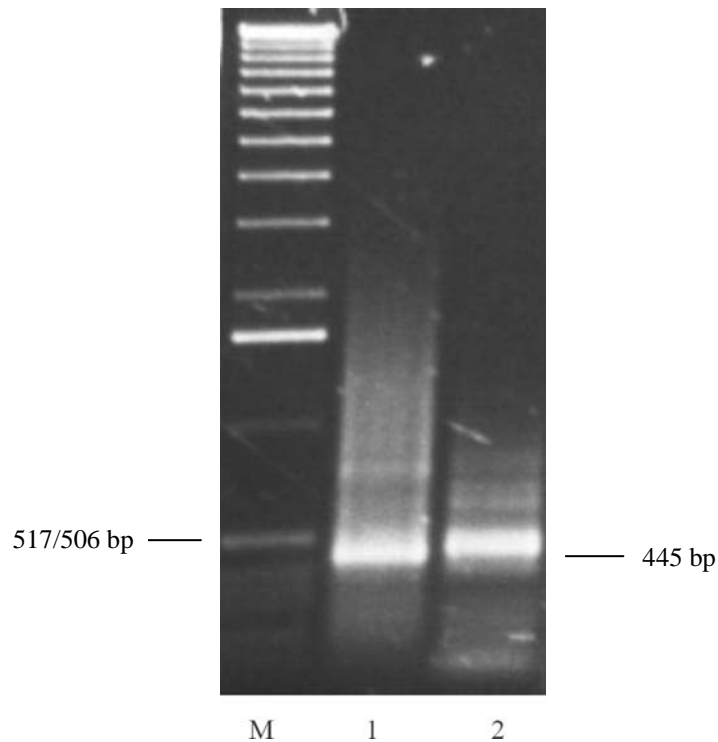


Abbildung 17: 3' RACE

1 = Positiv Kontrolle mit CabTeil F/R Primern und dem cDNA – Pool
2 = 3' RACE mit CabTeilF und Poly-(T) RE Primern und dem cDNA – Pool
M = DNA – Größenmarker X

Die DNA – Bande von Bahn 2 wurde extrahiert, die DNA – Stücke wurden durch weitere PCR – Reaktionen amplifiziert und in den Vektor pGEM – T Easy inkloniert. Dieser wurde in *E. coli* Zellen vom Stamm Jm109 vermehrt.

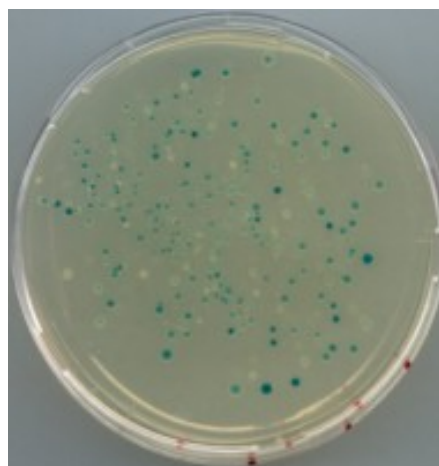


Abbildung 18: Klonierung des PCR – Produktes mit dem pGEM – T Easy Vektorsystem

blaue Kolonien = Klone ohne PCR – Insert
weiße Kolonien = Klone mit PCR – Insert

Weißer *E. coli* Kolonien wurden angezogen, die Plasmide isoliert und das Insert mit den M13 Uni/Rev *Primern* sequenziert.

Das Resultat war folgende 442 bp lange Sequenz:

```
ccgcctggcatcgttctccatggtcggcttcttcgtccaggccatcgtgaccggcaagggccccatccagaac
ctggacgaccacctggccaaccccaccgcccgtgaacgcgcttcgactacgccaccaagttcacccccctcggcct
TAAatTTTTGGCCCTCGGCAGCTGCATGTACTGGCGTGATTGAGCGGAGATGAAGAGGAGCGCGGTGTCGATAC
agtgtgagcctcttttcacaggcttaggagcgcgagggacgtgctggttaaccgaagtggcgggtgctacgtgtg
ctacggaggttcagttttgtgttcgggttttgcttgcggctcatgacgcccccttgagaagactaaaaatggc
ttgacggccactggtatggttggtttgcgatttgccttgttgTGTAAacacggcaaggattcAAAAAAAAAAAA
AAAA
```

Sequenz 1: Nucleotidsequenz des 3' Endes des identifizierten LHC II – Proteins

TAA = Stop – Codon

TGTAA = Polyadenylierungs – Signal

Durch die Sequenzierung ist bewiesen, daß die 3' RACE mit der *Chlamydomonas reinhardtii* RNA funktioniert hat.

Interessanter Weise ist die erhaltene Sequenz aber nicht wie erwartet mit dem 3' Ende der Cab – Sequenz identisch, von welcher die *Primer* CabTeil F/R abgeleitet worden waren [Gen Bank Nr. M24072]. Allerdings sind von den 148 Nucleotide am 5' Ende der Sequenz, welche den translatierten Genbereich bis zum Stop – Codon (TAA) repräsentieren, nur 8 verschieden (= 94,6 % Identität). Das folgende 3' Ende zeigt keine signifikanten Übereinstimmungen [s. Kap. 6].

Offensichtlich ist also ein anderes LHC II – Gen sequenziert worden, welches weder in den Gen Bank Sequenzen noch in der EST Datenbank von *Asamizu* et al. beschrieben ist.

Im 3' nicht translatierten Bereich dieser Gensequenz ist im Bereich von –19 bis –15 Basen upstream der Poly-(A) Sequenz die für *Chlamydomonas reinhardtii* typische Poly-(A) Signalsequenz TGTAA zu finden.

3.1.3. Wachstumskurve von CC1618

Um das Wachstumsverhalten der *Chlamydomonas reinhardtii* Zellen vom Stamm CC1618, welcher für Transformationsversuche und Nucleinsäure – Isolierungen verwendet wird, unter Anzuchtbedingungen zu ermitteln, wurde eine Wachstumskurve aufgenommen [s. Kap. 2.4.2.].

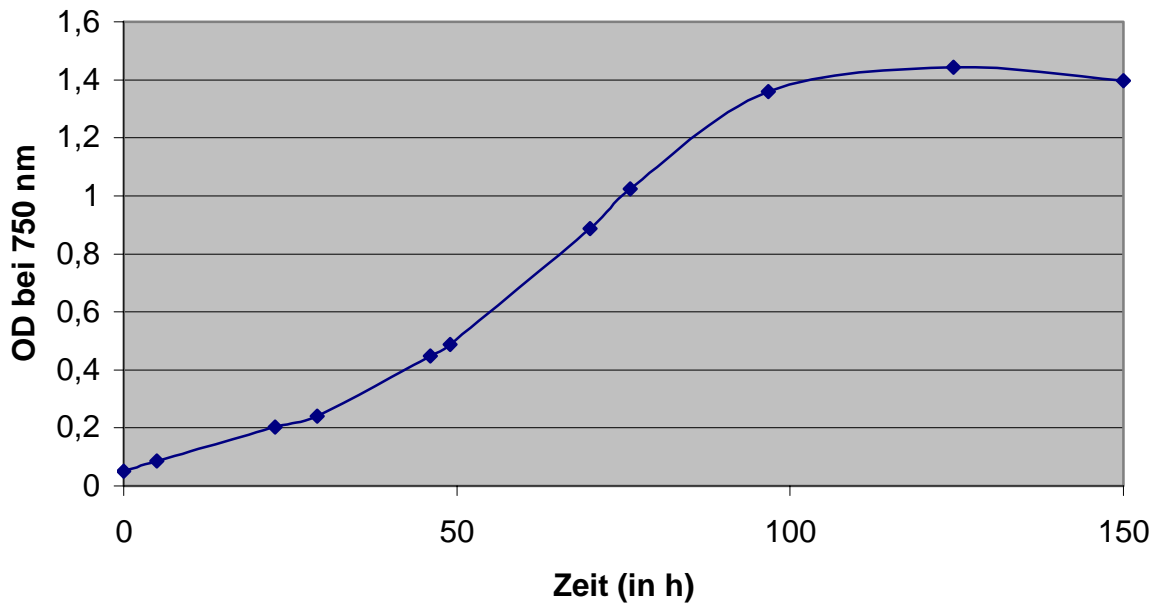


Abbildung 19: Wachstumskurve von CC1618

Wachstum von CC1618 – Zellen in TAP_{Arg} – Medium bei 23° C und 40 $\mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ Tageslicht auf einem Schüttler [G9] bei 130 rpm
lag – Phase = 0 – ~40 h
log – Phase = ~40 – ~90 h
stationäre Phase = ~90 h – 120 h
Absterbe – Phase = > ~120 h

Bei der Kurve handelt es sich um eine typische sigmoide Wachstumskurve mit der im Wachstum verlangsamten Anlauf – Phase (lag – Phase), der logarithmischen Wachstumsphase (log – Phase), der Sättigungsphase (stationäre Phase) und der Absterbe – Phase [Schlegel, 1992].

3.2. TAK – Kandidatennachweis mit Western blots

Die von *Shaun Snyders* und *Bruce Kohorn* bei *A. thaliana* beschriebenen *TAK1-3* – Proteine sind interessante Kandidaten für die Proteinkinasen, welche die LHC II – Proteine im Zuge der LHC II „state transition“ phosphorylieren. Da LHC II – Phosphorylierungen auch bei *C. reinhardtii* als Kontrollmechanismus der LHC „state transition“ beobachtet werden [s. Kap. 1.2.2.;1.3.2.], liegt die Vermutung nahe, daß das gleiche bzw. ein sehr ähnliches Protein bei *C. reinhardtii* dieselbe Aufgabe erfüllt.

Aus diesem Grund wurden zunächst *Western blot* Experimente mit dem von *Dr. Bruce Kohorn* zur Verfügung gestellten Antikörper gegen aufgereinigtes *Arabidopsis thaliana* – *TAK1* – Protein mit *C. reinhardtii* Präparaten durchgeführt.

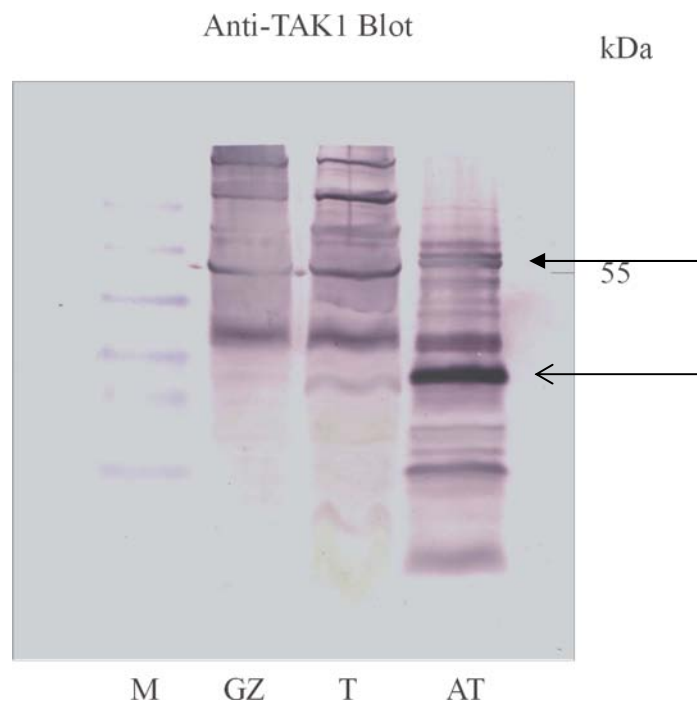


Abbildung 20: Anti – TAK1 – Western blot

AT = *Arabidopsis thaliana* Zellen; GZ = *Chlamydomonas reinhardtii* ganze Zellen; M = *Marker*; T = *Chlamydomonas reinhardtii* isolierte Thylakoide

Bei ~55-56 kDa sind bei der *A. thaliana* Probe zwei Banden zu erkennen (←) ,welche den von *Snyders* und *Kohorn* beschriebenen *TAK* – Banden entsprechen. Bei den *Chlamydomonas reinhardtii* Proben hingegen ist in diesem Bereich nur eine Bande, welche

etwas tiefer bei etwa 53 kDa liegt, zu erkennen. Diese Bande scheint bei der Thylakoidprobe etwas stärker zu sein als bei dem Präparat ganzer Zellen.

Die anderen Banden sind unspezifische Bindungen des Antikörpers, welche durch zu langes Entwickeln deutlich wurden. Insbesondere bei den Proben ganzer *A. thaliana* Zellen sind weitere Bindungen zu beobachten, von welchen eine besonders hervortritt (←).

Hier besitzt offensichtlich ein weiteres *A. thaliana* Protein Epitope, die vom Antikörper erkannt und gebunden werden.

In einem zweiten Ansatz wurde mit Hilfe des Antikörpers überprüft, ob eine der vier „state transition“ Mutanten von *Dr. Olaf Kruse* einen Unterschied zeigt im Bezug auf die Menge des von Antikörper gebundenen *TAK* – Kandidaten (*TKN*).

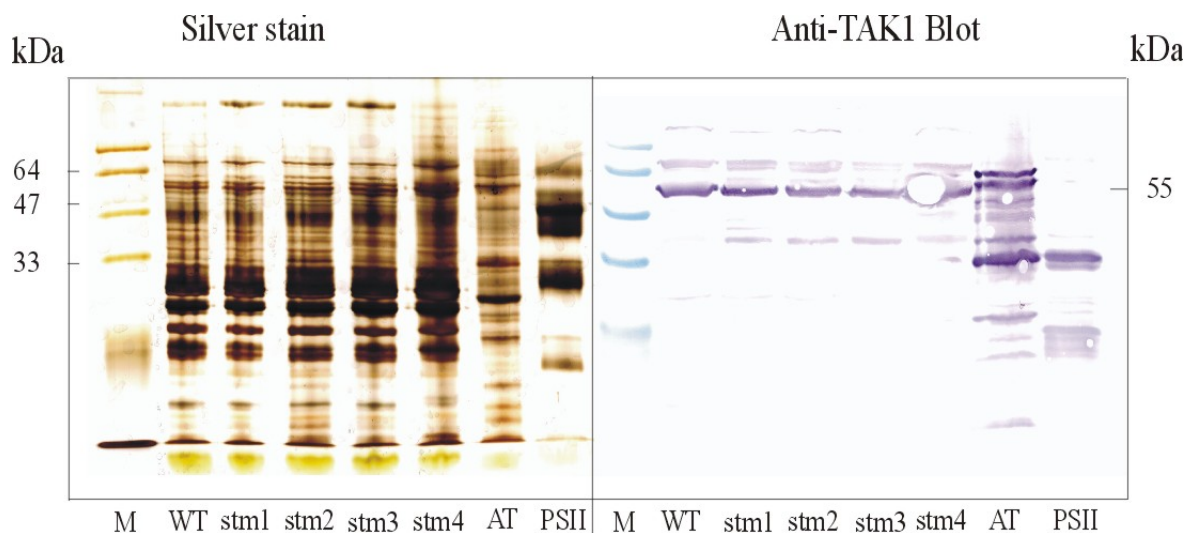


Abbildung 21: Vergleich von Silberfärbung und Anti – TAK1 – Western blot der verschiedenen *Stm* – Mutanten

AT = *Arabidopsis thaliana* Zellen; PSII = *Spinacia oleracea* Photosystem II Präparate; M = Marker; *Stm1-4* = *Chlamydomonas reinhardtii* „state transition“ Mutanten 1-4; WT = *C. r.* Wildtyp

Mit diesen *Western blots* konnten zunächst die von *Snyders* und *Kohorn* gemachten Untersuchungen bestätigt werden, da auch sie mit dem *TAK1* – Antikörper eine Proteinbande bei *Chlamydomonas* ermittelt hatten.

In Unterschied zu *Arabidopsis thaliana* ist bei *C. reinhardtii* nur eine Bande zu erkennen, die ein etwas kleineres Protein darstellt.

Diese Beobachtungen lassen sich dahingehend deuten, daß nur eine, etwas kleinere *TAK* – Isoform bei *C. reinhardtii* vorhanden ist, welche den *TAK1-3* – Isoformen aber in einem

oder mehr Epitopen so ähnlich ist, daß der polyklonale, monospezifische Antikörper binden kann [Schmid et al., 1993].

Das gebundene Protein ist in den Thylakoiden lokalisiert, da die Bande bei Untersuchungen an isolierten Thylakoiden auftritt und stärker erscheint, als bei Präparaten ganzer Zellen.

Der Grund für das Auftreten nur einer Bande könnte auch sein, daß die verschiedenen *TAK* – Isoformen bei *C. reinhardtii* sich in ihrer Größe so wenig unterscheiden, daß sie mit einem einfachen *SDS* – Gel nicht zu trennen sind und daher als eine Bande erscheinen.

Da die *Western blots* keine definitive Aussage über die Funktion des vom Antikörper gebundenen Proteins zulassen, besteht die Möglichkeit, daß das gebundene *TKN* – Protein funktionell nicht zu *TAK1* homolog ist, sondern auf Grund einer zufälligen Homologie erkannt wird und *in vivo* eine andere Aufgabe erfüllt.

Das *TKN* – Gen ist bei den *Stm* – Mutanten offensichtlich nicht mutiert worden, da sich die Proteinbanden im entsprechenden Bereich nicht wesentlich unterscheiden.

3.3. PCR – Versuche zur TKN – Genidentifikation

Um weiterführende Aussagen zu dem *TKN* – Protein machen zu können, wurde versucht, das codierende Gen zu ermitteln und im Anschluß daran über Zufallsmutagenese und reverse Genetik eine *Chlamydomonas* – *Knockout* – Mutante des Gens zu erhalten.

Zur Identifikation des *TKN* – Gens wurden verschiedene *PCR* basierte Strategien gewählt. Sequenzspezifische *Primer* wurden von der bekannten Gensequenz von *TAK1* abgeleitet und in *PCR* – Experimenten mit aus *C. reinhardtii* isolierter DNA/RNA eingesetzt.

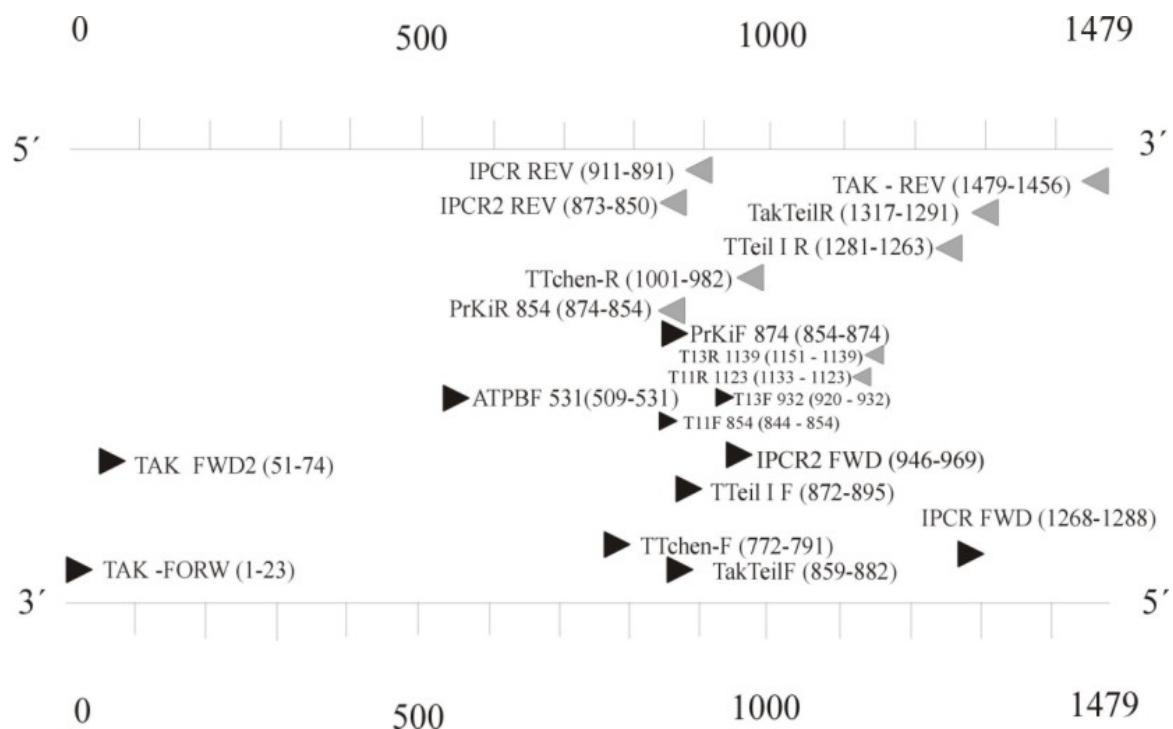


Abbildung 22: Anhand des *A. thaliana TAK1* – Gens gewählte *Primer*

Die Primersequenzen sind aufgelistet unter Kapitel 2.3.18.1.

3.3.1. 3-Schritt PCR – Versuche

In 3-Schritt *PCR* – Ansätzen wurden verschiedene Primerkombinationen mit DNA unterschiedlicher *Chlamydomonas* Stämme verwendet.

	TAK-REV	TAKTeil R	TTeilII R	T13 R 1139	T11 R 1123	TTchen R	PrKi R 874
TAK-FORW	<i>CC49</i> <i>CC1618</i> <i>CC849</i>	<i>CC849</i>	<i>CC1618</i>			<i>CC1618</i>	
TAK FWD2	<i>CC849</i>	<i>CC49</i> <i>CC1618</i> <i>CC849</i>	<i>CC1618</i>			<i>CC1618</i>	
ATPB F 531							<i>CC849</i>
TTchen F	<i>CC849</i>	<i>CC849</i>	<i>CC1618</i>			<i>CC1618</i> <i>CC849</i>	
T11 F 854				<i>CC849</i>	<i>CC849</i>		
PrKi F 874							<i>CC849</i>
TakTeil F	<i>CC49</i> <i>CC849</i>	<i>CC49</i> <i>CC1618</i> <i>CC849</i>	<i>CC1618</i> <i>CC849</i>			<i>CC1618</i>	
TTeil I F	<i>CC849</i>	<i>CC849</i>	<i>CC1618</i> <i>CC849</i>			<i>CC1618</i>	
T13 F 932				<i>CC849</i>	<i>CC849</i>		
IPCR 2 F	<i>CC849</i>	<i>CC849</i>	<i>CC1618</i>			<i>CC1618</i>	

Tabelle 10: Primerkombinationen mit DNA – Proben unterschiedlicher *C. reinhardtii* Stämme

Mit keinem der *PCR* – Ansätze konnte ein Teil des *Chlamydomonas TKN* – Gens amplifiziert werden. Jede Bande, die weiter untersucht wurde, erwies sich als Resultat fehlerhafter *Primer* – Hybridisierung.

3.3.2. Inverse PCR – Reaktionen

Alternativ zu den 3-Schritt PCR – Ansätzen wurden inverse PCR Versuche durchgeführt. Dazu wurde genomische DNA vom *Chlamydomonas* Stamm *CC1618* mit dem Restriktionsenzym *HaeII* geschnitten und in großem Volumen zyklisiert. Die inversen Primer IPCR-FWD und IPCR-REV wurden für die anschließenden PCR – Reaktionen eingesetzt [s. Kap. 2.3.13.].

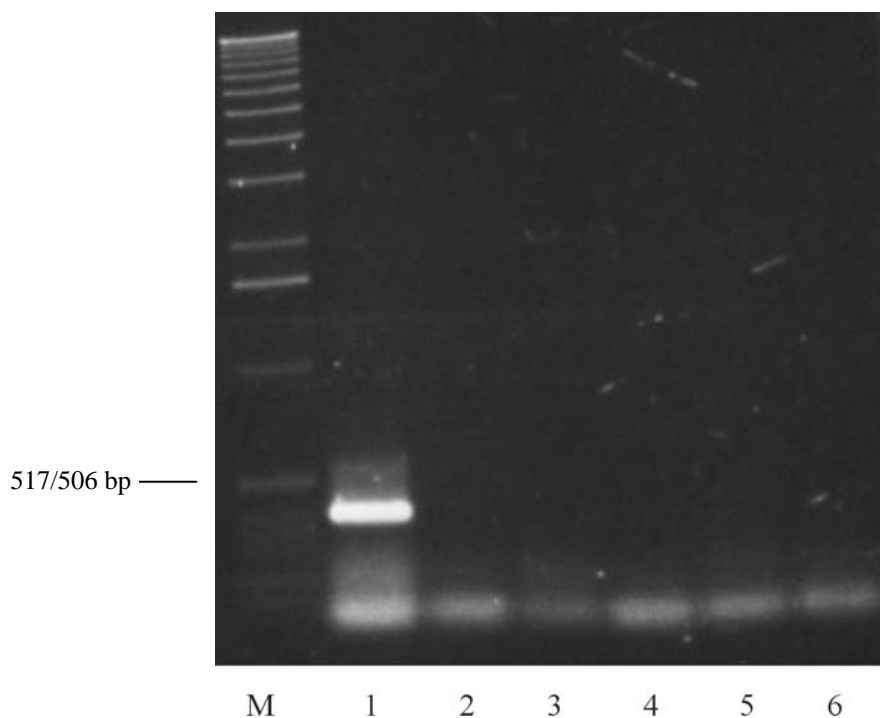


Abbildung 23: IPCR – Versuch

1 = Positiv Kontrolle mit *PhiX174* F/R Primern und *Stm1* – DNA
2-6 = IPCR – Ansätze mit IPCR FWR/REV Primern und zyklischer *CC1618* – DNA
M = DNA – Größenmarker X

Es ist keine Amplifikation des *TKN* – Gens durch die *IPCR* zu erkennen. Dies bestätigt die Ergebnisse der alternativ durchgeführten 3-Schritt PCR – Versuche [s. Kap. 3.3.1.].

3.3.3. 3' RACE – Reaktionen

Da die *PCR* – Versuche mit genomischer DNA nicht erfolgreich verliefen [s. Kap. 3.3.1; Kap. 3.3.2.], wurde versucht, das *TKN* – Gen auf mRNA bzw. cDNA Ebene nachzuweisen. Es ist bekannt, daß fast alle Gene von *C. reinhardtii* etliche Intron – Sequenzen enthalten [s. Kap. 1.4.3.1.3.]. Um auszuschließen, daß die *PCR* – Reaktionen durch lange Introns erschwert werden, wurden 3' *RACE* – Versuche angesetzt.

Hierzu wurde vom *Chlamydomonas* Stamm *CC849* die Gesamt – RNA isoliert [s. Kap. 2.3.22.] und revers transkribiert. Das Produkt wurde anschließend mit den 11 Forward – *Primern* und dem Poly-(T) *Primer* in 3-Schritt *PCR* – Reaktionen eingesetzt [s. Kap. 2.3.20.].

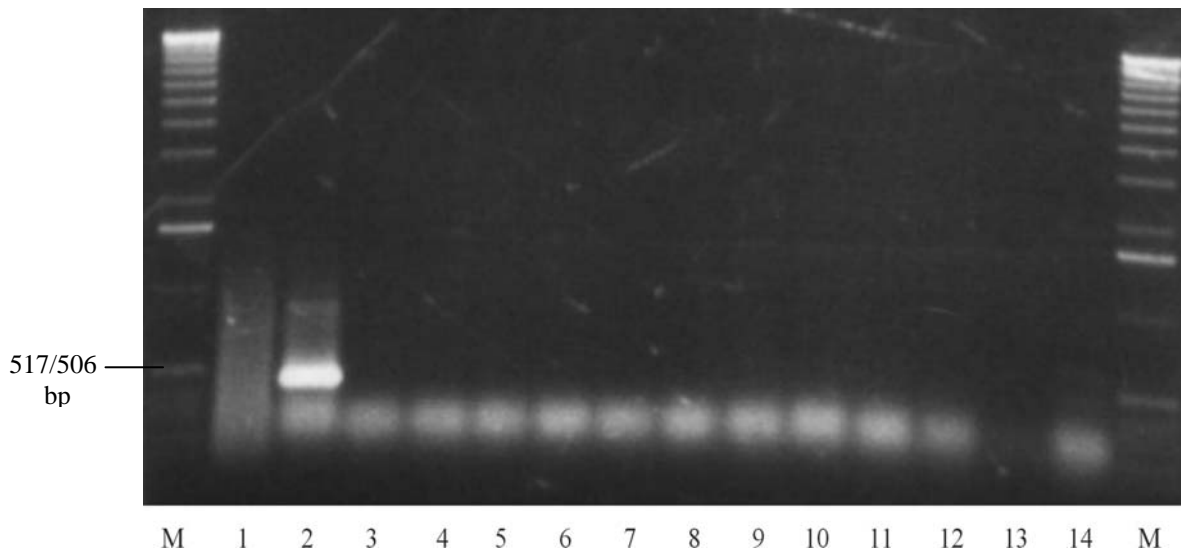


Abbildung 24: 3' RACE – Versuch

- 1, 2 = Positiv Kontrollen mit CabTeil F/R *Primern* und *C. r.* DNA
3-14 = 3' *RACE* – Versuche mit revers transkribierter *CC849* RNA, Poly-(T) *Primer* und verschiedenen Forward-*Primern*:
3 = TAK FORW; 4 = TAK FWD2; 5 = ATPBF 531; 6 = TTchenF; 7 = T11F854; 8 = PrKiF; 9 = TAKTeilF; 10 = TTeilIF; 11 = T13F932; 12 = IPCR2F; 13 = IPCR; 14 = 396717F
M = DNA – Größenmarker X

Auch die 3' *RACE* – Ansätze erbrachten keine Amplifikation des *TKN* – Gens.

Aus den Ergebnissen der unterschiedlichen *PCR* – Strategien läßt sich folgern, daß die Homologie von *TAK1* und *TKN* auf Nucleotidebene relativ gering sein dürfte. Zwar sind *PCR* – Versuche mit *Chlamydomonas* DNA auf Grund des hohen G/C – Gehalts oftmals schwierig, bei der große Anzahl der Ansätze sollten aber bei großer Homologie zumindest einige Amplifikationen zu erwarten sein, zumal auch die Positivkontrolle mit *C. r.* DNA amplifiziert wurde.

3.4. Southern blot/dot blot Versuche zur Genidentifikation

Ausgehend von *A. thaliana* DNA wurde eine DNA – Sonde von *TAK1* hergestellt. Diese wurde mit Digoxigenin markiert und in Hybridisierungsversuchen mit DNA von *C. reinhardtii* unterschiedlicher Stämme eingesetzt.

Die Sonde wurde mit den *Primern* TTchen-F und TTeilI-R und *A. thaliana* DNA mittels einer 3–Schritt *PCR* – Reaktion synthetisiert und entspricht somit dem *TAK1* – Bereich der Nucleotide 772 – 1281 (510 Basen).

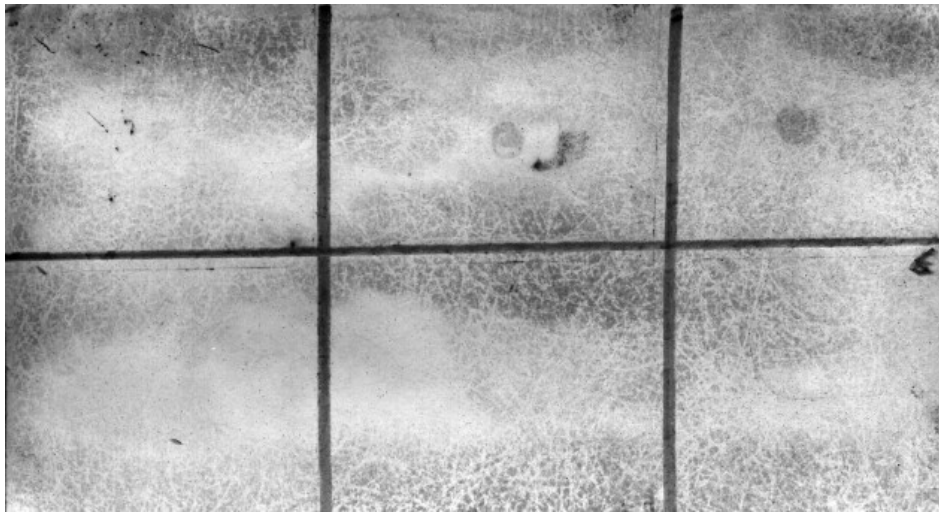


Abbildung 25: Dot blot mit *TAK1* – Sonde

obere Reihe: *Arabidopsis* DNA unterschiedlicher Konzentration
untere Reihe: *Chlamydomonas* CC849 DNA gleicher Konzentration



Abbildung 26: Dot blot mit *TAK1* – Sonde

obere Reihe: *Arabidopsis* DNA unterschiedlicher Konzentration
untere Reihe: *Chlamydomonas* DNA (*Stm1/CC1618=1/19*) gleicher Konzentration

Die *Dot blots* beweisen eine Bindung der Sondenmoleküle bei Verwendung von *Arabidopsis thaliana* DNA im Gegensatz zu den Ansätzen mit *Chlamydomonas reinhardtii* DNA.

Da also offensichtlich sowohl die Sonde intakt, als auch die Versuchsbedingungen korrekt gewählt wurden, muß dieses Ergebnis dahingehend gedeutet werden, daß kein DNA – Bereich mit großer Ähnlichkeit zum *Arabidopsis* – *TAK1* – Bereich von 772 – 1281 bp im *Chlamydomonas* Genom vorhanden ist. Folglich ist auch das *TKN* – Gen mit dem *TAK1* – Gen in diesem Bereich nicht hinreichend homolog. Zusätzlich durchgeführte *Southern blots* mit der gleichen Sonde bestätigten dieses Resultat.

Sowohl die *PCR* basierten Experimente als auch die Versuche mit DNA – Sonden beweisen, daß die Homologie der Nucleotidsequenzen von *TAK1* und *TKN* gering sein muß. Dies steht in scheinbarem Gegensatz zu den Ergebnissen der *Western blot* – Antikörper – Versuche, welche eine Ähnlichkeit der Peptide belegen.

Die divergierenden Ergebnisse lassen zwei prinzipiell verschiedene Interpretationsmöglichkeiten zu.

Die Erste ist, daß sich trotz der Antikörperbindung die Peptidsequenz von *TAK1* und *TKN* größtenteils unterscheiden. So ist es denkbar, daß sich *TAK1* und *TKN* nur in einem oder wenigen Epitopen ähnlich sind, was zwar für die Bindung des polyklonalen, monospezifischen *TAK1* – Antikörpers an *TKN* ausreichend ist, für eine erfolgreiche Identifikation auf Nucleotidebene allerdings nicht ausreicht.

Eine geringe Homologie der Peptide würde implizieren, daß sich *TAK1* und *TKN* in ihrer Funktion voneinander unterscheiden dürften [Domingues 2000].

Möglichkeit zwei ist es, daß sich *TAK1* und *TKN* in ihrer Peptidsequenz größtenteils ähnlich sind. In diesem Fall stellt sich die Frage, warum keine der *PCR*- oder DNA – Sonden – Experimente erfolgreich war.

Es ist generell nicht verwunderlich, daß die Nucleotidsequenz eines Proteins von *A. thaliana* von der Nucleotidsequenz des analogen Proteins von *C. reinhardtii* abweicht, sogar wenn die Peptidsequenzen völlig identisch sein sollten.

Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Grünalge eine ausgeprägte Codon – Präferenz für G/C reiche Codons zu eigen hat [s. Kap. 1.4.3.1.3.] und daher im Vergleich zu *A. thaliana* zum Teil andere Codons für die gleiche Aminosäure verwendet. Folglich könnten diese Codon – Unterschiede, evt. in Kombination mit einer geringfügig anderen

Aminosäuresequenz und dem generell für *PCR* – Experimente hinderlichen hohen G/C – Gehalt der DNA ausschlaggebend für die negativen Resultate der molekularbiologischen Ansätze sein.

Auf der anderen Seite müssen die Primersequenzen für eine erfolgreiche *PCR* – Amplifikation nicht in jedem Fall eine hundert prozentige Übereinstimmung mit der Zielsequenz aufweisen, lediglich die drei Nucleotide am 3' Ende der *Primers* müssen identisch sein, für die restlichen Nucleotide reicht eine relativ geringe Übereinstimmung [Sommer et al. 1989].

Auch für die Hybridisierung einer DNA – Sonde mit einer Matrize ist keine hundert prozentige Sequenzidentität erforderlich.

Daher kann aus den molekularbiologischen Ergebnissen die Mutmaßung abgeleitet werden, daß die Peptidsequenzen von *TAK1* und *TKN* wahrscheinlich keine sehr große Homologie aufweisen.

Eine große Ähnlichkeit der zwei Peptide würde auf eine analoge Funktion *in vivo* hindeuten, da dies für viele (nicht aber für alle) Proteine mit ähnlicher Peptidsequenz gilt [Domingues 2000] und ferner sowohl *TAK1* als auch *TKN* in den Chloroplasten lokalisiert sind.

Um das *TKN* – Gen zu identifizieren, wurde auch damit begonnen, eine *λgt11* – Expressionsbank von *C. reinhardtii* mit dem *TAK1* – Antikörper zu *screenen* [s. Kap. 2.4.1.].

Die *λgt11* Phagen der Expressionsbank werden dazu benutzt, die in ihnen enthaltenen cDNAs von *C. reinhardtii* in *E. coli* Zellen zu transformieren und dort zu exprimieren. Die durch die Lyse der *E. coli* Zellen entstehenden Plaques mit den Fremdproteinen können dann mit dem Antikörper untersucht werden. Bindet der *TAK1* – Antikörper, kann die im entsprechenden Phagen enthaltene cDNA von *C. reinhardtii* isoliert werden.

Da erste Experimente ohne positives Resultat blieben, läßt sich auf Grund der bisherigen Ergebnisse nicht sagen, wie groß die Homologie von *TAK1* und *TKN* letztendlich ist.

3.5. Datenbankscreening zur Identifikation von möglichen Serin/Threonin – Proteinkinasen in Chloroplasten

Parallel zu den experimentellen Arbeiten auf molekularer und biochemischer Ebene wurde versucht, die *TAK* Serin/Threonin – Proteinkinasen durch systematisches *Datenbankscreening* und Computeranalysen zu identifizieren.

Ausgehend von der von *Asamizu* et al. im Jahr 2000 veröffentlichten EST – Datenbank (<http://www.kazusa.or.jp/en/plant/chlamy/EST/>) [Asamizu et al., 1999] wurde ein *Screening* – Verfahren entwickelt [s. Kap. 2.5.], welches es ermöglichte, die 11571 EST – Sequenzen nach potentiellen Serin/Threonin – Kinasen zu filtern. Nach einem ersten, groben *Screening* – Schritt wurden die erhaltenen Sequenzen per Augenschein geprüft. Die resultierenden Sequenzen wurden dann mit dem Programm *SMART V3.1* [Schultz et al., 1998] auf Serin/Threonin – Proteinkinasmotive hin untersucht.

Sequenzen mit einem entsprechenden Motiv wurden weiteren Computeranalysen unterzogen, um evt. vorhandene Transitsequenzen in die Chloroplasten („ChloroP“ [Emanuelsson 1999]) oder Signalpeptid – Schnittstellen („SignalP“ [Nielsen 1997]) zu finden. Auch Homologievergleiche mit der *A. thaliana* – Datenbank („TAIR“) wurden durchgeführt, um zusätzliche Informationen zu den Sequenzen zu erhalten.

Die erhaltenen Sequenzen können auf molekularer Ebene weiter untersucht werden, indem sie als Vorlage für *PCR / RACE* – Versuche oder Southern – Experimente genutzt werden.

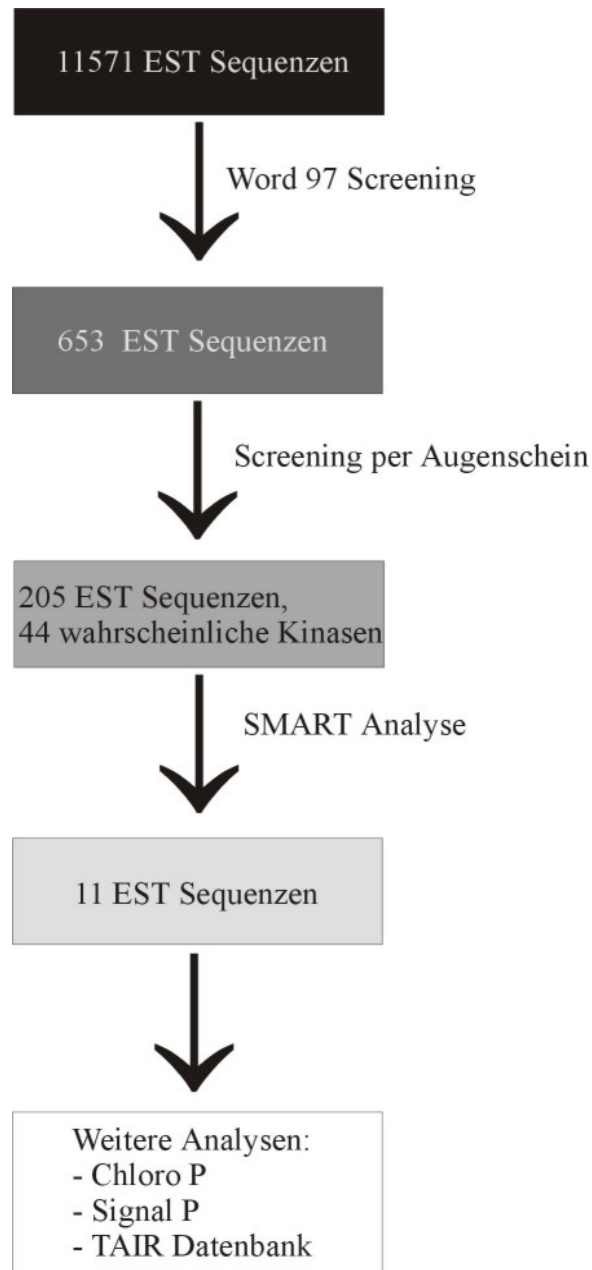


Abbildung 27: Screeningverfahren zur Identifikation von potentiellen plastidären Serin/Threoninkinasen

Word 97 = Textverarbeitungsprogramm
SMART, ChloroP, SignalP = Sequenzanalyse – Programme
TAIR = *A. thaliana* Datenbank

Die nach dem zweiten *Screening* – Schritt erhaltenen 205 interessanten ESTs sind im Anhang aufgelistet [s. Kap. 6].

Bei den nach dem dritten *Screening* – Schritt erhaltenen 11 Sequenzen handelt es sich mit relativ hoher Wahrscheinlichkeit um Genabschnitte von Serin/Threonin – Proteinkinasen.

Da die EST – Datenbank jedoch nicht das gesamte Genom von *C. reinhardtii* beinhaltet, sind die entsprechenden Gene nicht vollständig. Auch sind durch die EST – Datenbank nicht alle mRNAs repräsentiert, so daß die erhaltenen Sequenzen nur eine Auswahl möglicher Serin/Threonin – Kinasen darstellen.

AV Nummer (Fett = Teil mit Kinasedomäne)	Kinasedomäne laut SMART	Signalsequenz laut SignalP	Chloroplasten – transitsignal laut ChloroP	BLAST – Alignment mit TAIR Datenbank
AV 388963 (=AV 392622) – AV 394294	nicht klassifiziert	-	-	Kinase
AV 391836	Serin/Threonin	-	-	evt. Serin/Threonin Kinase
AV 392020 1. Leseraster 3. Leseraster	nicht klassifiziert -	+ -	- -	evt. Serin/Threonin Kinase
AV 393037	Serin/Threonin	-	-	evt. Serin/Threonin Kinase
AV 393211	Serin/Threonin	-	-	evt. Serin/Threonin Kinase
AV 394622 – AV 396486	Serin/Threonin	-	-	evt. Serin/Threonin Kinase
AV 395127	Serin/Threonin	-	-	evt. Serin/Threonin Kinase
AV 395877	nicht klassifiziert	-	-	evt. Serin/Threonin Kinase
AV 396186	Serin/Threonin	+	-	evt. Serin/Threonin Kinase
AV 396997	Serin/Threonin	-	-	evt. Serin/Threonin Kinase
AV 397741	Serin/Threonin	-	-	evt. MAP Kinase

Tabelle 11: Computeranalyse der potentiellen Serin/Threonin – Proteinkinasen

EST – Sequenzen sind im Anhang aufgeführt [s. Kap. 6]

Aussagen sowohl über die Identität und Lokalisation als auch über die Aufgabe *in vivo* lassen sich aus den Genteilen nicht mit Gewißheit ableiten. Auch die Analysen mit den Programmen *ChloroP* und *SignalP* dürfen nicht überbewertet werden, da Signalsequenzen von Peptiden häufig N – terminal liegen und daher außerhalb der Bereiche liegen können, welche durch die Kinase – ESTs repräsentiert sind.

Neben dem beschriebenen Serin/Threonin – *Kinasescreening* wurde auch ein *TBLASTN* 2.0.14 – *Alignment* [Altschul et al., 1990; 1997] mit der *TAK1* Aminosäuresequenz von *Arabidopsis* und der EST – Datenbank von *C. reinhardtii* durchgeführt, um mögliche homologe Sequenzen aufzuspüren.

AV Nummer	Score (bits)	E Value
AV 390434	64	3e-11
AV 391836	57	6e-09
AV 393211	49	1e-06
AV 395877	49	1e-06
AV 388655	46	6e-06
AV 393741	42	2e-04
AV 396486	41	2e-04
AV 393403	41	2e-04
AV 392020	39	0.001
AV 394639	39	0.001
AV 393569	35	0.016
AV 390311	34	0.028
AV 393452	32	0.18
AV 396785	31	0.42
AV 388598	30	0.71

Tabelle 12: *TBLASTN* 2.0.14 – *Alignment* von *TAK1* und der EST – Bank

fett = Est – Sequenzen, die auch durch das Ser./Thr. *Kinasescreening* gefunden wurden

Besonders interessante Kandidaten sind also den Computeranalysen folgend:

AV 391836, AV 392020, AV 393211, AV 395877 und AV 396486.

Diese Sequenzen zeigen sowohl laut den *BLASTX* – *Alignments* und *SMART* – Analysen Homologien zu Serin/Threonin – Kinasen als auch im unabhängig durchgeführten *TBLASTN* – *Alignment* signifikante Homologien in der Aminosäuresequenz zu *TAK1*.

Auch die Sequenz **AV 390434** ist in diesem Zusammenhang interessant, da sie laut *TBLASTN* 2.0.14 die größte Homologie aller katalogisierten EST – Sequenzen zu *TAK1* besitzt [s. Tab. 12; *Alignments* von AV390434 und AV 391836 mit *TAK1* im Anhang].

Laut *BLASTX* 2.0.8 – *Alignment* gegen die nicht redundante Proteindatenbank (nr) handelt es sich bei AV390434 mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine cAMP – abhängige Proteinkinase.

4. Kapitel
Zusammenfassung und Ausblick

4.1. Zusammenfassung _____	109
4.2. Ausblick _____	110

4. Kapitel Zusammenfassung und Ausblick

4.1. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war das Auffinden von Serin/Threonin – Proteinkinasen im Chloroplasten der einzelligen Grünalge *Chlamydomonas reinhardtii*, welche regulatorische Funktionen bei der LHC II „state transition“ ausüben. Anschließend sollte die Funktion *in vivo* durch Herstellung von *Knockout* – Mutanten der Kinasegene mittels reverser Genetik verifiziert werden.

Ausgangspunkt der Untersuchungen waren die von *Snyders* und *Kohorn* bei *Arabidopsis thaliana* beschriebenen *TAK1-3* – Gene [Snyders & Kohorn, 1999].

Zum Auffinden der Kinasen in *C. reinhardtii* wurden verschiedene *PCR* basierte Strategien (*3-Schritt PCR*, *IPCR*, *RACE*), DNA – Sondenexperimente (*Southern blots*), proteinbiochemische Versuche (*Western blots*) sowie Datenbankrecherchen und Computeranalysen durchgeführt.

Es war möglich, mit einem monospezifischen, polyklonalen *A. thaliana TAK1* – Antikörper in *C. reinhardtii* Thylakoiden eine Proteinbindung nachzuweisen.

Mit molekularbiologischen Methoden war es aber im Rahmen der Diplomarbeit nicht möglich, das Gen auf Nucleotidebene zu identifizieren.

Mit einem eigens entwickelten Datenbank – *Screening* wurden die 11571 Sequenzen der *Chlamydomonas reinhardtii* EST Datenbank [Asamizu 1999] nach potentiellen Serin/Threonin – Proteinkinasen durchsucht, wobei letztlich elf Kandidaten, welche mit hoher Wahrscheinlichkeit Serin/Threonin – Proteinkinasen darstellen, entdeckt werden konnten. Eine Identifizierung der kompletten Gensequenzen nebst funktioneller Charakterisierung *in vivo* steht zum jetzigen Zeitpunkt noch aus.

4.2. Ausblick

Ein erfolgversprechender Versuch zur Identifikation des *TKN* – Gens in *Chlamydomonas reinhardtii* ist das *Screening* der *λgt11* – Expressionsbank. Mit Hilfe dieser Technik, evt. unter Zuhilfenahme anderer molekularbiologischer Techniken sollte es möglich sein, das Gen zu sequenzieren, welches für das vom *TAKI* – Antikörper gebundene Protein codiert. Eine alternative Möglichkeit zur *TKN* – Identifikation ist die Isolierung des Proteins mittels eines 2D – Polyacrylamid – Gels. Nach Aufreinigung des Proteins kann eine Peptidsequenzierung durchgeführt werden. Eine bekannte Peptidsequenz ermöglicht dann die Herstellung von DNA – Sonden bzw. *PCR* – *Primern*, was ein *Screening* von cDNA – Bänken bzw. andere molekularbiologische Techniken (*PCR*, *IPCR*, *RACE*) zur Genidentifikation ermöglichen sollte.

Durch vergleichende Analysen von *TAK* und *TKN* werden dann erste Aussagen zur funktionellen Homologie der beiden Proteine möglich, die durch *Knockout* – Mutanten überprüft werden können.

Die durch die EST – Datenbanksuche identifizierten potentiellen Serin/Threonin – Proteinkinase – Sequenzen können durch 5'/3' *RACE* oder *IPCR* bzw. andere adäquate Methoden (z.B. LMS – PCR [Siebert et al., 1995]) komplettiert werden. Anschließend sollte es auch hier möglich sein, mittels reverser Genetik *Knockout* – Mutanten dieser Gene herzustellen und zu untersuchen um Aussagen zur Funktion der Genprodukte *in vivo* machen zu können.

Daneben ist auch eine Expression der Gene in *E. coli* denkbar, um die synthetisierten Proteine zur Antikörperproduktion einzusetzen. Mit den Antikörpern kann dann die kompartimentäre Lokalisation untersucht werden.

5. Kapitel Literatur

- Allen, J.F.** (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis *Biochimica et Biophysica Acta* **1098**: 275-335
- Allen, J.F., Bennett, J., Steinback, K.E. & Arntzen, C.J.** (1981) Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems *Nature* **291**: 21-25
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J.** (1990) Basic local alignment search tool *J. Mol. Biol.* **215**: 403-410
- Altschul, S.F., Madden, T.L., Schäffer, A.A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D.J.** (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs *Nucleic Acids Res.* **25**: 3389-3402
- Amundsen, G.** (1999) Web. <http://biosci.cbs.umn.edu/~amundsen/chlamy/index.html>
- Armbrust, E.V.** (1998) Uniparental inheritance of chloroplast genomes; In: *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas* (Rochaix, J.D., Goldschmidt-Clermont, M., Merchant, S. eds.); Kluwer Academic Publishers; Kap. 6: 93-113
- Asamizu, E., Nakamura, Y., Sato, S., Fukuzawa, H., Tabata, S. A.** (1999) A Large scale structural analysis of cDNAs in a unicellular green alga, *Chlamydomonas reinhardtii* I. Generation of 3433 non-redundant expressed sequence tags *DNA Research* **6**: 369-373
- Auchincloss, A.H., Loroach, A.I., Rochaix, J.D.** (1999) The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: cloning of the cDNA and its characterization as a selectable shuttle marker *Mol. Gen. Genet.* **261**: 21-30
- Barbato, R., Friso, G., Rigoni, F., Dalla Vecchia, F., Giacometti, G.M.** (1992) Structural changes and lateral redistribution of photosystem II during donor side photoinhibition of thylakoids *The Journal of Cell Biology* **119** (2): 325-335
- Barber, J., Kühlbrandt, W.** (1999) Photosystem II *Current opinion in structural biology* **9**: 469-475
- Bassi, R., Sandonà, D., Croce, R.** (1997) Novel aspects of chlorophyll *a/b*-binding proteins *Physiol. Plant.* **100**: 769-779

- Bennett, J.** (1991) Protein phosphorylation in green plant chloroplasts. *Annu. Rev. Plant Mol. Biol.* **42**: 281-311
- Birnboim, H.C., Doly, J.** (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA *Nucleic Acid Research* **7 (6)**: 1513-1523
- Blumberg, D.D.** (1987) Creating a ribonuclease-free environment *Methods in Enzymology* **152**: 20-4
- Bonaventura, C., Myers, J.** (1969) Fluorescence and oxygen evolution from *Chlorella pyrenoidosa* *Biochimica et Biophysica Acta* **189**: 366-383
- Burnette, W.N.** (1981) „Western Blotting“: Electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels to unmodified nitocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A *Analytical Biochemistry* **112**: 195-203
- Callahan, F.E., Ghirardi, M.L., Sopory, S.K., Mehta, A.M., Edelman, M., Mattoo, A.K.** (1990) A novel metabolic form of the 32 kDa-D1 Protein in the grana-localized reaction center of photosystem II *J. Biol. Chem.* **265**: 15357-15360
- De Las Rivas, J., Klein, J., Barber, J.** (1995) pH sensitivity of the redox state of cytochrome b₅₅₉ may regulate its function as a protectant against donor and acceptor site photoinhibition *Photosynth. Res.* **46**: 193-202
- Debuchy, R., Purton, S., Rochaix, J.D.** (1989) The argininosuccinate lyase gene of *Chlamydomonas reinhardtii*: an important tool for nuclear transformation and for correlating the genetic and molecular maps of the ARG7 locus *The EMBO Journal* vol.8 **10**: 2803–2809
- Domingues, F.S., Koppensteiner, W.A., Sippl, M.** (2000) The role of protein structure in genomics *FEBS Letters* **476**: 98-102
- Emanuelsson, O., Nielsen, H., von Heijne, G.** (1999) ChloroP, a neural network-based method for predicting chloroplast transit peptides and their cleavage sites *Protein Science* **8**: 978-984
- Falkowski, P.G., Fujita, Y., Ley, A. & Mauzerall, D.** (1986) Evidence for cyclic electron flow around PS II in *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Physiol.* **81**: 310-312
- Fork, D.C., Urbach, W.** (1965) Evidence for the localization of plastocyanin in the electron-transport chain of photosynthesis *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **53**: 1307-1315

- Frohman**, M.A., Dush, M.K., Martin, G.R. (1988) Rapid production of full - length cDNAs from rare transcripts: amplification using a single gene - specific oligonucleotide primer *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8998-9002
- Gal**, A., Zer, H., Ohad, I. (1997) Redox-controlled thylakoid protein phosphorylation. News and views *Physiol. Plant.* **100**: 869-885
- Georgakopoulos**, J.H., Argyroudi-Akoyunoglou, J.H., (1994) On the question of lateral migration of LHC II upon thylakoid protein phosphorylation in isolated pea chloroplasts: the stroma lamellar fraction separated from phosphorylated chloroplasts is not homogeneous *Biochimica et Biophysica Acta* **1188**: 380-390
- Ghirardi**, M.L., Mahajan, S., Sopory, S.K, Edelman, M., Mattoo, A.K. (1992) Photosystem II reaction center particle from *Spirodela* stroma lamellae *J. Biol. Chem.* **268**: 5357-5360
- Glover**, D.M., Hames, B.D. (1995) DNA Cloning II: Expression systems; a practical approach; In: Practical Approach Series on CD-ROM (Hames, B.D., Rickwood, D. eds.); Oxford University Press; Chapter CH
- Gorman**, D.S., Levine, R.P. (1965) Cytochrome f and plastocyanin: Their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **54(6)**: 1665-1669
- Groth**, G., Strotmann, H., (1999) New results about structure, function and regulation of the chloroplast ATP synthase (CF₀CF₁) *Physiol. Plant.* **106**: 142-148
- Gruber**, H., Kirzinger, S.H., Schmitt, R. (1996) Expression of the *Volvox* gene encoding nitrate reductase: Mutation-dependent activation of cryptic splice and intron-enhanced gene expression from a cDNA *Plant Mol. Biol.* **31**: 1-12
- Gumpel**, N.J., Rochaix, J.-D., Purton, S. (1994) Studies on homologous recombination in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr. Genet.* **26**: 438 – 442
- Hamel**, P., Olive, O., Pierre, Y., Wollman, F.A., Vitry, C. (2000) A new subunit of cytochrome b₆f complex undergoes reversible phosphorylation upon state transition *J. Biol. Chem.* **275**: 17072 – 17079
- Hanahan**, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580
- Hankamer**, B., Nield, J., Zheleva, D., Boekema, E.J., Barber, J. (1997) Isolation and biochemical characterisation of monomeric and dimeric PS II complexes from spinach and their relevance to the organisation of photosystem II *in vivo* *Eur. J. Biochem.* **243**: 422-429

- Haumann, M., Junge, W.,** (1999) Photosynthetic water oxidation: a simplex-scheme of its partial reactions *Biochimica et Biophysica Acta* **1411**: 86-91
- Hardie, D.G.** (1999) Plant protein serine/threonine kinases *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **50**: 97-131
- Harris, E.H.** (1989) An overview of the genus; In: Chlamydomonas The Chlamydomonas sourcebook Kap. 1: 1-24
- Harris, E.H.** (1998) Introduction to Chlamydomonas; In: The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas (Rochaix, J.D., Goldschmidt-Clermont, M., Merchant, S. eds.); Kluwer Academic Publishers; Kap. 1: 1-11
- Hill, R., Bendall, F.** (1960) Function of the two cytochrome components in chloroplasts: A working hypothesis *Nature* **186**: 136-137
- Hippler, M., Redding, K., Rochaix, J.-D.** (1998) *Chlamydomonas* genetics, a tool for the study of bioenergetic pathways. *Biochimica et Biophysica Acta* **1367**: 1 – 62
- Hooper, J.K., Eggink, L.L.** (1999) Assembly of light harvesting complex II and biogenesis of thylakoid membranes in chloroplasts *Photosynthesis report* **61**: 197-215
- Jansson, S.** (1999) A guide to the *lhc* genes and their relatives in *Arabidopsis* *Trends in plant science* **Vol. 4 (6)**: 236-240
- Keren, N., Ohad, I.** (1998) State Transition and Photoinhibition; In: The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas (Rochaix, J.D., Goldschmidt-Clermont, M., Merchant, S. eds.); Kluwer Academic Publishers; Kap. 30: 569-596
- Kindle, K.L.** (1990) High-frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 1228-1232
- Knippers, R.** (1997a) Transkription, Translation und der genetische Code; In: Molekulare Genetik; Kap. 3: 65-69
- Knippers, R.** (1997b) DNA im Zellkern: Chromatin und Chromosomen; In: Molekulare Genetik; Kap. 5: 139-159
- Knippers, R.** (1997c) Struktur eukaryotischer Gene: Exons und Introns; In: Molekulare Genetik; Kap. 10: 283-299
- Kruse, O., Zheleva, D., Barber, J.** (1997) Stabilization of photosystem two dimers by phosphorylation: Implication for the regulation of the turnover of D1 protein *FEBS Letters* **408**: 276-280

- Kruse, O., Zheleva, D., Hankamer, B., Barber, J.** (1995) Investigating the protective role of phosphorylation for PSII complexes *Photosynthesis: from Light to Biosphere / P.Mathis (ed.)* **Vol. III:** 401-404
- Kruse, O., Nixon, P.J., Schmid, G.H., Mullineaux, C.W.** (1999) Isolation of state transition mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* by fluorescence video imaging *Photosynthesis Research* **61:** 43-51
- Krysan, P.J., Young, J.C., Sussman, M.R.** (1999) T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis* *The Plant Cell* **11:** 2283- 2290
- Krysan, P.J., Young, J.C., Tax, F., Sussman, M.R.** (1996) Identification of transferred DNA insertions within *Arabidopsis* genes involved in signal transduction and ion transport *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93:** 8145- 8150
- Kühlbrandt, W.** (2000) Bacteriorhodopsin – the movie *Nature* **406:** 569-570
- Kühlbrandt, W., Wang, D.N., Fujiyoshi, Y** (1994) Atomic model of plant light-harvesting complex *Nature* **350:** 614-621
- Laemmli, U.K.** (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 *Nature* **227:** 680-685
- Lawton, M.A., Yamamoto, R.T., Hanks, S.K., Lamb, C.J.** (1989) Molecular cloning of plant transcripts encoding protein kinase homologs *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86:** 3140-3144
- Li, Q., Hunt, A.G.** (1997) The polyadenylation of RNA in plants *Plant Physiol.* **115:** 321-325
- Menke, W.** (1961) Über die Chloroplasten von *Anthoceros punctatus* *Zeitschrift für Naturforschung* **16 (b):** 334-336
- Murata, N.** (1969) Control of excitation transfer in photosynthesis *Biochimica et Biophysica Acta* **172:** 242-251
- Nedelcu, A.M., Lee, R.W.** (1998) Modes and tempos of mitochondrial and chloroplast genome evolution in *Chlamydomonas*: A comparative analysis; In: *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas* (Rochaix, J.D., Goldschmidt-Clermont, M., Merchant, S. eds.); Kluwer Academic Publishers; Kap. 5: 63-91
- Nielsen, H., Engelbrecht, J., Brunak, S., von Heijne, G.** (1997) Identification of prokaryotic and eukaryotic signal peptides and prediction of their cleavage sites *Protein Engineering* **10:** 1-6

- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., Kinosita Jr., K.,** (1997) Direct observation of the rotation of F₁-ATPase *Nature* **386**: 299-302
- Ochman, H., Gerber, A.S., Hartl, D.L.** (1988) Genetic applications of an inverse polymerase chain reaction. *Genetics Society of America* **120**: 621-623
- Olive, j., Wollman, F.A.** (1998) Supramolecular organization of the chloroplast and of the thylakoid membranes; In: *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas* (Rochaix, J.D., Goldschmidt-Clermont, M., Merchant, S. eds.); Kluwer Academic Publishers; Kap. 14: 233-254
- Remacle, C., Matagne, R.F.** (1998) Mitochondrial genetics; In: *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas* (Rochaix, J.D., Goldschmidt-Clermont, M., Merchant, S. eds.); Kluwer Academic Publishers; Kap. 34: 661-674
- Rhee, K.H., Morris, E.P., Barber, J., Kühlbrandt, W.** (1998) Three-dimensional structure of the plant photosystem II reaction centre at 8 Å resolution *Nature* **396**: 283-286
- Richter, G.** (1998a) Einleitung; In: *Stoffwechselfysiologie der Pflanzen*; Georg Thieme Verlag; S. 1-2
- Richter, G.** (1998b) In: *Stoffwechselfysiologie der Pflanzen*; Georg Thieme Verlag; S. 412 f, 332, 305ff, 226 ff
- Rintamäki, E., Kettunen, R., Aro, E.M.** (1996) Differential D1 dephosphorylation in functional and photodamaged photosystem II centers *J. Biol. Chem.* **271**: 14870 – 14875
- Rochaix, J.-D.** (1995) *Chlamydomonas reinhardtii* as the photosynthetic yeast. *Annu. Rev. Genet.* **29**: 209-230
- Rögner, M., Boekema, E.J., Barber, J.** (1996) How does photosystem 2 split water? The structural basis of efficient energy conversion *Trends in Biochemical Sciences* **21 (2)**: 44-49
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A., Arnheim, N.** (1985) Enzymatic amplification on β-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia *Science* **230**: 1350-1354
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T.** (1989) In: *Molecular cloning* (Ford, N., Nolan, C., Ferguson, M. eds.); Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition
- Schlegel, H.G.** (1992) Bakterienwachstum in statischer Kultur; In: *Allgemeine Mikrobiologie*; Georg Thieme Verlag; Kap. 6.5.3: 211-214

- Schmid**, G.H., Radunz, A., Gröschel-Stewart, U. (1993) Wie muß ein Antigen beschaffen sein? In: Immunologie und ihre Anwendung in der Biologie, Georg Thieme Verlag, Kap.1.9: 43-46
- Schnell**, D.J., Blobel, G. (1993) Identification of intermediates in the pathway of protein import into chloroplasts and their localization to envelope contact sites *The Journal of Cell Biology* **120**: 103-115
- Schultz**, J., Milpetz, F., Bork, P., Ponting, C.P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: Identification of signaling domains *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 5857-5864
- Siebert**, P.D., Chenchik, A.C., Kellogg, D.E., Lukyanov, K.A., Lukyanov, S.A. (1995) An improved PCR method for walking in uncloned genomic DNA *Nucleic Acids Research* **23(6)**: 1087-1088
- Silflow**, C.D. (1998) Organization of the nuclear genome; In: The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas (Rochaix, J.D., Goldschmidt-Clermont, M., Merchant, S. eds.); Kluwer Academic Publishers; Kap. 3: 25-40
- Silverstein**, T., Cheng, L., Allen, J.F. (1993) Chloroplast thylakoid protein phosphatase reactions are redox-independent and kinetically heterogeneous *FEBS Letters* **334**: 101-105
- Smith**, T.A., Kohorn, B.D. (1991) Direct selection for sequences encoding proteases of known specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**: 5159 – 5162
- Snyders**, S., Kohorn, B.D. (1999) TAKs, Thylakoid membrane protein kinases associated with energy transduction *J. Biol. Chem.* **274**: 9137 – 9140
- Sommer**, R., Tautz, D. (1989) Minimal homology requirements for PCR primers *Nucleic Acid Research* **17 (16)**: 6749
- Southern**, E.M. (1975) Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis *J. Mol. Biol.* **98**: 503-517
- Spalding** M.H. (1998) CO₂ acquisition. Acclimation to changing carbon availability; In: The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas (Rochaix, J.D., Goldschmidt-Clermont, M., Merchant, S. eds.); Kluwer Academic Publishers; Kap. 28: 529-547
- Stryer**, L. (1994) Die Photosynthese; In: Biochemie; Spektrum Akademischer Verlag; Kap. 22: 541-572
- Sueoka**, N. (1960) Mitotic replication of deoxyribonucleic acid in *Chlamydomonas reinhardtii* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **46**: 83-91

- Takahashi, Y.** (1998) Chloroplast - encoded small subunits of the three multiprotein complexes in photosynthetic electron transport *J. Plant Res.* **111**: 101-111
- Tian, F., MA, Y., Kouranov, A., LaSala, S.E., Schnell, D.J.** (1995) Molecular dissection of the mechanism of protein import into chloroplasts *Cold spring harbor symposia on quantitative biology* **Vol. LX**
- Togasaki, R.K., Surzycki, S.J.** (1998) Perspectives on early research on photosynthesis in *Chlamydomonas*; In: *The Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas* (Rochaix, J.D., Goldschmidt-Clermont, M., Merchant, S. eds.); Kluwer Academic Publishers; Kap. 2: 13-23
- Turner, B.M.** (1983) The use of alkaline-phosphate-conjugated second antibody for the visualization of electrophoretically separated proteins recognized by monoclonal antibodies *Journal of immunological methods* **63**: 1-6
- Ude, J., Koch, M.** (1994) Chloroplast aus einer Blattzelle; In: *Die Zelle*; Gustav Fischer Verlag Jena; Kap. 5.2: 100-101
- Ullrich, A., Schlessinger, J.** (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity *Cell* **61**: 203-212
- Vener, A.V., van Kan, P.J.M., Gal, A., Andersson, B., Ohad, I.** (1995) Activation / deactivation cycle of redox - controlled thylakoid protein phosphorylation *J. Biol. Chem.* **270**: 25225 – 25232
- Vener, A.V., van Kan, P.J.M., Rich, P.R., Ohad, I., Andersson, B.** (1997) Plastochinol at the quinol oxidation site of reduced cytochrome b_f mediates signal transduction between light and protein phosphorylation: thylakoid protein kinase deactivation by a single-turnover flash *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 1585 – 1590
- von Sengbusch, P., Bergmann, R., Stader, L., Eickmeier, B.** (1996) Algen; In: *elektronisches Lehrbuch Botanik*; Kap. 44: S.15ff
- Wilkerson, C.G., King, S.M., Witman, G.B.** (1994) Molecular analysis of the γ heavy chain of *Chlamydomonas* flagellar outerarm dynein *Journal of Cell Science* **107**: 497-506
- Winkler, R.G., Frank, M.R., Galbraith, D.W., Feyereisen, R., Feldmann, K.A.** (1998) Systematic reverse genetics of transfer-DNA-tagged lines of *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **118**: 743-750
- Wollmann, F.A., Minai, L., Nechustai, R.** (1999) The biogenesis and assembly of photosynthetic proteins in thylakoid membranes *Biochimica et Biophysica Acta* **1411**: 21-85

Young, R.A., Davis, R.W. (1983) Yeast RNA polymerase II genes: Isolation with antibody probes *Science* **222**: 778-782

6. Kapitel
Anhang

```

*      20      *      40      *      60      *      80
cDNA   : CCGCCTGGCATCGTTCTCCATGTTCCGGCTTCTTCGTCACAGGCCATCGTGACCGGCAAGGGCCCCATCCAGAACCTGGACGACCA : 84
cabII-1 : CCGCCTGGCATCGTTCTCCATGTTCCGGCTTCTTCGTCACAGGCCATCGTGACCGGCAAGGGCCCCATCCAGAACCTGGACGACCA : 84
CCGCCTGGCATCGTTCTCCATGTTCCGGCTTCTTCGTCACAGGCCATCGTGACCGGCAAGGGCCCC

*      100     *      120     *      140     *      160
cDNA   : CCTGCCAACCCACCCGCGTGAAGCGCTTCCACTACGCCACCAAGTTCACCCCTCGGCCTAAATTTTG-----GCC : 158
cabII-1 : CCTGCCAACCCACCCGCTCAACAAGCGCTTCCGCTTCGCCACCAAGTTCACCCCTCGGCCTAAATTTGATCAGCGTATAAGCT : 168
CCTGCCAACCCACCCG C AACGC TTCG CT CGCCACCAAGTTCACCCCTCGGCCTAA TT T TG GC

*      180     *      200     *      220     *      240     *
cDNA   : CTGGCAGCTGCATCTACTGGCG---TGAT-TGA---GCGGAGAT---GAAGAGGAGCGCGGTCTCG-----A : 216
cabII-1 : CTGGCAGCTGCATCTACTGGCGCTTATATGGCACTTTGATCTGCACGCCCTAGATCCGTGCAAAGGATGCCCTTGTAGTCACATCACACTCGCA : 252
CT C GCAGC GC T TA TGGC TGAT TG GCG AGAT G A AGGA C TGT G A

*      260     *      280     *      300     *      320     *
cDNA   : TACAGTG---TGA---GCCTCTTT---TCACAG---GCTTAGGA---GCGGAGGGACGTCGGCT---TAACCGAAGTGG : 278
cabII-1 : TACAGTGAGTGCCATGGCTGCCTTTTGGTGTATAGATATGGTGGTGGTAATGCGCAGGGCCATCCGATGTCTGTGGTTAG : 336
TAC AGTG TG GC T TTT T A AG GCT A GCGC GGG C T CG T T C G T G

*      340     *      360     *      380     *      400     *      420
cDNA   : CGGTGC---ACGTGTGCTACGGAGCTTCACT---TTTCTGTTGGGTTT---TGCT-TGCGGCTCA-TCACGC---CCCTGAG : 350
cabII-1 : TGGTGCACAGCTTAGGCGGC---GGACCCACTAGGGAAAGCCCAATCCAAAGTCTTCCGCTGGGTGGAAAGGGCACCTCCAG : 420
GGTG T ACGTG CG G CA T TTT TGTT GG TT TGC T CGG T TG CG C C CT GA

*      440     *      460     *      480     *      500
cDNA   : A---AGACTAAAAATGGCTTCAAGGCCACT---GGTATGTTGGTTTGGCA---TTTGCCTTTGTTGTGTAACACGGCAAG---GATT : 425
cabII-1 : ACTCCAGACTTAGGCGGC---GGACCCACTAGGGAAAGCCCAATCCAAAGTCTTCCGCTGGGTGGAAAGGGCACCTCCAG : 502
A AGACT A GGC G C CCACT GG A G T C A T T CC TG GTG AA A GGCA G G

*      520     *      540     *      560     *      580
cDNA   : C----- : 426
cabII-1 : CCACACGAGACGTTTTGAGCCACCTCCGGGCTGCGACTCCACCTGTAACACACTGGATTAATGATCAACCTTCGCGGCTGCT : 586
C

*      600
cDNA   : ----- : -
cabII-1 : GGGAGAAGGGGTTTGGGTAGGCCATCGAT : 616

```

Alignment der Nucleotidsequenzen

Alignment der 3' RACE Sequenz und CabII-1

```

cDNA      RLASFSMFGFFVQAIVTGKGP IQNDDHLANPTAVNAFDYATKFTPSA
cabII-1   RLASFSMFGFFVQAIVTGKGP VQNDDHLANPTVNNAFATKFTPSA

```

Alignment der Proteinsequenzen

EST Screening II

Serin/Threonin Kinasen fett = laut SMART Analyse eine Kinase ==> max. verlängert mit anderen ESTs	andere Kinasen	Phosphatasen	evt. Kinasen/ interessante ESTs
AV388053 im 2. Leseraster eine Signalpeptid und 3 Transmembranbereiche;keine Kinasedomäne AV388963(identisch mit AV392622)-394294 im 3.Leseraster eine KINASE und 1 Transmembranbereich	AV391835/Tyr AV390434/cAMP AV393403/Tyr AV393452/Shaggy AV393569/MAP AV393741/MAP AV394285/MAP	AV386961 AV387544 AV387891 AV389296 AV390042 AV390526 AV390534	AV386669 AV386711 AV386763 AV386806 AV386820 AV386930 AV386990
AV389926 im 2.Leseraster Transmembranbereich	AV394294/Shaggy	AV390554	AV387072
AV390311 im 3.Leseraster Transmembranbereich	AV394364/Ca AV395340/Ca	AV390770 AV391199	AV387133 AV387161
AV391454 im 1.Leseraster keine; im 3.Transmembranbereiche	AV395802/Ca AV396186/cAMP	AV391448 AV392026	AV387213 AV387240
AV391824 im 1.Leseraster Transmembranbereich	AV397205/Ca AV397345/Ca	AV393271 AV394879 AV395458 AV397511	AV387249 AV387272 AV387274 AV387323
AV391836 im 2.Leseraster KINASE und Transmembranbereich			AV387349
AV392020 im 1.Leseraster KINASE und Transmembranbereich			AV387383
im 3.Leseraster mehrere Transmembranbereiche			AV387393
AV393037 im 2.Leseraster KINASE und Transmembranbereich			AV387395
AV393211 im 3.Leseraster KINASE			AV387403
AV393418 im 1.Leseraster keine			AV387453
AV393810			AV387553
im 1.Leseraster Transmembranbereiche			AV387557
AV394185			AV387565
im 2.Leseraster Transmembranbereich			AV387611
AV394547			AV387686
im 1.Leseraster Signalsequenz und Transmembranbereich			AV387726
AV394622- AV396486			AV387751
im 1.Leseraster Ser/Thr KINASE			AV387801
AV394630			AV387867
im 3.Leseraster Transmembranbereiche			AV387950
AV394639/Rez.			AV388272
im 1.Leseraster Transmembranbereiche			AV388418
AV394752			AV388420
im 1. Leseraster nix;im 2.Leseraster nix			AV388574
AV394862			AV388575
im 2.Leseraster Transmembranbereiche			AV388598
AV395066			AV388599
im 1.Leseraster Transmembranbereiche			AV388622
AV395127			AV388633
im 2.Leseraster Ser/Thr KINASE und Transmembranbereiche			AV388673
AV395143			AV388707
im 1.Leseraster Transmembranbereiche			AV388710
AV395394			AV388778
im 2.Leseraster Transmembranbereiche			AV388813
AV395540			AV388864
im 2/3.Leseraster nix			AV388910
			AV389222
			AV389239
			AV389481
			AV389680
			AV389712
			AV389842
			AV389973
			AV390130

<p>AV395548 im 2.Leseraster Transmembranbereich; im 3.Leseraster dto. AV395877 im 2.Leseraster Ser/Thr KINASE</p> <p>AV395884 im 1.Leseraster Transmembranbereich AV395992 im 1.Leseraster Transmembranbereich AV396036 im 1.Leseraster Transmembranbereich; im 2.Leseraster Transmembranbereich AV396094 im 1.Leseraster Transmembranbereich; im 3.Leseraster Transmembranbereiche; AV396186 im 3.Leseraster Ser/Thr. KINASE und Transmembranbereich AV396265 im 2.Leseraster Transmembranbereiche AV396422 im 2.Leseraster Transmembranbereiche AV396561 im 1.Leseraster Transmembranbereich; im 3.Leseraster Transmembranbereich AV396637 im 2.Leseraster Transmembranbereiche AV396821 im 1.Leseraster Transmembranbereich; im 2.Leseraster Transmembranbereich AV396872 im 1.Leseraster Transmembranbereich; im 3.Leseraster Signal und Transmembranbereich AV396997 im 1.Leseraster Ser/Thr KINASE AV397075 im 2.Leseraster Transmembranbereich; im 3.Leseraster Transmembranbereich AV397351 im 3.Leseraster Transmembranbereich AV397465 im 3.Leseraster Signal-und Transmembranbereich AV397471 im 2.Leseraster Transmembranbereich; im 3.Leseraster Transmembranbereich AV397714 im 2.Leseraster nix AV397741 im 2.Leseraster KINASE und Transmembranbereich</p>			<p>AV390144 AV390170 AV390189 AV390239 AV390262 AV390307 AV390337 AV390389 AV390540 AV390544 AV390564 AV390567 AV390726 AV390878/PSII AV391029 AV391098 AV391195 AV391352 AV391353 AV391570 AV391578/LHC AV391604 AV391697 AV391732 AV391865 AV391899/Membran AV391942 AV391962 AV392095 AV392114 AV392141/Membran AV392205 AV392476 AV392679 AV393139 AV393160/Membran AV393264 AV393357 AV393417 AV393535 AV393586/PSII AV393665 AV393773 AV393775 AV393860 AV393877 AV393928 AV394107 AV394210 AV394252 AV394429 AV394470 AV394580 AV394622 AV394928 AV395010 AV395180 AV395359 AV395438 AV395479 AV395724 AV396026</p>
--	--	--	--

			AV396208 AV396322 AV396717/2 comp. AV396744 AV396901 AV396940 AV396963 AV397033 AV397084 AV397184 AV397673 AV397780 AV397836
--	--	--	--

Wahrscheinliche Serin/Threonin Kinasen

AV388963 (identisch mit AV392622)-394294

Nucleotidsequenz:

GCGACTTCGGCAGCGCCAAGGTGCTGGTGAAGGGGAGCCCAACATCTCGTACATTTGCTCAGCTACTATCGCGCGCCG
GAGCTCATCTTTGGCGCAACCGACTACACCAGCGCCATCGACGTCTGGTCGGTGGGCTGCGTGCTGGCGGAGCTGCTGCT
GGGGCAGCCGCTATTTCCCGGTGAGAGCGGCGTGGACCAGCTGGTGGAGATCATCAAGGTGCTGGGCACGCCACGCGCG
AGGAGATTAACGCAATGAACCCCAACTACACGGAGTTCAAGTTCCCCCAGATCAAGGCGCACCCCTGGACGAAGGTGTT
AGCAAGCGGATGCCGCCGACGCCGTGGACCTGGTGTCCaagctgctgcagtagcgcgccccagaagcgcagtagcgcggt
gcaggccatgacgcaccccttcttcgatgagctgcgggatccggccacgcggcttccgaacggccgcgactaccaccgc
tggtcaattggctgcccggcgagctggacgaggtcccgcggacattgtccgcaagctccagccggtggcgaaggcctcg
taactgcagcaccgcgtggcgcgacactggcgctgcagcagttggaagcatggatgaagagcaataacgacgaccgagca
ctagctatgagcagaatcacggctgactggactggacgggtggggcgaggggactcagctttgggtggaacactctggggag
tagcgcgtagttatggcaagaatgtgcgaaacggggttagcaag

Aminosäuresequenz:

DFGSAKVLVKGEPNISIYICSRYYRAPELIFGATDYTSAIDVMSVGCVLAEELLGQPLFPGESGVDQLVEIIKVLGTPTRE
EINAMNPNYTEFKFPQIKAHPWTKVFSKRMPPDAVDLVSKLLQYAPQKRMTAVQAMTHPFFDELRLDPATRLPNGRALPPL
FNWLPGELEVPADIVRKLQPVAKAS.LQHRVARTWRAAVGSMDEEQITTEH.L.AESRLTGLDGGARGLSFGWNTLGV
ARSYGKNVRNGVSK

Softwareanalysen:

SMART = Protein kinase; unclassified specificity/transmembrane segment
TAIR (BLASTP gegen GenPept;PIR und SwissPROT): Kinase
ChloroP = keine Chloroplastentransitsequenz
SignalP = kein Signal Schnittstelle

AV391836

Nucleotidsequenz:

caccagtgaggactgcagcacgtgcactccaagggcgtgggtgcacggcgacgtgaccgctagcaatgtgctgcttcaggc
gctgcctagccgcccgcagggctgtgtggccaaggttgcggacttccggcttagcgtgaggctcgagccggggccagtcgc
agatacagaacctgtacggcggcagcgcctcactacatggcgccggagcgttcgcgaggctgtttgtccaagcgtccgac
atctactcgtggcgctgtgctgcacgagatgtactgtggcagccccgcctggcgccgcaaaccccggaatggcaacgg
ccgctacggcgccaccgacaacagctggggacacagcagcgcggccagcggcgacggcgggcgccatggacggcgggcg
gcgggggcagccatagccgcccggccacggcgctgacgtgttcagcttccctcgcaactgcccgtccgagtagcgcagcg
ctggtggtgctcgtgtctggaggcggatccgtcatgcgcccggcgctagcgaagggg

Aminosäuresequenz:

HQVGLQHVHSGKGVVHGDVTASNVLLQALPSRPQGCVAKVADFGLSVRLEPGQSQIQNLYGGTPHYMAPERSRGCLSKRSD
IYSLGVCLHEMYCGTPAWRRNPNGNGRYGATDNSWGHSSAASGDGGGAMDGGGGHAIAAGHGADVFSFPRNCPSEYAA
LVVSCLEADPSCARR.RR

Softwareanalysen:

SMART = Serine/Threonine protein kinases, catalytic domain/transmembrane segment
TAIR (BLASTP gegen GenPept;PIR und SwissPROT): Kinase, evt Ser/Threonin
ChloroP = keine Chloroplastentransitsequenz
SignalP = kein Signal Schnittstelle^^

AV 392020

Nucleotidsequenz:

GCACCAGACGGCTTCTTCCACCGCGACATGAAGCCAGAGAACCTGCTGGCCAGCAAGGACAGCATCAAAATTGCGGACTT
CGGCCTGGCGCGGAGATCCGGTCCGGCCACCCTACACCGACTATGTGTCCACACGATGGTACCGTGCGCCGAGGTGC
TGCTGCGCTCGCCCTACTACAACGCGCCCATCGACCTGTTCCGCATGGGCGCCATCATGGCGGAGCTGTACATGCTGCGG
CCACTGTTCCCGGGACCAGCGAGGCGGACGAGATCTACAAGATCTGCTCCATCATGGGCACGCCACGCAGCAGGTGTG
GCCGAGGGGCTCAAGCTGGCGGCGACCATGAACCTCCGCTTCCCGCAGTTCCGCGCCACGCCGCTGAACAAGATCATCA

CCAACGCCTGCCCCGAGGCCATCGACCTCATGACGCAGCTGTGCCACTGGGACCCCAACAAGCGCCCCACCGCGGTGCAG
GCGCTGCAGCACCCCTACTTCGCGGTGGGCGTGCGGCCGGCGCTCCCGGTGGTCAACTCGCCCATGGTCATAGAC

Aminosäuresequenz 1.Leseraster:

APDGGFFHRDMKPENLLASKDSIKIADFLGLAREIRSRPPYTDYVSTRWYRAPEVLLRSPYYNAPIDLFAMGAIMAELYMLR
PLFPGTSEADEIYKICSIMGTPTQQVWPEGLKLAATMNFRRFPQFAPTPLNKIITNACPEAIDLMTQLCHWDPNKRPTAVQ
ALQHPYFAVGVRPALPVVNSPMVID

Softwareanalysen:

SMART = Protein kinase; unclassified specificity/transmembran segment
TAIR (BLASTP gegen GenPept;PIR und SwissPROT): Kinase, wahrscheinlich
Ser/Threonin
ChloroP = keine Chloroplastentransitsequenz
SignalP = Wahrscheinliches Signalpeptid mit cleavage site zwischen pos. 89 and
90: SEA-DE

Aminosäuresequenz 3.Leseraster:

TRLLPPRHEAREPAGQQQHONCGLRPGARDPVAATLHRLCVHTMVP CAGGAAALALLQRAHRPVRHGRHHGGAVHAAA
TVPGDQRGGRDLQDLLHHGHAHAAGVARGAQAGGDHELPLPAVRAHAAEQDHHQRLPRGHRPHDAAVPLGPPQAPHRGAG
AAAPLLRGGRAAGAPGGQLAHGHR

Softwareanalysen:

SMART = Transmembrane segment
TAIR (BLASTP gegen GenPept;PIR und SwissPROT):
ChloroP = keine Chloroplastentransitsequenz
SignalP = keine Signal Schnittstelle

AV393037

Nucleotidsequenz:

TCGCCTAGAAACATATATTAATGAACGCAGCAGCTCCGGACCCCTTGAAAGGCCGCGGCCGATACGCAAAGGTCCAGCC
TCTTAGCTCGGGCTCCTTTGGCTTCGTGCACCTCTGCAAGAACCTACAAACTGGCGAGCTAGTGGCTATCAAATTCTTGG
AACGCGGGGAGCGGGTAAACAAATATGTGGAGACGGAGGTCTGAACCACCGCATGCTGCGGCACCCGCACGTCATCGAG
TTCAAGGAGGTGTTCTGACGCCAGAATACATCTGCGTCTGCATGGAGTACGCGTGGGCGGCAACCTGTTTGGCTACGT
GCAGCGCGGGTGGGCTCAAGGAGCCCGCGGCACGCTGGTTCTTCCAGCAGCTCTGCATCGGTCTGGACTACTGCCACC
GGCGCGCGTGGTGAACCGCGACATCAAACCTGGAGAACACTCTCCTGACCATGGTGCCGGGCCTGCCGCTGCCGCTGCTC
AAAATCTGCGACTTCGGGTACAGCAAGGCGCACTTCATGTCCGCGCCCAAGAGCAAAGTGGGACGTTGGCTTACATGGC
TCCGGAGGTGATTTCGCGACACGGGACAGTAC

Aminosäuresequenz:

SPRNIY.MNAAAPDPLKGRGRYAKVQPLSSGSFGFVHLCKNLQTGELVAIKFLERGERVKNKYVETEVLNHRMLRHPHVIE
FKEVFLTPEYICVMEYASGGNLFQYVQRAVRLKEPAARWFFQQLCIGLDYCHRRGVVNRDIKLENTLLTMVPGLPLPLL
KICDFGYSKAHFMSAPKSKVGTLAYMAPEVIRDTGQY

Softwareanalysen:

SMART = Serine/Threonine protein kinases, catalytic domain/transmembrane segment
TAIR (BLASTP gegen GenPept;PIR und SwissPROT): Kinase, wahrscheinlich
Ser/Threonin
ChloroP = keine Chloroplastentransitsequenz
SignalP = kein Signal Schnittstelle

AV393211

Nucleotidsequenz:

GTGAACGACCCTCAGGTGATTGTGGCGGTGAAGCGCGTGCCGCTGGGCTGGAACCAGGAGCGCGAGCTGATGCAGCTGCA
CCGCTGCCAGCAGTGCCCTTCATCGTGC GGCTGTTCCGGTTCGTGGAGGACGGCGACGAGCACTGCAGCTACGTCATGG
AGTGGGCGGAGGGCGGTGACCTGGCGGGCATGCTTATTTCCCTGAAGGACCGGCGGGCGCCAACAAGCAGCGGCTGCTG
ATGAGCGAGGCCAGCGCGCTACTACATGGGCTGCCTGCTGCTGGCTCTGGAGTTCCTGCACAACAACGGACTGCTGCA
CAGAGACATCAAGCCCAGCAACCTACTGCTGACCTCGGACGGCACCCGAAGCTGGCAGACCTGGGCTTACCGTGGCCC

TGGACGCCAACGGCCAGACCGTGGGCTGCTGCGGCACCACCGGCTACATAGCGCCCCGAGGTGTACGCCTACGGCAGCAGC
AAGACGCGCAGCAGCTACGGCGTGCCCGGACATCTGGTCGGCGGGCGGCAGCCTG

Aminosäuresequenz:

VNDPQVIVAVKRVPLGWNQERELMQLHRCQQCPFIVRLFVFGVEDGDEHCSYVMEWAEGGDLGMLISLKDRRGANKQRL
MSEASARYYMGCLLLALEFLHNNGLLRDHRDIKPSNLLTSDGTAKLADLGFTVALDANGQTVGCCGTTGYIAPEVYAYGSS
KTRSSYGVPAIWSAAATL

Softwareanalysen:

SMART = Serine/Threonine protein kinases, catalytic domain
TAIR (BLASTP gegen GenPept;PIR und SwissPROT): Kinase, wahrscheinlich
Ser/Threonin
ChloroP = keine Chloroplastentransitsequenz
SignalP = kein Signal Schnittstelle

394622 - 396486

Nucleotidsequenz:

GGCGTGACCATACTCATGGCTGTGCGCGCCAGTCAACCGACTGGCCTGAAATGGGGCTGCCCGGAATTAGGCACCTGCC
GAGCTAGTTCCAGCCTGCAAGTTGCGGAAGCTGGACTGGAAgactcttcacatgaaagtacattactgtaatgaatgctt
atcaacctgtgaagaccgactgggagctttcgaggcactgatgtcttttcgacctgaaggagcaatagcagctggttca
gacaacatggatcaagcatacagtgctgctcgaacgcctgggctcaaacagaggatatggagtcggaagcagccaggag
caggtttcagctgcagtcctgctcggcaagggcgcttacggcactgtgtatgctgccattgacacggcctcgggggagc
gtgtggccatcaaggtgatcccagtcacagagcaggaccgagggagttcaaacagatccagcgcgaggtggccttctg
gcagactgcaaacacccaaatgtcgtgagatacctgggagctaccggcttctggggagctgtggatcgtgatggagta
ctgcgcgggcgatcagtgagcgacctgatgtcggcgggcgggcgccgat

Aminosäuresequenz:

GVTILMAVRASQPTGLKWGCPGIRHLP.S.FQPASCGSWTGRLFT.KYITVMNAYQPVKTDWELSRH.CLFRLEGAI AAGS
DNMDQAYSAAARTPGRQTEDMESEAARSFQLQSVLGKAYGTVYAAIDTASGERVAIKVIPVTEQDREEFKQIQREVAFL
ADCKHPNVVRYLGSYRLSGELWIVMEYCGGGSVSDLMSAGRAP

Softwareanalysen:

SMART = Serine/Threonine protein kinases, catalytic domain
TAIR (BLASTP gegen GenPept;PIR und SwissPROT): Kinase, evt Ser/Threonin
ChloroP = keine Chloroplastentransitsequenz
SignalP = keine Signal Schnittstelle

AV395127

Nucleotidsequenz:

GCCTGGTTTTCGTCTGCAGCGTCGACCTGCTGAAACGTGACGGTGAATTGGTGTTCATGACCGCCTCGAGACTTGACGAAGA
CCCGCTTGCCGGGTCCGTGCTTCGAGCGCTGCGAATTCTGGGCCGGAGCAGCGAGGGCGACAATGTGACCGTCTCTCGCGT
CCAGCAGCTCCACGGGGCAGCTGGTGGCCGTGAAGCTGATATCACGCGGCTTCGACTCGCCACGGGCAAAGTACCTGTTG
CGGGAGCTGTTAAACCACTATGAGCTAACCCCTCGCCAAGCACCCGCACGTCGTCAGCCTACTGGACGTGTTCTCTCACGCC
GCAGCATATGGCCATCGTGATGGAGTACGTTGACGGGGAGAACCTGCAGGTGTTTACGGAGAAGGCGGGTGGGTGCGTCA
TAGAGCCCCCTGGCGCGCTTCCTTTTCCAGCA

Aminosäuresequenz:

AWFRLQRRPAET.R.IGVMTASRLDEDPLAGSVLRTLRLILGRSSEGDNVTVLASSSSTGQLVAVKLISRGFDSPRAKYLL
RELLNHYELTLAKHPHVSVLLDVFLLTPQHMAIVMEYVDGENLQVFTEKAGGCVIEPLARFLFQ

Softwareanalysen:

SMART = Serine/Threonine protein kinases, catalytic domain (klein)
TAIR (BLASTP gegen GenPept;PIR und SwissPROT): Kinase, wahrscheinlich
Ser/Threonin
ChloroP = keine Chloroplastentransitsequenz
SignalP = keine Signal Schnittstelle

AV395877

Nucleotidsequenz:

AGCGCGCATTACAAGGAGCTGCTCAACTCGGGAGCCACGGACACGCCGCCTAGCGAGGTGTTCTCCGAGGGCGGAGCGCCT
GGCCTCGCTTCGCCACCCCTGCATCATCGCCTTCTACGGCATCATCACAGCGCCCGGCTCCTACGCCACAGTGGTGGAGT
TCCTGCGCATGGGCAGCCTGAAGAGCGGCCTGACGCGGCTGCGCAAGCAGGGCGCAGACATCAGCCGCAGGCTGAGGGTG
GCCATCGCGCTGCAGGCTGCTCGCGGCATGGAGTACCTGCACGGCCAGTTCGTGGTGCA

Aminosäuresequenz:

SAHYKELLNSGATDTPPSEVFSEAERLASLRHPCIIAFYGIITAPGSYATVVEFLRMGSLKSGLTRLRKQGADISRRLRV
AIALQAARGMEYLHGQFVV

Softwareanalysen:

SMART = Protein kinase; unclassified specificity./Transmembranbereich
TAIR (BLASTP gegen GenPept;PIR und SwissPROT): Kinase, evt. Ser/Threonin
ChloroP = keine Chloroplastentransitsequenz
SignalP = keine Signal Schnittstelle

AV396186

Nucleotidsequenz:

TAAGGCCTGCTTGGGGTCTGCTGGGGGCCCTGGACGCGGTGCCGCCAAGCGCGAAGAAGCCGGCAACTAAGCCAGCAGA
GAAGGTGGAGGCGCAGAAGGTTCGAGCGGAAAGCCACTTGGCGCAACAGCCCTCTGGTGCAGCAGTACAACCTCATCAAGC
AGATTGGAAGGGCGGCTTCAGTCAAATTTGGCTGGGCGAGCACAAGGAGAGTGGGCAGCAGGTGGCGGTCAAAGTTGTG
GACCTGAAGAATGAGGACCTGGAGCAGAGTGAGATTGCAAACCTGATTGCGGAGGCCAAGTTCCTTCGGACCATGGACTG
CCCCTTCCTGCTCAAGTGCCTTGAACCCGCACAAGATGACGATTGGCTGGTTCTCATCCTGGAGTATCTGTCTGGGCGGAG
AGATGCTCGAGCACCTGCACAAGGTGAAGAAGTACACGGAGGTGGAGGCGGCAAAGCTCTTCGCGCAGGTGGTGTCTGGCC
ATCTCCTACCTGCACAACTCAACTTGATGCACCGAGATATCAAGCCCC

Aminosäuresequenz:

.GLLGVLLGALDAVPPSAKKPATKPAEKVEAQKVERKATWRNSPLVQQYNLIKQIGKGGFSQIWLGEHKESGQQVAVKVV
DLKNEDELEQSEIANLIAEAKFLRTMDCPFLKCLETAQDDDLVLLILEYLSGGEMLEHLHKVKKYTEVEAAKLFAQVVS
ISYLHKLNLMHRDIKP

Softwareanalysen:

SMART = Serine/Threonine protein kinases, catalytic domain
TAIR (BLASTP gegen GenPept;PIR und SwissPROT): Kinase, evt. Ser/Threonin
ChloroP = keine Chloroplastentransitsequenz
SignalP = Wahrscheinliches Signalpeptid mit cleavage site zwischen pos. 17 and
18: PSA-KK

AV396997

Nucleotidsequenz:

GAGATCTCCCTGGTGCAGCAGTACACACTCGTGAAGCAGATTGGCAAGGGCGGCTTCTGTGAAATTTGGCTGGGCGAGCA
CAAGGAGAGCGGGCAGCAGGTGGCTGTGAAGGTGGTGGATCTGGGTATGGAGGACCTGGAGGAGAGCGAGATTGCAAACC
TGATTGCGGAGGCCAAGTTCCTTCGGACCATGGACTGCCCTTCTGGTCAAGTGTCTGGACATGACGCATGACGAGCAG
TGGCTGGTGTCTGGTTCTGGAATACCTGGCGGGCGGAGAGATGCTGGCGCACCTGCACAAGGTGAAGAAGTACACCGGAGG
TGGATGCCGCCAAGCTCTTCGCGCAGGTGGTGTCTGGCCATCTCCTACCTGCACAACCTCAACTTGATGCACCGCGACATC
AAGCCCAGAACGTCATGTTACACATCCGGT

Aminosäuresequenz:

EISLVQQYTLVKQIGKGFCEIWLGEHKESGQQVAVKVVDLGMEDLEESEIANLIAEAKFLRTMDCPFLVKCLDMTHDEQ
WLVLVLEYLAGEMLAHLHKVKKYTGCGCRQALRAGGVGHLLPAQPQLDAPRHQARERHVHTSG

Softwareanalysen:

SMART = Serine/Threonine protein kinases, catalytic domain
TAIR (BLASTP gegen GenPept;PIR und SwissPROT): Kinase, evt. Ser/Threonin
ChloroP = keine Chloroplastentransitsequenz

SignalP = keine Signal Schnittstelle

AV397741

Nucleotidsequenz:

TCCTCCGCGGACCCAGCCTACACCACGTACGTGGTCACGCGCTGGTACCGCGCGCCGGAAGTGCTTGTGGGCGACA
ACTACGGGCCGCTGTGGACGTGTGGGCGCTGGGCTGCATCTTCGCTGAGATGTTGGCGGGCCGGCCACTGTTCCCGGGCAAGA
ATCATCACGACCAGCTGTGGCTAATTCTCAAGTGCCTGGGCACCATGACGGAGCGGCAGCTGGAGCTGCTGGACTCGGAC
CCGCAGTTTTCGCTGCTTCAGGCTTCCCACGCAATCGGAGATCGAGCCGCTGGAGCACAGGCTGAGCGCACTGAGTGGACC
GGCGATGCAGTTTTTACGGGCGTGCCTTAACCCGGACCCCAAGCAGCGCGCCACCGCAGACGAGCTGTTGGCCATGCCGT
ACTTTTCGGGTGTCACGGACGTGCTGCCGGTGGACGACCTCATGGCATAACCCGGACCGGACCTGCGCGCAAAGCTGGA

Aminosäuresequenz:

SSADPAYTTYVTRWYRAPEVLVGDNYGPPVDVWALGCIFAEMLAGRPLFPGKNHHDQLWLILKCLGTMTERQLELLDSD
PQFACFRLPTQSEIEPLEHRLSALSGPAMQFLRACLNPDPKQRATADELLAMPYFSGVTDVLPVDDLMAYPDADLRAKL

Softwareanalysen:

SMART = Serine/Threonine protein kinases, catalytic domain
TAIR (BLASTP gegen GenPept;PIR und SwissPROT): Kinase ,evt. Map
ChloroP = keine Chloroplastentransitsequenz
SignalP = keine Signal Schnittstelle

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *
TAK1   : MADSHSVNNQLSRHTSIFGLRLVVVLGVCVGAIVLLVLLVLSLWFIYRRSNKNKSLESSSKSNHTIVPVVSKEIQEIRPPIQPDPTPEPHQNOQREDDNKIHIEIGKDHR : 110
AV390434 : -----: -

      120      *      140      *      160      *      180      *      200      *      220
TAK1   : IAYPERGGWTGSGSGSGGQGLLMLSGPEVSHLGMGHWYTLRELEVSTNGFADENVIGQGGYGVYRQVLEDKSMVAIKNLLMNRGQAEKEFKVEVEAIGVRVHKNLVVR : 220
AV390434 : -----: 3
                                         VR

*      240      *      260      *      280      *      300      *      320      *
TAK1   : LLGYCVEGAHRMLVVEYVDNGLMEQMIHGGLGFRSPLTWEIRMIIVLGTAKGLMYLHEGLEPKVVRDIKSSMILLDKQNSRVSDFGLAKLLGSEMSVVTTRVMGDFG : 330
AV390434 : LCGAYQDFKSLVLLQEMVPGELFHHLDVEGA-FDEPTAMFYAANVLL----ALEFLHA---KGIYVRDLHPENLLDTCGYIKMADSGFARYIGDKTYT---ICGIPD : 102
          L G      A      L      E      V      G      L      G      F      P      N      L      L      H      V      R      D      K      N      L      L      D      Q      K      D      G      A      K      G      Y      G      T

*      340      *      360      *      380      *      400      *      420      *      440
TAK1   : YVAPFYASTGMLNERSDVSFVGLVMEIISGRSPVDYSRAPGEVNLVEWLKRLVTRDAEGVLDPRMVDKPSLRSLKRTLVALRCVDPNAQKRPKMGHIIHMLEAEDLV : 440
AV390434 : YCAPVIMRRGTTKAADYVWALGVLIFEMLVG-----: 133
          Y APE      D      GVL      E      G

*      460      *      480      *
TAK1   : SKDDRRNSGGGGGIEQGRSPRRKTNVNESEDESGNSVLINNDQALLENKQN : 492
AV390434 : -----: -

```

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100      *
TAK1   : MADSHSVNNQLSRHTSIFGLRLVVVLGVCVGAIVLLVLLVLSLWFIYRRSNKNKSLESSSKSNHTIVPVVSKEIQEIRPPIQPDPTPEPHQNOQREDDNKIHIEIGKDHR : 110
AV391836 : -----: -

      120      *      140      *      160      *      180      *      200      *      220
TAK1   : IAYPERGGWTGSGSGSGGQGLLMLSGPEVSHLGMGHWYTLRELEVSTNGFADENVIGQGGYGVYRQVLEDKSMVAIKNLLMNRGQAEKEFKVEVEAIGVRVHKNLVVR : 220
AV391836 : -----: -

*      240      *      260      *      280      *      300      *      320      *
TAK1   : LLGYCVEGAHRMLVVEYVDNGLMEQMIHGGLGFRSPLTWEIRMIIVLGTAKGLMYLHEGLEPKVVRDIKSSMILLDKQNSRVSDFGLAKLLGSEMSVVTTR : 324
AV391836 : -----: 58
          GL      H      VVH      D      SN      LL      KV      DFGL      L      S

*      340      *      360      *      380      *      400      *      420      *      440
TAK1   : VMCTFGWVAPFYASTGMLNERSDVSFVGLVMEIISGRSPVDYSRAPGEVNLVEWLKRLVTRDAEGVLDPRMVDKPSLRSLKRTLVALRCVDPNAQKRPKMGHIIHML : 434
AV391836 : YCGTFRVMAPEFS-RGLSKRSIDVSLGVCLHMYCG--TPAVRNPNG--N--GRYGTATNSWCHSSAASGD-----G-----: 126
          GT      Y APE      G      L      RSD      YS      GV      E      G      R      PG      R      G      D

*      460      *      480      *
TAK1   : EAEDLVSKDDRRNSGGGGGIEQGRSPRRKTNVNESEDESGNSVLINNDQALLENKQN : 492
AV391836 : -----: 175
          GGGG      I      G      E      V

```