Evolution nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Naturwissenschaften des Fachbereiches Biologie an der Universität Kaiserslautern

vorgelegt von
Nicole Linka

Kaiserslautern, Juni 2001

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Identifizierung von nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern in eukaryotischen Algen	4
1.2	Identifizierung von nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern in Prokaryoten	6
2	Material und Methoden	8
2.1	Chemikalien und Enzyme	8
2.2	Algenanzucht	9
2.3	Biochemische Methoden	10
2.3.1	Proteinbestimmung	10
2.3.2	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)	10
2.4	Molekularbiologische Methoden	10
2.4.1	Bakterienstämme	10
2.4.2	Vektoren	11
2.4.3	Oligonukleotide	12
2.4.4	Rekombinante Techniken	13
2.4.4.1	Transformation von kompetenten E.coli-Zellen	13
2.4.4.2	Agarose-Gelelektrophorese	13
2.4.4.3	„In-vitro“-Manipulation von DNA	13
2.4.4.4	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	14
2.4.4.5	DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	14
2.4.5	DNA-Sequenzanalyse	14
2.4.6	DNA- und Aminosäuresequenz-Datenverarbeitung	14
2.4.7	Isolierung von Gesamt-RNA	14
2.4.8	„Northern-Blot“-Analyse	14
2.4.9	Poly-(A^+)-mRNA-Isolierung	15
2.4.10	Reverse-Transkription-PCR (RT-PCR)	15
2.4.11	Analyse einer Phagen-cDNA-Bank	15
2.4.12	„In-vivo“-Exzision	15
2.4.13	Isolierung von Phagen-DNA	16
2.4.14	Isolierung von genomischer DNA	16
2.4.15	„Southern-Blot“-Analyse	16
2.4.16	Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden	16
2.4.17	Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden	16

2.5	Identifizierung von homologen DNA-Sequenzen mittels Computer-gestützter Analysen von Sequenzdatenbanken	17
2.6	Heterologe Expression und biochemische Analyse rekombinanter Proteine	19
2.6.1	Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen in E.coli	19
2.6.2	Radioaktive Markierung heterolog exprimierter Proteine mit [^{35}S]-Methionin ([^{35}S]-Methionin-Assay)	19
2.6.3	Transportversuche an intakten E.coli-Zellen	20
2.6.4	Efflux-Versuche mit [α^{32}P]-Adenylat-vorbelandenen E.coli-Zellen	20
2.7	Klonierung eines Plasmid-Kontrukts zur heterologen Expression in E.coli	20
3	Ergebnisse	22
3.1	Identifizierung von weiteren nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern	22
3.1.1	Identifizierung von homologen DNA-Sequenzen in eukaryotischen Algen mittels PCR	23
3.1.2	Identifizierung von homologen DNA-Sequenzen in Prokaryoten mittels PCR	23
3.1.3	Identifizierung von homologen DNA-Sequenzen mittels Computer-gestützter Analysen von Sequenzdatenbanken	24
3.1.4	Analyse von Phagen-cDNA-Banken	25
3.1.5	DNA-Sequenzanalyse	26
3.1.6	Vergleich von verschiedenen Proteinsequenzen („Multiple Alignment“)	26
3.1.7	Hydropathieanalyse von NPTHo	34
3.1.8	Erstellung eines 12-Transmembranhelix-Modells für NPTHo	35
3.1.9	Phylogenetische Stammbaum-Analyse	36
3.1.10	Konservierte Sequenzmotive	41
3.1.11	Ermittlung der statistischen Signifikanz der konservierten Sequenzmotive	44
3.1.12	Erstellung eines Strukturmodells für die MCF-Familie	47
3.2	Molekular-genetische Analysen von nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern aus niederen Pflanzen	48
3.2.1	„Southern-Blot“-Analyse	48
3.2.2	„Northern-Blot“-Analyse	49
3.3	Heterologe Expression eines nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporters aus Holospora obtusa (NPTHo) in Escherichia coli	51
3.3.1	Herstellung des Plasmid-Konstrukts zur heterologen Expression von NPTHo in E.coli	51
3.3.2	Nachweis der heterologen Expression von NPTHo in E.coli	53

3.3.3	Transportstudien an intakten E.coli-Zellen nach heterologer Expression von NPTHo	54
3.3.3.1	Zeitabhängigkeit der ATP- und ADP-Aufnahme an intakten E.coli-Zellen	54
3.3.3.2	Einfluß verschiedener Effektoren auf die ATP-Aufnahme	56
3.3.3.3	Bestimmung der apparenten K_M- und V_{max}-Werte für ATP und ADP	57
3.3.3.4	Analyse eines „Counter-exchange"-Mechanismus mit Hilfe von Efflux-Versuchen	59
3.3.3.5	Analyse der Nukleotid-Verteilung in den E.coli-Zellen nach der ATP- bzw. ADP-Vorbeladung	62
3.3.3.6	Einfluß von Kaliumphosphat auf die ATP- bzw. ADP-Aufnahme	63
4	Diskussion	65
4.1	Evolution nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter	65
4.1.1	Vorkommen nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter	65
4.1.2	Phylogenetische Analysen nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter	70
4.1.3	Konservierte Sequenzmotive und evolutive Verbindung zur MCF-Familie	74
4.1.4	Evolutionsmodell zur Entstehung nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter	76
4.2	Molekular-genetische Analysen nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter aus niederen Pflanzen	80
4.3	Biochemische Charakterisierung der Transporteigenschaften eines nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporters aus Holospora obtusa	83
4.3.1	Kinetischen Daten des NPTHo-Proteins im Vergleich zu den bisher bekannten Nukleotid-Transportern	83
4.3.2	Möglicher Transportmechanismus des NPTHo-Proteins	84
4.3.3	Die evolutive und physiologische Bedeutung des NPTHo-Proteins	88
5	Zusammenfassung	90
6	Literaturverzeichnis	92
7	Anhang	103
7.1	DNA-Sequenzanalyse homologer Transportproteine aus Prokaryoten	103
7.2	DNA-Sequenzanalyse homologer Transportproteine aus Eukaryoten	109
7.3	EMBL-„Accession"-Nummern nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter	125
7.4	EMBL-„Accession"-Nummern mitochondrialer MCF-Transporter	126

7.5 Anteil identischer und ähnlicher Aminosäuren in den Proteinsequenzen nicht-mitochondrialer Nukleotidtransporter aus Eu- und Prokaryoten 128
7.6 Abkürzungen 131
7.7 Symbole für Aminosäuren 135

1 Einleitung

Die heutige Lebenswelt ist das Ergebnis einer unvorstellbar langen Evolution, die vor etwa 3,8 Milliarden Jahren mit einfachen einzelligen Organismen begann. Sie stellten die kleinsten lebens- und vermehrungsfähigen Einheiten dar, die von einer biologischen Membran umgeben waren (MAIER, 1996). Es wird angenommen, dass alle heute existierenden Lebewesen aus einer Gemeinschaft primitiver Zellen hervorgegangen sind, aus denen sich die drei heute bekannten Organismenreiche evolvierten (DOOLITTLE, 1999; WOESE, 1998). Die Einteilung der Organismen in Eukaryoten (Eukarya) und Prokaryoten, die ihrerseits in Eubakterien (Eubacteria) und Archaebakterien (Archaea) unterteilt werden, ergibt sich aus Sequenzvergleichen der ribosomalen Ribonukleinsäuren (rRNA).

Nach der Martin-Müller-Hypothese sind die phylogenetisch jüngeren Eukaryoten etwa vor 2,7 Milliarden Jahren aus einer primären Endosymbiose zweier Prokaryoten enstanden. Dabei hat ein methanogenes Archaebakterium als Wirtszelle ein eubakterielles α-Proteobakterium aufgenommen (MARTIN & MÜLLER, 1998). Aus dem eubakteriellen Endosymbionten ist im Verlauf einer Coevolution das Mitochondrium hervorgegangen. Infolge einer weiteren primären Endosymbiose gelangte ein Vertreter der Cyanobakterien in die eukaryotische Zelle. Im Zuge der pflanzlichen Evolution entwickelte sich aus dem photoautotrophen Eubakterium der Plastid (DOUGLAS, 1998; PALMER, 2000; MCFADDEN, 2000).

Die Eukaryoten kommen als Ein- oder Vielzeller vor; ihre zellulären Strukturen sind komplexer als die einer einfach aufgebauten prokaryotischen Zelle (Protocyte). So zeichnen sich die eukaryotischen Zellen (Eucyten) durch den Besitz eines Zellkerns und eines internen Membransystems aus. Durch diese inneren Membranen ist die Eucyte zusätzlich in funktionell unterscheidbare Kompartimente unterteilt. Jedes Kompartiment übt spezifische Funktionen aus und ist mit einem entsprechenden Satz an Enzymen ausgestattet. Diese für Eukaryoten typische Kompartimentierung setzt einen kontrollierten Transport von Metaboliten über die Membran voraus, um den Stoffaustausch und damit das Zusammenspiel verschiedener Stoffwechselprozesse zwischen den Kompartimenten einer Zelle sowie zwischen der Zelle selbst und ihrer Außenwelt zu gewährleisten.

Der spezifische Transport von bestimmten Molekülen bzw. Ionen über die Membran wird durch integrale Membranproteine ermöglicht, die einen passiven oder aktiven Transport katalysieren. Der aktive Transport erfordert Energie und ist daher immer direkt oder indirekt an exergonische Prozesse gekoppelt. Dagegen benötigt der passive Transport, der immer in Richtung des Konzentrationsgradienten erfolgt, keine zusätzliche Energie.

Bei den Transportproteinen unterscheidet man zwischen Carrier-Proteinen (Translokatoren, Transporter oder Permeasen) und Kanalproteinen (Ionenkanäle). Die Carrier-Proteine binden ihre

Substrate spezifisch und transportieren sie durch die Membran, indem sie eine Reihe von Konformationsänderungen durchlaufen. Wird bei einem Carrier-vermittelten Transport ein Substrat transportiert, so spricht man von Uniport. Der gleichzeitige Transport von zwei Substraten in die gleiche oder in die entgegengesetzte Richtung bezeichnet man als Symport (Cotransport) bzw. Antiport. Dagegen bilden die Kanalproteine aufgrund ihrer Struktur eine hydrophile Pore, durch die ein passiver Transport von Ionen erleichtert wird. Dabei können sich die Ionenkanäle unter Einwirkung eines Signals öffnen bzw. schließen oder unter fortlaufender Energiezufuhr den Transport von Ionen durchführen.

Bislang sind zahlreiche Transportproteine aus verschiedenen Organismen biochemisch charakterisiert und auf molekularer Ebene identifiziert worden. Aufgrund ihrer spezifischen Transporterfunktion sowie ihrer DNA- bzw. Proteinsequenz lassen sich die Transportproteine in unterschiedliche Familien einteilen (SAIER, 1994).

Adenosintriphosphat (ATP) als universelle Energiewährung der Zelle kann - wie alle anderen Nukleotide - aufgrund der Größe und Ladung die Membran nicht frei passieren, sondern gelangt mittels spezieller Transportproteine über die Membran. In eukaryotischen Zellen konnten bereits kodierende DNA-Sequenzen für mitochondriale und plastidäre ATP-Transporter identifiziert werden (KLINGENBERG, 1989; KAMPFENKEL et al., 1995). Innerhalb der Prokaryoten wurden die Gene für ein solches ATP-Transportsystem in den strikt intrazellulären Eubakterien Rickettsia prowazekii und Chlamydia trachomatis nachgewiesen (WILLIAMSON et al., 1989; TJADEN et al., 1999).

Der auf molekularer und biochemischer Ebene gut charakterisierte mitochondriale Adenylat-Transporter kommt in allen Mitochondrien-enthaltenden eukaryotischen Zellen vor (VIGNAIS, 1976; HACKENBERG & KLINGENBERG, 1980; KLINGENBERG, 1989). Unter physiologischen Bedingungen katalysiert dieses Transportprotein den Export von ATP im striktem Gegentausch mit cytosolischem ADP („Counter-exchange"-Modus; KLINGENBERG, 1989). Die Funktion des ADP/ATP-Carriers (AAC) liegt in der Versorgung ATP-konsumierender Reaktionen außerhalb des Mitochondriums mit ATP, das im Zuge der oxidativen Phosphorylierung auf der mitochondrialen Matrixseite synthetisiert wird. Zusammen mit allen bislang bekannten Transportproteinen der inneren Mitochondrienmembran, einschließlich der 2-Oxoglutarat/Malat-Transporter, Phosphat-Transporter, Tricarboxylat-Transporter sowie die Protonen-leitenden Entkoppler-Proteine (UCP, „uncoupling proteins"), gehört der mitochondriale ADP/ATP-Transporter zur „Mitochondrial Carrier Family" (MCF-Familie). Trotz der unterschiedlichen Substratspezifitäten und Transportmechanismen werden diese Transportproteine zu einer Familie zusammengefasst (KUAN & SAIER, 1993). Ein Vergleich der DNA- bzw. Protein-sequenzen hat ergeben, dass alle Mitglieder dieser Familie eine ähnliche molekulare Struktur aufweisen und vermutlich auf einen gemeinsamen Vorfahren zurückgehen (SAIER, 1994). Die Transportproteine der MCF-Familie bestehen im funktionellen Zustand aus einem Homodimer mit 2×6 transmembranen, α-helicalen Domänen (KLINGENBERG, 1989; FIORE et al., 1998). Jedes Monomer enthält drei sich wiederholende, interne Sequenzbereiche mit einer Länge von etwa 100

Aminosäuren, die jeweils zwei Transmembranhelices und eine hydrophile Schleife („Loop“) bilden, so dass ein Monomer aus sechs transmembranen Helices entsteht (KLINGENBERG, 1989; FIORE et al., 1998). Es wird angenommen, dass diese Transporterfamilie ursprünglich durch eine Gentriplikation entstanden ist (SAIER, 1994).

Neben dem mitochondrialen ADP/ATP-Carrier besitzen pflanzliche Zellen einen weiteren Adenylat-Transporter, der in der inneren Hüllmembran von Plastiden lokalisiert ist (KAMPFENKEL et al., 1995; NEUHAUS et al., 1997). Der plastidäre ATP-Transporter (AATP, ATP/ADP-Transporterprotein) importiert unter „In-vivo“-Bedingungen ATP aus dem Cytosol in den Plastiden, wobei im Gegentausch ADP aus dem Plastiden exportiert wird (HELDT, 1969). Damit weist dieser Adenylat-Transporter im Vergleich zu dem mitochondrialen ADP/ATP-Carrier eine entgegengesetzte Transportrichtung auf. Die physiologische Bedeutung für einen solchen ATP-Import besteht bei den Chloroplasten vermutlich in der nächtlichen Versorgung mit ATP, das u.a. für die Stärkemobilisierung benötigt wird (NEUHAUS & SCHULTE, 1997). Bei den heterotrophen Speicherplastiden liegt die wesentliche Funktion des plastidären ATP/ADP-Transporters darin begründet, dass diese Plastiden nur in geringem Maße ATP synthetisieren können. So sind die anabolen Reaktionen wie z.B. die Stärke- und Fettsäurebiosynthese auf die ATP-Versorgung aus dem Cytosol angewiesen (NEUHAUS et al., 1993; MÖHLMANN et al., 1994).

Obwohl der plastidäre und der mitochondriale Adenylat-Transporter dieselben Substrate (ATP und ADP) als frei Säuren im Antiport transportieren (TRENTMANN et al., 2000), weisen beide eukaryotischen Transporter keine substantiellen Gemeinsamkeiten bezüglich ihrer molekularen Struktur auf. Interessanterweise besitzt der plastidäre ATP/ADP-Transporter auf Proteinebene signifikante Ähnlichkeiten von über 60 % zu den ATP-Transportproteinen der obligat intrazellulären Eubakterien Rickettsia prowazekii und Chlamydia trachomatis (WILLIAMSON et al., 1989; TJADEN et al., 1999). Diese humanpathogenen Endoparasiten sind durch den Besitz eines ATP-Transporters in der Lage, ATP im direkten Gegentausch mit endogenem ADP zu importieren und damit den cytosolischen ATP-„Pool“ der eukaryotischen Wirtszelle auszubeuten. Unter physiologischen Bedingungen katalysieren demnach die rickettsiellen und chlamydialen Transporter den Transport von ATP in derselben Richtung wie der plastidäre Adenylat-Transporter (WINKLER & NEUHAUS, 1999). Aufgrund der Aminosäuresequenzen wird angenommen, dass die bakteriellen und die plastidären ATP/ADP-Transporter als Monomere funktionell sind und aus zwölf transmembranen α-Helices bestehen. Damit besitzen diese Transporter keine molekularen Strukturähnlichkeiten zu den mitochondrialen ADP/ATP-Carriern und werden als nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporter bezeichnet (WINKLER & NEUHAUS, 1999). Charakteristisch für Transportproteine mit zwölf membrandurchspannenden Domänen ist die Anordnung der Domänen in zwei Gruppen zu je 6 Helices, die durch einen relativ großen hydrophilen „Loop“ miteinander verbunden sind (MALONEY, 1990; SAIER, 1994).

Die Sequenzverwandtschaft der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter ist im Hinblick auf den weiten phylogenetischen Abstand zwischen den Eubakterien und den Pflanzen bemerkenswert. Der evolutive Zusammenhang dieser vermutlich miteinander verwandten Transporter ist bis heute ungeklärt. Vor dem Hintergrund der aktuellen Diskussion über die Enstehung der ersten eukaryotischen Zelle ergeben sich folgende wichtige Fragestellungen: Ist der nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporter ausschließlich auf intrazelluläre Bakterien und Plastiden beschränkt? Wenn ja, wie haben sich diese Transporter innerhalb der beiden Organismenreiche entwickelt? Woher stammt das Gen (Ursprung des Gens) und über welche möglichen evolutiven Wege könnte es auf die jeweiligen Organismen übertragen worden sein?

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit ist es, Anhaltspunkte für die Evolution nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter zu erhalten. Dazu ist es notwendig, weitere homologe Transportproteine in den verschiedenen Organismen zu identifizieren, um zu untersuchen, inwiefern das Gen im gesamten Organismenreich vorkommt. Im Rahmen laufender Genomprojekte sind bisher mehrere prokaryotische Genome vollständig sequenziert worden. Des Weiteren stehen schon die ersten Gesamt- bzw. Teilsequenzen einiger eukaryotischer Genome in verschiedenen Datenbanken zur Verfügung. Diese phylogenetisch auswertbaren Sequenzen können in Bezug auf die Identifizierung weiterer nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter genutzt werden. Zusätzlich kann unter Anwendung molekularbiologischer Techniken ein zielgerichtetes Suchen nach weiteren Sequenzhomologen in ausgewählten Organismen erfolgen, die aus evolutiver Sicht interessant sind.

1.1 Identifizierung von nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern in eukaryotischen Algen

Pflanzenzellen zeichnen sich gegenüber den übrigen Eukaryoten (Tiere und Pilze) durch den Besitz von Plastiden aus. Die Plastiden sind semiautonome Organellen mit einem eigenen kleinen Genom und kommen in verschiedenen Ausbildungsformen vor (Chloroplasten, Chromoplasten, Leukoplasten etc.). Sie sind von zwei Membranen umgeben, der äußeren und der inneren Hüllmembran (WAGNER & NEUHAUS, 2000). Die innere Plastidenmembran leitet sich nach der Endosymbionten-Theorie von der Plasmamembran des ehemaligen phototrophen Cyanobakteriums ab (MARGULIS, 1970), die eine physiologische Barriere zwischen Stroma und Cytoplasma darstellt und zahlreiche Transportproteine enthält. Die äußere Hüllmembran wird als Endocytosemembran der Wirtszelle bezeichnet, obwohl in ihr einige Porine mit eubakteriellem Ursprung lokalisiert sind, die den Transport von Ionen und kleinen Molekülen über die äußere Hüllmembran ermöglichen (WAGNER & NEUHAUS, 2000).

Bislang konnten in höheren Pflanzen (Spermatophyta) wie Arabidopsis, Raps, Kartoffel und Mais DNA-Sequenzen isoliert werden, die für plastidäre ATP/ADP-Transporter kodieren (KAMPFENKEL et al., 1995; TJADEN et al., 1998a; MÖHLMANN et al., 1998; NEUHAUS, unveröffentlicht). Es sind stets mehrere Isoformen des plastidären ATP/ADP-Transporters in den jeweiligen

Pflanzenspezies nachgewiesen worden. Zur biochemischen Charakterisierung dieser Transporter konnten die kodierenden DNA-Sequenzen im heterologen E.coli-Expressionssystem erfolgreich funktionell exprimiert werden (MÖHLMANN et al., 1998; TJADEN et al., 1998a). Die biochemischen Eigenschaften der plastidären ATP/ADP-Transporter sind außerordentlich ähnlich. Sowohl die Arabidopsis-Isoformen AATP1At und AATP2At als auch das Kartoffelhomolog AATP1St sind spezifisch für den ATP- und ADP-Transport. Andere Nukleotide werden nicht als Substrat erkannt (MÖHLMANN et al., 1998; TJADEN et al., 1998a). Man geht derzeit davon aus, dass alle höheren Pflanzen einen plastidären ATP/ADP-Transporter besitzen, um die Plastiden mit ausreichend Energie in Form von ATP zu versorgen (NEUHAUS & EMES, 2000).

Inwiefern eukaryotische Algen aufgrund ihrer ursprünglicheren Entwicklung auch einen plastdiären ATP/ADP-Transporter besitzen, sollte in der vorliegenden Doktorarbeit untersucht werden. Die Algen, die sich im Verlauf ihrer Evolution vom Einzeller bis hin zum komplizierten Flecht- und Gewebethallus entwickelt haben, lassen sich basierend auf rRNA-Analysen in veschiedene phylogenetische Abteilungen einordnen (BHATTACHARYA & MEDLIN, 1998). Für diese Doktorarbeit wurden repräsentative Vertreter zur Identifizierung von plastidären ATP/ADP-Transportern innerhalb der eukaryotischen Algen ausgewählt.

Aus evolutiver Sicht ist der einzellige Flagellat Cyanophora paradoxa, der zu den Glaucocystophyceen gehört, äußerst interessant (KIES & KREMER, 1986). Die Vertreter dieser Familie gelten als die ursprünglichsten Algen („Ur-Algen“ bzw. „primitivsten Pflanzen“), da sie einen Cyanobakterium-ähnlichen Plastid mit einer rudimentären prokaryotischen Zellwand enthalten (LÖFFELHARDT & BOHNERT, 1997). Dieses als Cyanelle bezeichnete Organell besitzt zwischen der inneren und äußeren Hüllmembran noch Reste einer Peptidoglucan-Schicht (GIDDINGS et al., 1983). Da sich Cyanophora paradoxa durch einfache Anzuchts- und Wachstumsbedingungen auszeichnet, ist diese Alge innerhalb der Glaucocystophyceen am besten charakterisiert.

Die Grünalgen (Chlorophyta) lassen sich phylogenetisch als die unmittelbaren Vorläufer der höheren Pflanzen einordnen (DEVEREUX et al., 1990; CHAPMAN & BUCHHEIM, 1991). Ein Vertreter dieser Familie ist Chlamydomonas reinhardtii, der als Modellorganismus in Bezug auf Genetik und Physiologie gut charakterisiert ist (HARRIS, 1989). Falls in den Plastiden der Grünalgen ein ATP/ADP-Transporter vorhanden ist, könnte in Chlamydomonas reinhardtii die entsprechende kodierende DNA-Sequenz identifiziert werden.

Eine weitere interessante Alge für die Analyse der Evolution plastidärer ATP/ADP-Transporter ist die Kieselalge Odontella sinensis, die zur Familie der Heterokontophyta gehört (KROTH & STROTMANN, 1999). Im Gegensatz zu den Plastiden der Rotalgen (Rhodophyta), Grünalgen (Chlorophyta) und denen der höheren Pflanzen (Spermatophyta) besitzen die Heterokontophyta, Cryptophyta und Chlorarachniophyta Plastiden mit vier Membranen. Bei den Dinophyta und Euglenophyta kommen Plastiden mit drei Hüllmembranen vor (HÄUBER et al., 1994). Plastiden, die von mehr als zwei Hüllmembranen umgeben sind, werden als komplexe Plastiden bezeichnet. Sie

sind das Ergebnis sekundärer Endosymbiosen zwischen Plastiden-haltigen Eukaryoten (Endosymbiont) und heterotrophen Eukaryoten (Wirtszelle). Im Laufe der coevolutiven Entwicklung wurde der eukaryotische Endosymbiont schrittweise bis auf die Plastiden und die Plasmamembran reduziert (MAIER, 1996). Man nimmt an, dass diese sekundären Endosymbiosen unabhängig voneinander (polyphyletisch) aus verschiedenen Wirten und Endosymbionten entstanden sind (KROTH & STROTMANN, 1999). Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit des plastidären Odontella-Genoms mit dem Genom der Rotalge Porphyra purpurea geht man davon aus, dass im Fall der Kieselalge eine Rotalge (Rhodophyta) phagocytiert worden ist (KOWALLIK et al., 1995; REITH & MUNHOLLAND, 1995). Da bereits in der Rotalge Galdieria sulphuraria ein plastidärer ATP/ADP-Transporter charakterisiert worden ist (Stamme, 1999), stellt sich aus evolutiver Sicht die Frage, ob ein ähnlicher Transporter auch in den Plastiden der Kieselalge Odontella vorhanden ist.

1.2 Identifizierung von weiteren nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern in Prokaryoten

Nach der allgemein anerkannten Endosymbionten-Theorie sind Mitochondrien und Plastiden aus ehemals freilebenden Eubakterien hervorgegangen, die von einer Wirtszelle aufgenommen worden sind und sich im Verlauf der Evolution zum Organell entwickelt haben (MARGULIS, 1970). Dabei erfolgte ein horizontaler Transfer von Genen aus dem Genom der Endosymbionten in den Zellkern der Wirtszelle (MARTIN & HERMANN, 1998). Im Hinblick auf die Evolution nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter wäre es vorstellbar, dass das Gen für diesen Transporter im Zuge der Endosymbiose durch Gentransfer in das Genom der eukaryotischen Zelle gelangt ist. So könnten möglicherweise die heutigen Nachfahren der Mitochondrien- bzw. Plastiden-Vorläufer das Gen immer noch im Genom besitzen. Um diesen evolutiven Weg zu untersuchen, könnten die vollständig sequenzierten Genome einiger Vertreter der α-Proteo- und Cyanobakterien, die als die unmittelbaren Vorfahren dieser Organellen angesehen werden, zur Identifizierung nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter herangezogen werden (CAVALIER-SMITH, 2000; GRAY et al., 1999). So wurden in dem α-Proteobakterium Rickettsia prowazekii, das zu den engsten Verwandten der Mitochondrien zählt (ANDERSSON et al., 1998), nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporter entdeckt (WINKLER, 1976; WINKLER & NEUHAUS, 1999).

Andererseits könnte die Wirtszelle das Gen für diesen Transporter bereits im Genom enthalten haben. Trifft diese Hypothese zu, sollte dieses Gen im Genom heutiger Archaebakterien zu finden sein, da die Eukaryoten vermutlich aus einem methanogenen Archaebakterium hervorgegangen sind (MARTIN & MÜLLER, 1998). Dazu sollten in der vorliegenden Doktorarbeit die im Rahmen von Genom-Projekten veröffentlichen Sequenzen archealer Genome für die Suche nach homologen Transportproteinen genutzt werden.

Denkbar wäre auch ein horizontaler Gentransfer zwischen Pflanzen und Eubakterien, bei dem der nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporter von den Pflanzen auf die Prokaryoten übertragen worden ist. Solch ein Transfer könnte durch Wechselwirkungen intrazellulärer Bakterien mit pflanzlichen Zellen erfolgen. Für die Cyclophilin (CyP) kodierende Genfamilie sowie für die Gene der großen Rubisco-Untereinheit rbcL konnte beschrieben werden, dass sich die Existenz dieser pflanzlichen Gene im eubakteriellen Genom nicht mit einem endosymbiontischen Gentransfer begründen lässt (CHOU & GASSER, 1997; DELWICHE & PALMER, 1996). Ebenfalls konnte vor kurzem eine neue Familie der eubakteriellen Citrat-Carrier entdeckt werden, die aufgrund eines horizontalen Gentransfers zu dem plastidären 2-Oxogluturat/Malat-Translokator aus Spinat verwandt ist (POS et al., 1998). Interessanterweise konnten im vollständig sequenzierten Chlamydien-Genomprojekt eine Reihe von Genen entdeckt werden, zu denen man in Pflanzen homologe Proteine findet (STEPHANS, 1998). Zu diesen zählen die zwei Gene der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter aus Chlamydia trachomatis NPT1Ct und NPT2Ct (TJADEN et al., 1999). Innerhalb der Bakterien könnten die für nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporter kodierenden Gene durch horizontalen Gentransfer untereinander weit verbreitet worden sein, was dazu führt, dass sich der Ursprung des Gens nicht mehr rekonstruieren lässt (MARTIN, 1999; GARCIA-VALLVÉ et al., 2000).

Da ATP – im Gegensatz zu den meisten Nährstoffen – nicht im Außenmedium verfügbar ist, geht man davon aus, dass ATP-Transportproteine bei Eukaryoten auf Endomembranen bzw. bei Prokaryoten auf obligat endosymbiontisch bzw. endoparasitisch lebende Bakterien beschränkt sind (WINKLER & NEUHAUS, 1999). Innerhalb der Prokaryoten konnten bislang nur in strikt intrazellulären Eubakterien nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporter identifiziert werden (WILLIAMSON et al., 1989; TJADEN et al., 1999). Aus diesem Grund sollte in dieser Doktorarbeit untersucht werden, ob solche Transporter ausschließlich auf intrazelluläre Bakterien beschränkt oder auch in freilebenden Bakterien zu finden sind. Dazu sollte im gesamten Reich der Eubakterien nach weiteren Sequenzhomologen gesucht werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Enzyme

Vertreiber	Produkte
Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg	Ready-To-Go DNA Labelling Beads (-dCTP), Hybond N Nylonmembranen
AppliChem, Darmstadt	Glycerin, Glycin, Natriumcitrat, D(+)-Glucose, EDTA, Acrylamid 4K-Lösung (40 %),
Bioconcept, Umkirch	Nitrocellulosemembranfilter (0,45 µm)
Biometra, Göttingen	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
Biomol, Hamburg	SDS
Biozym, Oldendorf	Filter-Pipettenspitzen
Duchefa, Haarlem, Niederlande	Ampicilin, Chloramphenicol, Rifampicin,Tetrazyklin
Difco Laboratories, Hamburg	Methionin-„Assay"-Medium
Fermentas, St.Leon-Rot	T4-DNA-Polymerase I, Restriktionsnukleasen, IPTG, X-Gal, Lambda DNA/Pst I Marker,
Gerbu, Gaiberg	NADH, NAD, NADP
Hybraid, Heidelberg	Taq-DNA-Polymerase
Life Technologies, Karlsruhe	SUPERSCRIPT^{TM}II RNaseI^{-} Reverse Transkriptase, Agarose, Bacto-Agar, Hefe-Extrakt, Pepton, T4 DNA Ligase, Oligo(dT)$_{12-18}$ Primer
Macherey-Nagel, Düren	Whatman-Papier
Merck, Darmstadt	Polyethylenamin-Cellulose-Dünnschicht-Chromatographie-Platten, Methanol, Magenesiumchlorid, Isopropanol, Kaliumchlorid
Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach	µMACS mRNA Isolation Kit
MWG Biotech, Ebersberg	Oligonukleotide
NEN DuPont, Bad Homburg	[α^{32}P]-ATP, [α^{32}P]-dCTP, [^{35}S]-Methionin
New England Biolabs, Schwalbach	Prestained Protein Marker Broad Range, Restriktionsnukleasen
Novex, Frankfurt aM	Dry Ease Mini-Gel Drying System
Promega, Mannheim	Pfu-Polymerase, pGEM-T Easy Vector System I
Qiagen, Hilden	QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAbrane Nylonmembranen, QIAGEN Lambda Mini Kit, QIAEX II Gel Extraction Kit

Vertreiber	Produkte
Riedel-de-Haen, Seelze	Tris, Wasserstoffperoxid
Roth, Karlsruhe	Eisessig, NaCl, Ethanol, Hepes
Schleicher & Schuell, Dassel	Protran Nitrocellulosemembranen, ELU-Quick DNA Purification Kit
Sigma-Aldrich, Deisenhofen	DNase, RNase, Kodak X-OMAT/XAR-5, Bicinchoninsäure-Kupfersulfat-Lösung, Temed, Bromphenolblau, Ammoniumpersulfat, Natriumdihydrogenphosphat, Dodecylmaltosid, Kaliumdihydrogenphosphat, Coomassie Brilliant Blue G-250
Stratagene, Heidelberg	ExAssist^{TM} Interference-Resistant Helper Phage with SOLR strain

Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Sigma im höchsten Reinheitsgrad bezogen.

2.2 Algenanzucht

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem Wildtyp-Stamm von Cyanophora paradoxa sowie mit der zellwandlosen Mutanten des Wildtyps von Chlamydomonas reinhardti (cw-15) gearbeitet, die aus der Sammlung für Algenkulturen in Göttingen (SAG) bezogen wurden (Tab. 2.1).

Tab. 2.1: Verwendete Algenstämme und Anzuchtmedia

Algen-Name	Stamm	SAG-Nr.	Medium
Cyanophora paradoxa	Wildtyp	SAG 29.80	nach SCHLICHTING et al. (1990)
Chlamydomonas reinhardtii	cw-15	SAG 83.81	nach SUEOKA (1960)

Die Anzucht der Algen erfolgte photoautotroph bei einer Beleuchtungsstärke von 250 µmol Photonen m^{-2} s^{-1} und bei einer Belüftung (40 l h^{-1}) mit reiner Luft (0,035 % CO_2). Dabei wurden die Algen entweder im Dauerlicht angezogen oder durch einen 12-stündigen Licht/Dunkelrhythmus synchronisiert.

Die im Licht/Dunkel-Wechsel angezogenen Algen wurden stets am Ende der Dunkelphase geerntet. Für RNA- bzw. DNA-Isolierungen erfolgte der Zellaufschluß der Algen durch Mörsern unter Stickstoffkühlung.

2.3 Biochemische Methoden

2.3.1 Proteinbestimmung

Der Proteingehalt von wässrigen Lösungen ohne Detergenzien wurde nach der Methode von BRADFORD (1976) mit Hilfe von Coomassie Brilliant Blue G-250 bei einer Wellenlänge von 595 nm im Spektralphotometer bestimmt. Als Referenzprotein zur Erstellung einer Eichgeraden diente Rinderserumalbumin (BSA). Der Proteingehalt in detergenshaltigen Lösungen wurde mit einer Bicinchoninsäure-Kupfersulfat-Lösung (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) nach Anweisung des Herstellers ermittelt.

2.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen wurde eine diskontinuierliche Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, abgekürzt SDS-PAGE (engl. Natrium: „Sodium“), nach LAEMMLI (1970) durchgeführt.

Die diskontinuierlichen Elektrophoresen erfolgten in vertikalen Elektrophoresekammern (Serva, Heidelberg) mit einem 10-15 %igen Trenngel und einem 3 %igen Sammelgel. Die Proben wurden mit einem Probenpuffermedium (62,5 mM Tris-HCl; pH 8,3; 0,05 % (w/v) SDS; 10 % (v/v) Glycerin; 0,25 % (w/v) Bromphenolblau; 20 mM DTT_{red}) versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach Auftragen der Proben erfolgte die Trennung bei einer konstanten Spannung von 80 - 120 Volt. Als Molekulargewichtsstandard wurde das Proteingemisch „Prestained Protein Marker Broad Range“ (New England Biolabs, Schwalbach) verwendet. Das Anfärben der Proteine im Gel erfolgte mit Coomassie Brilliant Blue G-250 (0,25 % (w/v) in 45 % (v/v) Methanol und 9 % (v/v) Eisessig). Zur Entfärbung wurden die Gele etwa 12 Stunden bei Raumtemperatur in einer Lösung aus 5 % Methanol und 7,5 % Eisessig inkubiert.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Bakterienstämme

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit den folgenden Escherichia-coli-Stämme gearbeitet (Tab. 2.2). Die Bakterien wurden auf YT-Medium (0,8 % (w/v) Pepton; 0,5 % (w/v) Hefeextrakt; 0,25 % (w/v) NaCl; pH 7,0) bzw. YT-Platten (+ 1,5 % (w/v) Agar) unter aeroben Bedingungen bei 37°C angezogen. Durch Zugabe der entsprechenden Antibiotika wurden geeignete Selektionsmedien hergestellt (Tab. 2.3).

Tab. 2.2: Verwendete Bakterienstämme

E.coli-Stämme	Resistenz	Verwendung	Referenz
E.coli XL1 Blue	Tet^r	Sämtliche Klonierungen	STRATAGENE, Heidelberg
E.col BL21(DE3) pLysS	Clm^r	Heterologe Expression	STUDIER et al., 1990
E.coli XL1 Blue MRF´	Tet^r	Analyse von cDNA-Banken	STRATAGENE, Heidelberg
E.coli XL1 Blue SOLR	-	In-vivo Exzision	STRATAGENE, Heidelberg

Tab. 2.3: Konzentrationen der verwendeten Antibiotika

Antibiotikum	Endkonzentration
Ampicillin (Amp)	200 µg/ml
Chloramphenicol (Clm)	25 µg/ml
Rifampicin (Rif)	0,5 mg/ml
Tetrazyklin (Tet)	10 µg/ml

2.4.2 Vektoren

Die in dieser Arbeit verwendeten oder konstruierten Vektoren, die zur Klonierung oder Expression in Bakterien eingesetzt wurden, sind in Tabelle 2.4 dargestellt.

Tab. 2.4: Auflistung der verwendeten Vektoren

Plasmide	relevante Merkmale	Referenz
pBSK	Klonierungsvektor	STRATAGENE, Heidelberg
pGEM-T Easy	Klonierungsvektor	PROMEGA, Mannheim
pET16b	Expressionsvektor mit Histidin-„Tag“	NOVAGEN, Heidelberg
pNL 1	800 bp großes AATPCp-PCR-cDNA-Fragment aus Cyanophora paradoxa in pGEM-T Easy	diese Arbeit

Plasmide	relevante Merkmale	Referenz
pNL 2	800 bp großes AATPCr-PCR-cDNA-Fragment aus Chlamydomonas reinhardtii in pGEM-T Easy	diese Arbeit
pNL 3	800 bp großes AATPOs-PCR-cDNA-Fragment aus Odontella sinensis in pGEM-T Easy	diese Arbeit
pNL 4	800 bp großes NPTCc-PCR-cDNA-Fragment aus Caedibacter caryophila in pGEM-T Easy	diese Arbeit
pNL 5	2,1 kb große genomische NPTHo-DNA-Sequenz aus Holospora obstusa in pBSK	diese Arbeit
pNL 6	1,7 kb großer AATPCr-cDNA-Klon aus Chlamydomonas reinhardtii in pGEM-T Easy	diese Arbeit
pNL 7	1,6 kb großer AATPOs-cDNA-Klon aus Odontella sinensis in pGEM-T Easy	diese Arbeit
pNL 8	1,5 kb große genomische NPT1Ho-DNA-Sequenz aus Holospora obstusa in pET16b mit N-term. His-„Tag“	diese Arbeit

2.4.3 Oligonukleotide

Die für die DNA-Sequenzanalyse sowie für die Amplifikation von DNA-Fragmenten mittels Polymerasekettenreaktion eingesetzten Oligonukleotide, die von der Firma MWG Biotech (Ebersberg) hergestellt wurden, sind in der Tabelle 2.5 aufgelistet.

Tab. 2.5: Verwendete Oligonukleotide

Name	Basenseqeunz
T3 Promotor Primer	5´- ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA - 3´
T7 Promotor Primer	5´- TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG - 3´
M13 Forward Primer	5´- GTA AAA CGA CGG CCA GT - 3´
M13 Reverse Primer	5´- GGA AAC AGC TAT GAC CAT - 3´

Name	Basenseqeunz
λ1149-Left	5´- TGA GCA AGT TCA GCC TGG TTA AGT C - 3´
λ1149-Right	5´- GCT TAT GAG TAT TTC TTC CAG GGT A - 3´
PFL 65	5´- TTY GCN AAY SAR ATH AC- 3´
PFL 66	5´- RTC NAR NGG DAT RTA NGC CAT - 3´
PFL 67	5´- GCX CCN CCN SWY TTN CCN A - 3´
Holo-1-Primer (Nde I)	5´- AAT TGA GGC CAT ATG TCA AAC TTG TC - 3´
Holo-2-Primer (Xho I)	5´- CTA TTC TTT TCT CGA GGT CCG AAC C - 3´

Für die degenerierten Oligonukleotide (PFL 63 - PFL 67) wurde der folgende IUB-Kode (International Union of Biochemistry) angewendet: M = A + C; R = A + G; S = G + C; Y = C + T; V = A + G + C; H = A + C + T; K = G + T; D = A + G + T; B = G + T + C; N = A + C + G + T; X = Inosin.

2.4.4 Rekombinante Techniken

2.4.4.1 Transformation von kompetenten E.coli-Zellen

Die Herstellung kompetenter E.coli-Zellen und deren Transformation erfolgte nach HANAHAN (1983).

2.4.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese zur Auftrennung von DNA-Fragmenten wurde nach SAMBROOK et al. (1989) in horizontalen Gelapparaturen durchgeführt. Als Größenstandard diente der Lambda DNA/Pst I Marker (Fermentas, St.Leon-Rot).

2.4.4.3 „In-vitro“-Manipulation von DNA

Die Restriktion von DNA mit Restriktionsendonukleasen (Fermentas, St.Leon Rot) sowie die Ligation von DNA-Fragmenten mit T4-DNA-Ligase (Life Technologies, Karlsruhe) erfolgten nach Angaben des Herstellers. Bei Insertion von DNA-Fragmenten wurde der Plasmidvektor mit Hilfe von Alkalischer Phosphatase aus Kälberdarm (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) dephosphoryliert, um eine Religation des Vektors zu verhindern. Die Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarose-Gelen wurde nach der Methode des „QIAEX II Gel Extraction Kit“ (Qiagen, Hilden) durchgeführt.

2.4.4.4 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien erfolgte mit Hilfe des „QIAprep Spin Mini Kit" gemäss den Angaben des Herstellers (Qiagen, Hilden).

2.4.4.5 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) zur Amplifikation von bestimmten DNA-Abschnitten wurde in einem T3-Thermocycler sowie in einem T-Gradient Thermocycler (Biometra, Göttingen) durchgeführt. Als DNA-Polymerasen wurden die Taq-DNA-Polymerase (Hybraid, Heidelberg) bzw. die Pfu-Polymerase mit einer 3´-5´-Exonukleaseaktivität (Promega, Mannheim) verwendet. Beide DNA-Polymerasen wurden entsprechend den Angaben des Herstellers in die PCR-Reaktion eingesetzt.

2.4.5 DNA-Sequenzanalyse

Für die DNA-Sequenzierung wurde der Sequenzierservice der Firma Seqlab (Göttingen) in Anspruch genommen.

2.4.6 DNA- und Aminosäuresequenz-Datenverarbeitung

Die DNA- und Aminosäuresequenzen wurden mit dem Programm TRANSLATOR von Molecular Biology Shortcut im Internet analysiert (www.mbshortcuts.com). Die Sequenzvergleiche von Proteinen erfolgten mit dem CLUSTALW-Programm (THOMPSON, 1994), das im Internet unter der Adresse http://www2.ebi.ac.uk/clustalw frei zugänglich ist. Zur manuellen Nachbearbeitung des Protein-Alignments wurde das Programm GENEDOC verwendet (NICHOLAS et al., 1997). Die phylogenetischen Stammbaum-Analysen wurde mit den Programm PHYLIP Version 3,5c berechnet und mit dem Progamm TREEVIEW bearbeitet (FELSENSTEIN, 1993; PAGE, 1996). Die Hydropathie-analysen wurden mit dem Programm ProtScale nach KYTE & DOOLITTLE (1982) im Internet erstellt (www.expasy.ch/cgi-bin/ protscale.pl).

2.4.7 Isolierung von Gesamt-RNA

Die Isolierung von Gesamt-RNA wurde nach einer Modifizierung (RNA-Miniprep nach US-Patent 5.346.994) des Protokolls von CHOMCZYNSKI & SACCHI (1987) durchgeführt. Die Reinheit und Konzentration der erhaltenen RNA wurde durch photometrische Messung der Absorption bei Wellenlängen von 230 nm, 260 nm und 280 nm bestimmt (SAMBROOK et al., 1989).

2.4.8 „Northern-Blot"-Analyse

Die Auftrennung von hitzedenaturierter RNA wurde in Formaldehyd-haltigen Agarosegelen durchgeführt. Mittels Kapillartransfer wurde die RNA aus dem Gel auf eine Nylonmembran (Hybond N, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg) in 10fach konzentriertem Transferpuffer-medium (0,15 M Natriumcitrat; 1,5 M NaCl; pH 7,0) übertragen. Die auf Nylonmembran transferierte

RNA wurde mit Hilfe eines UV-Ofens (Spectronics Corporation) durch UV-Licht der Wellenlänge 254 nm (120 mJ × cm²) kovalent auf der Membran fixiert.

2.4.9 Poly-(A^+)-mRNA-Isolierung

Die Isolierung von Poly-(A^+)-mRNA (messenger RNA oder mRNA) erfolgte mit dem „µMACS mRNA Isolation Kit“ (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) entsprechend den Angaben der Herstellers.

2.4.10 Reverse-Transkription-PCR (RT-PCR)

Komplementäre DNA (cDNA, complementary oder copy DNA) wurde mittels der SUPERSCRIPT™II RNaseI⁻ Reverse Transkriptase (Life Technologies, Karlsruhe) nach Angaben des Herstellers aus mRNA hergestellt.

2.4.11 Analyse einer Phagen-cDNA-Bank

Die Analyse der Phagen-cDNA-Banken (Tab. 2.6) erfolgte nach einer von BENTON et al. (1977) beschriebenen Methode, bei der geeignete E.coli-Zellen (Wirtszellen oder host cells) mit Bakteriophagen infiziert werden, die im Phagenvektor eine bestimmte cDNA-Sequenz enthalten. Jeweils 500.000 Plaques wurden durchgemustert. Die Analyse des inseriertem cDNA-Fragments erfolgt im Falle der Odontella- und Cyanophora-cDNA-Bank mittels „In-vivo“-Exzision bzw. im Falle der Chlamydomonas-cDNA-Bank mittels λDNA-Isolierung.

Tab. 2.6: Verwendete Phagen-cDNA-Banken

Organismus	Phage	E.coli-Wirtszelle	Referenz
Odontella sinensis	λZAP II	XL1-Blue MRF´	PANCIC et al., 1993
Cyanophora paradoxa	λZAP II	XL1-Blue MRF´	JAKOWITSCH et al., 1993
Chlamydomonas reinhardtii	λ1149	K12 BHB2600	AMATI et al., 1988

2.4.12 „In-vivo“-Exzision

Die „In-vivo“-Exzision der λZAP II-Phagen mit Hilfe von f1-Helferphagen wurde nach dem Protokoll des „ExAssist™ Interference-Resistant Helper Phage with SOLR strain“ (Stratagene, Heidelberg) durchgeführt.

2.4.13 Isolierung von Phagen-DNA

Die Isolierung von Lambda-Phagen-DNA erfolgte mit Hilfe des „QIAGEN Lambda Mini Kit“ (Qiagen, Hilden).

2.4.14 Isolierung von genomischer DNA

Die Isolierung genomischer DNA aus Algen wurde mit dem „ELU-Quick DNA Purification Kit“ (Schleicher & Schuell, Dassel) nach den Angaben der Herstellers durchgeführt.

2.4.15 „Southern-Blot“-Analyse

Für eine „Southern-Blot“-Analyse wurden 2,5 µg genomische DNA durch Restriktionsendonukleasen geschnitten und anschließend im Agarosegel aufgetrennt. Der Transfer der genomischen DNA auf eine Nitrocellulosemembran erfolgte nach SAMBROOK et al. (1989). Die auf Nitrocellulosemembran (0,45 µm; Schleicher & Schuell, Dassel) transferierte DNA wurde mit Hilfe eines UV-Ofens (Spectronics Corporation) durch UV-Licht der Wellenlänge 254 nm (120 mJ × cm²) kovalent auf der Membran fixiert.

2.4.16 Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden

Die Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden erfolgte nach dem „Ready-To-Go DNA Labelling Beads (-dCTP)“-Kit (Amersham Pharmacia, Freiburg) gemäss den Angaben des Herstellers, wobei [α^{32}P]-dCTP (3000 Ci/mmol; NEN DuPont, Bad Homburg) als radioaktiv markiertes Nukleotid eingesetzt wurde.

2.4.17 Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden

Zur Hybridisierung mit radioaktiv markierten DNA-Sonden wurden die Membranen mit fixierter RNA bzw. DNA zur Absättigung unbesetzter Membranbindungsstellen zuvor 30 min bei 42°C mit Hybridisierungspuffermedium (CHURCH et al., 1984) vorhybridisiert. Die radioaktiv markierten DNA-Sonden wurden für 10 min bei 95°C denaturiert, anschließend 5 min auf Eis gekühlt und zum Vorhybridisierungsansatz gegeben. Die Hybridisierung erfolgte bei 50-60°C über Nacht im Hybridisierungsofen OV1 (Biometra, Göttingen). Um die unspezifisch gebundene DNA zu entfernen, wurden die Membranen mit Waschpuffermedium A (40 mM $NaHPO_4$; pH 7,2; 1 mM EDTA; 5 % (w/v) SDS) gewaschen und 30 min bei der Hybridisierungstemperatur inkubiert. Abschließend wurden die Membranen für fünf Minuten mit Waschpuffermedium B (40 mM $NaHPO_4$; pH 7,2; 1 mM EDTA; 1 % (w/v) SDS) gewaschen. Nach Trocknen der Membranen wurden diese mit einem Röntgenfilm (Kodak X-OMAT/XAR-5, Sigma-Aldrich, Deisenhofen) in lichtdichten Expositions-kassetten (Amersham Pharmacia, Freiburg) mit Reflektorschirm („intensifying screen“, NEN DuPont,

Bad Homburg) bei –70°C exponiert. Die Autoradiogramme wurden entsprechend der Strahlungsintensität der Membranen nach 1-7 Tagen entwickelt.

Um die Nylonmembranen für weitere Hybridisierungen mit anderen DNA-Sonden zugänglich zu machen, wurden die gebundenen Sonden von den Membranen entfernt. Dazu wurden die Membranen für eine Stunde in „Strip"-Puffermedium (0,3 M Natriumcitrat; pH 7,0; 3 M NaCl; 10 % (w/v) SDS) inkubiert, der zuvor aufgekocht wurde. Die Membranen mit den fixierten Nukleinsäuren konnten für erneute Hybridisierungen wiederverwendet werden.

2.5. Identifizierung von homologen DNA-Sequenzen mittels Computer-gestützter Analysen von Sequenzdatenbanken

Mittels Computer-gestützter Analysen wurden die Genom- und EST-Projekte von Pro- bzw. Eukaryoten nach homologen DNA-Sequenzen durchsucht, die im Internet über Sequenzdatenbanken öffentlich zugänglich sind. Es wurden im Internet die Sequenzinformationen folgender Datenbanken analysiert: European Molecular Biology Laboratory (EMBL, http://www.ebi.ac.uk/embl), The Institute of Genomic Research (TIGR; http://www.tigr.org), die National Center for Biotechnology Information (NCBI; http://www.ncbi.nlm.nih.gov) und Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG; http://www.genome.ad.jp/kegg).

Die in den Tabellen aufgelisteten Organismen sind untersucht worden, deren Genome derzeit oder vollständig sequenziert worden sind (Tab. 2.7, 2.8 und 2.9). Die EST-Datenbanken (expressed sequence tag) eukaryotischer Organsimen wurden ebenfalls im Internet analysiert. Die öffentlich zugänglichen EST-Projekte von den verschiedenen Organismen sind hier aufgrund der großen Anzahl nicht aufgelistet.

Tab. 2.7: Genom-Projekte von Vertretern der Archaebakterien

Organismus	syst. Einteilung	Referenz
Archaeoglobus fulgidus	Euryarchaeata	KLENCK et al., 1997
Methanobacterium thermoautotrophicum	Euryarchaeata	SMITH et al., 1997
Methanococcus jannaschii	Euryarchaeata	BULT et al., 1996

Tab. 2.8: Genom-Projekte von Vertretern der Eubakterien

Organismus	syst. Einteilung	Referenz
Agrobacterium tumefaciens *	α-Proteobakteria	unveröffentlicht
Aquifex aeolicus	Aquificalles	DECKERT et al., 1998
Bacillus substilus	Gram-pos.Bakterien	KUNST et al., 1997
Bdellovibrio bacteriovorus *	δ-Proteobakteria	unveröffentlicht
Borrelia burgdorfei	Spirochaete	FRASER et al., 1997
Buchnera sp.	γ-Proteobakteria	SHIGENOBU et al., 2000
Frankia alni *	Firmicutes	unveröffentlicht
Gloeobacter violaceus *	Cyanobakterien	unveröffentlicht
Helicobacter pylori 26695	ε-Proteobakterien	TOMB et al., 1997
Holospora obtusa **	α-Proteobakterien	unveröffentlicht
Legionella pneumophila *	γ-Proteobakterien	unveröffentlicht
Mycobacterium tuberculosis	Gram-pos.Bakterien	COLE et al., 1998
Mycoplasma pneumoniae	Gram-pos.Bakterien	HIMMELREICH et al., 1996
Neisseria meningitidis	α-Proteobakterien	TETTLIN et al., 2000
Nostoc punctiforne *	Cyanobakterien	unveröffentlicht
Pseudomonas aeruginosa	γ-Proteobakterien	STOVER et al., 2000
Rhodobacter capsulatus *	α-Proteobakterien	unveröffentlicht
Sinorhizobium meliloti *	α-Proteobakterien	unveröffentlicht
Synechocystis sp. PCC6803	α-Proteobakterien	KANEKO et al., 1996
Xyella fastidiosa	γ-Proteobakterien	SIMPSON et al., 2000

* Das Genom wird derzeit sequenziert und ist daher noch nicht vollständig abgeschlossen. Es sind bislang nur Teilsequenzen in den Datenbanken öffentlich zugänglich.

** Das Holospora-Genom-Projekt ist über keine Datenbank veröffentlicht. Die Sequenzinformationen wurden durch die Kooperation mit Dr. Lang (University of Montreal) zur Verfügung gestellt.

Tab. 2.9: Genom-Projekte von Vertretern der Eukaryoten

Organismus	syst. Einteilung	Referenz
Aspergillus nidulans	Fungi	ZHU et al., 2001
Caenorhabditis elegans *	Nematodae	unveröffentlicht
Entamoeba histolytica *	Entamoebidae	unveröffentlicht
Gardia lambdia	Diplomonadidae	MCARTHUR et al., 2000
Leishmanaia major Chromosom I *	Kinetoplastidae	MYLER et al., 1999
Plasmodium falciparum Chromosom I, II *	Apicomplexae	GARDNER et al., 1998 BOWMAN e al., 1999
Saccharomyces cerevisiae	Fungi	GOFFEAU ET AL., 1996
Trypanosoma brucei *	Kinetoplastidae	unveröffentlicht

* Das Genom wird derzeit sequenziert und ist daher noch nicht vollständig abgeschlossen. Es sind bislang nur Teilsequenzen in den Datenbanken öffentlich zugänglich.

2.6 Heterologe Expression und biochemische Analyse rekombinanter Proteine

2.6.1 Heterologe Expression von rekombinanten Proteinen in E.coli

Der E.coli-Stamm BL21 (DE3) pLysS stellt in Verbindung mit pET-Plasmidvektoren (Novagen, Heidelberg) insbesondere für die Expression von Membranproteinen ein geeignetes bakterielles Expressionssystem dar (MIROUX & WALKER, 1996). Die heterologe Expression erfolgte nach dem „pET-Expression-System"-Protokoll gemäss den Angaben des Herstellers (Novagen, Heidelberg), wobei der Expressionsvektor pET16b verwendet wurde.

Die cDNA bzw. genomische DNA, die für verschiedene nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporter kodieren, wurde „in frame" (im Leseraster) hinter eine DNA-Sequenz des Expressionsvektors pET16b kloniert, so dass sich nach Expression der Fremd-DNA am N-terminalen Ende ein zusätzlicher Histidin-„Tag" (10 Histidine) befand.

2.6.2 Radioaktive Markierung heterolog exprimierter Proteine mit [^{35}S]-Methionin ([^{35}S]-Methionin-Assay)

Da der Nachweis heterolog exprimierter Membranproteine wegen des geringen Expressionsniveaus oftmals nicht direkt auf einem SDS-Gel durch Coomassie-Färbung möglich ist, stellt eine radioaktive Markierung mit [^{35}S]-Methionin während der Proteinsynthese aufgrund der hohen Sensitivität eine

hilfreiche Alternative dar. Ein solcher [^{35}S]-Methionin-Assay wurde nach dem Protokoll TJADEN et al. (1998a) durchgeführt, wobei als radioaktiv markierte Aminosäure [^{35}S]-Methionin (5 mCi/mmol; NEN DuPont, Bad Homburg) eingesetzt wurde.

Anschließend erfolgte eine Anreicherung von Membranproteinen aus E.coli. Hierzu wurden die Bakterienzellen durch Zentrifugation (5 min, 5000 g, 4°C) sedimentiert und in Aufschlußpuffermedium (10 mM Tris; pH 7,5; 1 mM EDTA; 15 mM (v/v) Glycerin; 1 mM PMSF) resuspendiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte mittels einer Ultraschallbehandlung (Ultraschallstab Branson Sonifier 250, Branson Ultrasonic S.A., Carouge-Genève, Schweiz). Nach einer Zentrifugation (10 min, 14000 g, 4°C) wurden die Membranen im Überstand angereichert. Diese wurden schließlich in einer Ultrazentrifuge OTD Combi (Sorvall, Bad Homburg) für 45 min bei 100000 g sedimentiert und in Puffermedium A (300 mM NaCl; 100 mM NaH_2PO_4; 10 mM Imidazol; 8 mM Glycerin) mit 0,1 % (w/v) Dodecylmaltosid (Sigma-Aldrich, Deisenhofen) solubilisiert. Durch eine erneute Ultrazentrifugation (45 min, 100000 g, 4°C) wurden die Membranproteine von den Membranen getrennt. Der membranproteinhaltige Überstand wurde nach einer Proteinbestimmung (Kapitel 2.3.1) in eine SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese eingesetzt (Kapitel 2.3.2).

2.6.3 Transportversuche an intakten E.coli-Zellen

Zur biochemischen Charakterisierung der rekombinanten Transportproteine wurden Aufnahmeversuche an intakten E.coli-Zellen durchgeführt, die die kodierenden DNA-Sequenzen exprimieren und das Membranprotein funktionell in die bakterielle Plasmamembran integrieren. Dazu wurde der E.coli-Stamm BL21 (DE3) pLsyS mit dem entsprechenden pET16b-Expressionskontrukt transformiert. Die Transportversuche erfolgten nach TJADEN et al. (1998a).

2.6.4 Efflux-Versuche mit [a ^{32}P]-Adenylat-vorbelandenen E.coli-Zellen

Um festzustellen, inwieweit der Transport von Adenylaten (ATP bzw. ADP) vom Gegentauschsubstrat abhängig ist, wurden sogenannte Efflux-Versuche („back-exchange“) durchgeführt (TJADEN et al., 1998a; TRENTMANN et al., 2000). Zur Identifizierung der exportierten, radioaktiv markierten Adenylate erfolgte eine Dünnschichtchromatographie mit Polyethylamin-Cellulose-DC-Platten (Merck, Darmstadt) nach MANGOLD (1967). Der Anteil der exportierten, radioaktiv markierten Adenylate konnte anschließend im Szintillationszähler quantifiziert werden.

2.7 Klonierung eines Plasmid-Kontrukts zur heterologen Expression in E.coli

Für die heterologe Expression des nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporters aus Holospora obstusa (NPTHo) im E.coli-Stamm BL21 (DE) pLysS wurde das Expressionskonstrukt pNL 8 aus dem Vektor pET16b und der kodierenden genomischen NPTHo-DNA konstruiert.

Die genomische DNA, die den kodierenden Bereich für das NPTHo-Protein enthält, besitzt ein Länge von 2,1 kb und wurde über die Restriktionsstellen Sal I und Kpn I in den Vektor pBSK

inseriert (pNL 5; Kapitel 2.4.2; Tab. 2.5). Diese Kontrukt wurde freundlicherweise von Dr. Lang (University of Montreal) zur Verfügung gestellt.

Zur Herstellung des Expressionskonstrukts pNL 8 wurde der kodierende Bereich des NPTHo-Proteins mittels PCR durch die Pfu-DNA-Polymerase amplifiziert (Kapitel 2.4.4.5). Als „Template" diente das Konstrukt pNL 5. Durch die Verwendung der PCR-Primer Holo-1 und Holo-2 (Kapitel 2.4.3; Tab. 2.5) wurde eine Nde I-Restriktionsschnittstelle über das Start-ATG bzw. eine Xho I-Restriktionsschnittstelle hinter dem Stoppkodon in das amplifizierte PCR-Produkt eingeführt. Nach Restriktionsverdau des erhaltenen PCR-Produktes mit Nde I und Xho I konnte die genomische DNA „in frame" in den mit Nde I und Xho I geöffneten pET16b-Vektor kloniert werden, so dass am N-terminalen Ende des exprimierten NPTHo-Proteins ein Histidin-„Tag" angefügt werden konnte (pNL 8).

3 Ergebnisse

Die Evolution plastidärer und eubakterieller Nukleotid-Transporter, die man aufgrund biochemischer und molekularer Eigenschaften zur Familie der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter zusammenfasst, ist noch völlig ungeklärt. Bislang konnte nur in den Plastiden höherer Pflanzen (Spermatophyta) und in obligat intrazellulären Endoparasiten ein solches Transportsystem nachgewiesen werden. Ziel dieser Doktorarbeit war es, weitere nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporter in den verschiedenen Pro- und Eukaryoten zu identifizieren und die mögliche evolutive Beziehung dieser Transporter innerhalb der jeweiligen Organismen zu analysieren. Dazu konnten bisher unbekannte homologe DNA-Sequenzen in eukaryotischen Algen sowie in weiteren intrazellulären Parasiten bzw. Symbionten isoliert werden. Zudem konnte ein bisher unbekannter Nukleotid-Transporter aus Holospora obtusa nach heterologer Expression in E.coli biochemisch charakterisiert werden.

3.1 Identifizierung von weiteren nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern

Die Identifizierung von weiteren nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern erfolgte mittels molekularbiologischer Techniken (Kapitel 3.1 - 3.1.2) und Computer-gestützten Analysen von Sequenzdatenbanken (Kapitel 3.1.3).

Aus einem Vergleich der Aminosäure-Abfolge (Alignment) der bisher bekannten nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern gehen hochkonservierte Motive hervor (WINKLER & NEUHAUS, 1999). Dazu zählen die Aminosäure-Motive AELWG (Aminosäuren 244 - 248 des AATP1At-Proteins), FANQIT (Aminosäuren 259 - 264 des AATP1At-Proteins), MAYIPLD (Aminosäuren 491 - 497 des AATP1At-Proteins) und GKSGGA (Aminosäuren 526 - 531 des AATP1At-Proteins). Gemäß dieser konservierten Bereiche der plastidären und eubakteriellen Nukleotid-Transporter wurden degenerierte Oligonukleotid-Primer (PFL 63 - 67) hergestellt (Kapitel 2.4.3). Mittels Taq-Polymerasekettenreaktion (PCR) konnten durch verschiedene Primer-kombinationen DNA-Abschnitte amplifiziert werden (Kapitel 2.4.4.5). Für die Analyse pro- und eukaryotischer Organismen wurde als „Template“ genomische DNA bzw. cDNA eingesetzt. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden in dem pGEM-T Easy-Vektor kloniert (Kapitel 2.4.2) und ansequenziert (Kapitel 2.4.5). In einigen Fällen wurden zusätzlich cDNA-Banken analysiert, um die vollständige kodierende cDNA-Sequenz zu identifizieren (Kapitel 2.4.11).

Darüber hinaus erfolgte die Identifizierung weiterer homologer DNA-Sequenzen mittels Computer-gestützten Analysen von Sequenzdatenbanken, in denen die Genom- oder cDNA-Sequenzen verschiedener Organismen aus dem Internet verwendet wurde (siehe die Liste der verwendeten Sequenzdatenbanken in Kapitel 2.5).

Die erhaltenen Sequenzen der identifizierten Nukleotid-Transporter wurden zusammen mit den bisher bekannten Transportproteinen mit Hilfe von geeigneten Computer-Programmen analysiert (Kapitel 2.4.6). Dabei konnte aus den Sequenz-Vergleichen (Multiple Alignment) ein phylogenetischer Stammbaum für diese Transporter-Familie konstruiert werden. Außerdem konnten für die nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter konservierte Sequenzmotive dargestellt werden, die überraschenderweise ebenfalls bei den mitochondrialen Transportern der „Mitochondrial Carrier Familiy“ (MCF) wiederzufinden sind. Weitere Analysen wurden mit der Sequenz des nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporters aus Holospora obtusa (NPTHo) durchgeführt. So konnte anhand einer Hydropathieanalyse ein 12-Transmembranhelix-Modell für dieses Transportprotein erstellt werden.

3.1.1 Identifizierung von homologen DNA-Sequenzen in eukaryotischen Algen mittels PCR

Zur Identifizierung nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter in eukaryotischen Algen wurde zunächst aus den Algen Cyanophora paradoxa und Chlamydomonas reinhardtii (Kapitel 2.2) direkt Poly-(A^+)-mRNA isoliert (Kapitel 2.4.9), die mittels Reverser Transkription in einzelsträngige cDNA (complementary oder copy DNA) umgeschrieben wurde (Kapitel 2.4.10). Im Fall der Kieselalge Odontella sinensis wurde Gesamt-RNA, die von Dr. P. Kroth (Universität Düsseldorf) freundlicherweise bereitgestellt wurde, für eine Poly-(A^+)-mRNA-Isolierung und eine anschließende RT-PCR eingesetzt. Mit den degenerierten Oligonukleotiden PFL 64 und PFL 66 konnte aus den Algen jeweils ein 800 bp großes cDNA-Fragment isoliert werden (pNL 1-3; Kapitel 2.4.2, Tab. 2.4). Die Sequenzanalyse ergab, dass es sich bei diesen cDNA-Teilsequenzen vermutlich um bisher unbekannte nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporter eukaryotischer Algen handelt (siehe Anhang; Kapitel 7.2).

3.1.2 Identifizierung von homologen DNA-Sequenzen in Prokaryoten mittels PCR

In Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. M. Wagner (Technische Universität München) gelang es, aus vier verschiedenen Endosymbionten des Protisten Acanthamoebea spp. DNA-Teilsequenzen zu isolieren, die zu den nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern homolog sind. Dazu wurde die genomische DNA von diesen nicht-kultivierbaren Symbionten TUME1, HN3, ET39 und C36 isoliert und für anschließende PCR mit den degenerierten Oligonukleotiden PFL 63-PFL 67 eingesetzt. Die erhaltenen DNA-Fragmente wurden schließlich kloniert und sequenziert.

Ebenfalls konnte im Genom des intrazellulären Eubakteriums Caedibacter caryophila, die freundlicherweise von Dr. J. Kusch (Universität Kaiserslautern) zur Verfügung gestellt wurde, ein DNA-Abschnitt mit den Primern PFL 63 und PFL 66 amplifiziert und kloniert werden (pNL 4; Kapitel 2.4.2; Tab. 2.4). Die Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenz der 800 bp großen DNA-Teilsequenz ist zu denen der bisher identifizierten nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern außerordentlich ähnlich.

Des Weiteren wurde in einem phytopathogenen Endoparasiten der Papaya-Früchte (papaya bunchy top bacterium, Pbtb), eine zu den nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern homologe DNA-Sequenz mittels degenerierten Primern nachgewiesen (in Kooperation mit Prof. H. H. Winkler, University of South Alabama, und Prof. D. Davis, University of Florida; DAVIS et al., 1998).

3.1.3 Identifizierung von homologen DNA-Sequenzen mittels Computer-gestützter Analysen von Sequenzdatenbanken

Im Hinblick auf eine mögliche Identifizierung weiterer Nukleotid-Transporter wurden mittels Computer-gestützter Analysen die im Internet veröffentlichten Genom- bzw. cDNA-Sequenzen ausgewählter Organismen verfolgt (Kapitel 2.5). Um ein weites Spektrum der Organsimenreiche abzudecken, wurden aus evolutiver Sicht interessante Vertreter innerhalb der Archaea, Eubakteria sowie Eukarya ausgesucht.

Die Recherchen veschiedener Genom-Projekte im Internet ergaben, dass in den Genomen der aufgelisteten Organismen keine weiteren, bisher unbekannten nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter identifiziert werden konnten (Kaptiel 2.5; Tab. 2.7 - 2.9).

In Kooperation mit Dr. F. Lang (Univesity of Montreal) wurde durch die Genomsequenzierung des Eubakteriums Holospora obtusa eine DNA-Sequenz entdeckt (NPTHo), deren abgeleitete Proteinsequenz zu den nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern eine signifikante Ähnlichkeit aufweist. Diese vollständig kodierende Nukleotidsequenz wurde freundlicherweise von Dr. Lang zur Verfügung gestellt und konnte in einen geeigneten Vektor kloniert werden (pNL 5; Kapitel 2.4.2; Tab. 2.4).

Durch eine Computer-gestütze Analyse der EST-Projekte (expressed sequence tag) konnten in weiteren Vertretern höherer Pflanzen, aber auch in niederen Pflanzen (Algen), cDNA-Teilsequenzen identifiziert werden, deren abgeleitete Aminosäuresequenzen für einen plastidären ATP/ADP-Transporter kodieren. In der Tabelle 3.1 sind die pflanzlichen Organismen aufgelistet, in deren EST-Projekte homologe DNA-Sequenzen entdeckt wurden. Unter der „Accession"-Nummer ist die jeweilige cDNA-Sequenz der EST-Klone in der EMBL-Datenbank (European Molecular Biology Laboratory, Heidelberg), unter der Internetadresse http://www.ebi.ac.uk/embl, abgelegt.

Tab. 3.1: Identifizierung homologer EST-cDNA-Sequenzen

Organismus	syst. Einteilung	EMBL-Accession-Nr.
Dunaliella salina	Chlorophyta	BG264105
Hordeum vulgare (Gerste)	Spermatophyta (Poaceae)	BG343269
Lotus japonicus (Hornklee)	Spermatophyta (Fabaceae)	AW720186; AV425290

Organismus	syst. Einteilung	EMBL-Accession-Nr.
Lycopersicon esculentum (Tomate)	Spermatophyta (Solanaceae)	BE459811; AW931058; AW092822
Medicago truncatula (Hopfenklee)	Spermatophyta (Fabaceae)	BG454651; BG456211; BG 634429
Mentha piperita (Pfefferminze)	Spermatophyta (Laminaceae)	AW255797; AW255224
Mesembryanthemum crystallinum	Spermatophyta (Aizoaceae)	BG269363
Oryza sativa (Reis)	Spermatophyta (Poaceae)	AU057209
Porphyra yezoensis	Rhodophyta	AV430292
Soja hispida (Sojabohne)	Spermatophyta (Fabaceae)	BE574942
Sorghum bicolor (Mohrenhirse)	Spermatophyta (Poaceae)	H55010
Triticum aestivum (Weizen)	Spermatophyta (Poaceae)	BF482730

3.1.4 Analyse von Phagen-cDNA-Banken

Um die vollständige kodierende DNA-Sequenz für die nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter aus Chlamydomonas reinhardtii, Odontella sinensis und Cyanophora paradoxa zu erhalten, wurden entsprechende Phagen-cDNA-Banken analysiert (Kapitel 2.4.11). Das Durchsuchen („screenen“) der Algen-cDNA-Banken erfolgte mit einer homologen Sonde. Für die Herstellung der radioaktiv markierten Sonde wurde als DNA-„Template“ die jeweiligen 800 bp große DNA-Fragmente eingesetzt (Kapitel 2.4.16 und 2.4.17), die mittels degenerierter Primer isoliert werden konnten (Kapitel 2.4.3; Tab. 2.5).

Bei der Chlamydomonas-cDNA-Bank handelt es sich um eine λ1149-cDNA-Bank, die freundlicherweise von Dr. Goldschmidt-Clermont (Universität Genf) bereitgestellt wurde. Die zur Synthese der cDNA verwendete mRNA stammt aus einer Chlamydomonas-reinhardtii-Kultur eines Wildtyp-Stammes, die photoautotroph im Dauerlicht angezogen wurde. In dieser Bank sind die cDNA-Moleküle über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und NotI in das Genom des Lambda-1149-Phagen inseriert (AMATI et al., 1988). Von den bei der Analyse der Chlamydomonas-cDNA-Bank erhaltenen „positiven“ Phagen konnten genomische DNA-Fragmente isoliert werden (Kapitel 2.4.13). Die in dem λ-Genom inserierten cDNA-Moleküle wurden anschließend mit den Primern λ1149-Left und λ1149-Right amplifiziert (Tab. 2.5) und in den pGEM-T Easy-Vektor kloniert (pNL 6; Tab. 2.4). Bei der Sequenzanalyse konnte ein cDNA-Klon mit einer Länge von 1,7 kb identifiziert werden, deren Sequenz für einen putativen plastidären ATP/ADP-Transporter aus Chlamydomonas reinhardtii kodiert, bei dem jedoch aufgrund der fehlenden Sequenzinformation das N-terminale Ende unbekannt ist.

Die von Dr. P. Kroth (Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellte Odontella-cDNA-Bank ist ebenfalls eine Phagen-Bank. Für die cDNA-Herstellung dieser λZAP II-cDNA-Bank wurde die RNA aus photoautotroph angezogenen Odontella-sinensis-Zellen isoliert. Die cDNA-Moleküle wurden ins Lambda-Genom über EcoRI- und NotI-Restriktionsschnittstellen kloniert (PANCIC et al., 1993). Nach „In-vivo"-Exzision (Kapitel 2.4.12) und Sequenzierung konnte ein 1,6 kb großer cDNA-Klon isoliert werden, aus dessen abgeleiteter Aminosäuresequenz sich ein putativer nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter aus Odontella sinensis, mit einem verkürzten 5`-Ende, ergab (pNL 7; Tab. 2.4).

Die Analyse einer λZAP II-cDNA-Bank aus Cyanophora paradoxa, die von Prof. W. Löffelhardt (Universität Wien) freundlicherweise bereitgestellt wurde, konnte kein entsprechender homologer cDNA-Klon für einen nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter aus Cyanophora paradoxa isoliert werden (JAKOWITSCH et al., 1993).

3.1.5 DNA-Sequenzanalyse

Die in dieser Doktorarbeit identifizierten DNA-Sequenzen aus Pro- und Eukaryoten wurden sequenziert und analysiert. Bei allen zu untersuchenden DNA-Sequenzen ergab die Sequenzanalyse, dass es sich um putative nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporter handelt. Die Nukleotid- und deren abgeleitete Aminosäuresequenz dieser Transportproteine wird im Anhang (Kapitel 7.1 und 7.2) für die jeweiligen Organismen im Detail beschrieben. Bei den meisten homologen Sequenzen handelt es sich um Teilsequenzen. Aufgrund der unvollständigen Sequenzinformation ist bei einigen Organismen der N- bzw. C-Terminus des jeweiligen Transportproteins unbekannt.

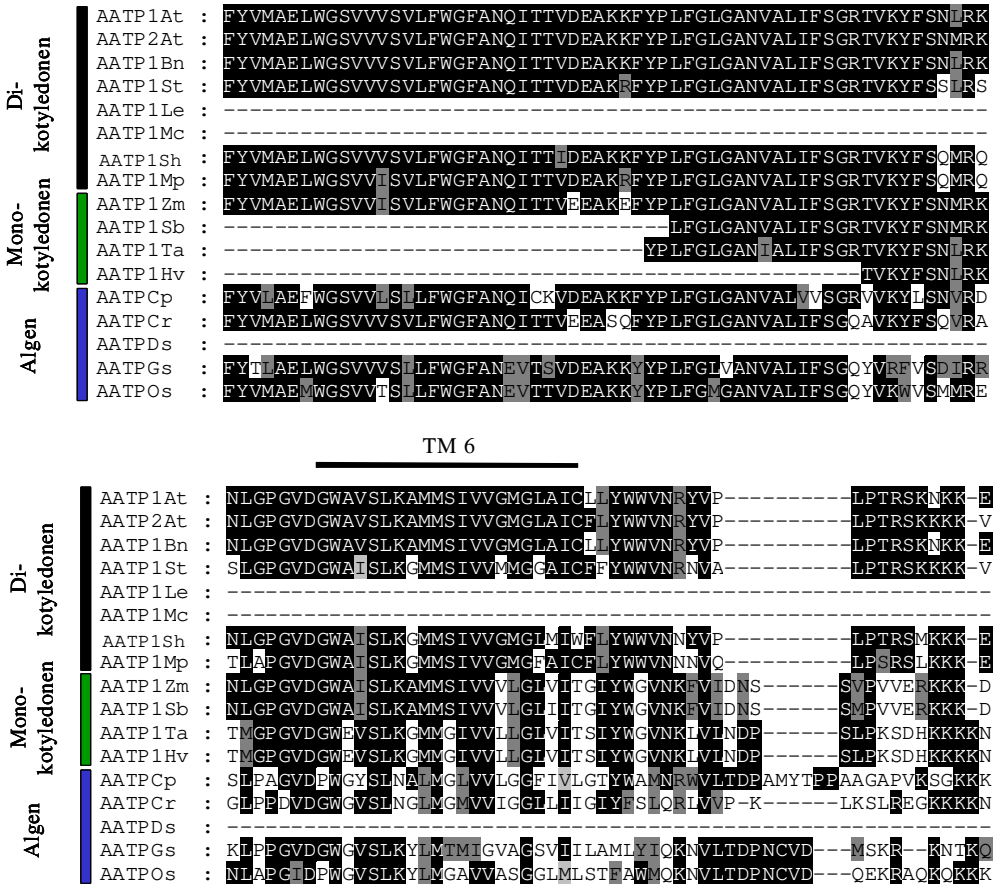
3.1.6 Vergleich von verschiedenen Proteinsequenzen („Multiple Alignment")

Die Anordnung von mehreren miteinander verwandten Proteinsequenzen liefert Informationen über die Aminosäureverteilungen an einzelnen Positionen. Aus einem solchen multiplen Aminosäure-Alignment lassen sich konservierte Sequenzmotive innerhalb der Proteinfamilie einer Funktionsklasse identifzieren. Durch die Ermittlung der Anzahl identischer und ähnlicher Sequenzpositionen im Alignment kann der Verwandschaftsgrad der miteinander verglichenen Proteine bestimmt werden. Die Werte für die Identität bzw. Ähnlichkeit sind bezogen auf die Alignmentlänge in Prozent angegeben. Für die Bewertung der Ähnlichkeiten gibt es unterschiedliche empirische Ansätze (Matrix). Dabei wird die Ähnlichkeit zwischen Aminosäuren durch die Wahrscheinlichkeit bestimmt, mit der die Aminosäure i in einem verwandten Protein durch die Aminosäure j ersetzt werden kann, ohne dass sich die biologische Funktion des Proteins mutmaßlich ändert.

Die Herstellung eines multiplen Sequenzalignments zwischen den bisher bekannten nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern und den im Rahmen dieser Doktorarbeit identifizierten homologen Proteinen erfolgte mit den Programmen CLUSTAL W und GENEDOC (Kapitel 2.4.5).

Die Quantifizierung der Ähnlichkeiten erfolgte nach der BLOSUM-62-Matrix. Die Proteinsequenzen der plastidären und bakteriellen Transporter sind unter den jeweiligen „Accession"-Nummern in der EMBL-Datenbank zugänglich (Kapitel 7.3; Tab.7.3). Von den neuen bisher unbekannten Transportproteinen sind die Sequenzinformationen im Kapitel 7.1 und 7.2 aufgeführt.

In der Abbildung 3.1 ist das Protein-Alignment der plastidären ATP/ADP-Transporter aus niederen und höheren Pflanzen dargestellt. Da von einigen Transportproteinen nur Teilsequenzen bekannt sind, wurde der Vergleich der Aminosäuresequenzen auf den kodierenden Bereich des AATP1At-Proteins von der Aminosäureposition 240 bis zur Aminosäureposition 570 beschränkt. Betrachtet man dieses Teil-Alignment der plastidären Transporter, so geht hervor, dass die Aminosäuren innerhalb des ausgewählten, internen Protein-Bereichs sehr konserviert sind. Lediglich die homologen Transporter der Algen weisen leichte Sequenz-Abweichungen auf. Darüber hinaus besitzen die ATP/ADP-Transporter der Algen sowie die der monokotylen Pflanzen durch einen Aminosäure-Einschub einen größeren hydrophilen Loop zwischen der 6. und 7. Transmembranhelix im Vergleich zu den Vertretern der dicotyledonen Pflanzen. Innerhalb des „Loop"-Bereichs sind die Aminosäuren der plastidären Transporter weniger konserviert. Aus dem Anteil ähnlicher bzw. identischer Aminosäuren (Tab. 7.4) ergibt sich, dass die plastidären Transporter höherer Pflanzen tendentiell größere Ähnlichkeiten zueinander als zu den Vertretern der niederen Pflanzen aufweisen.



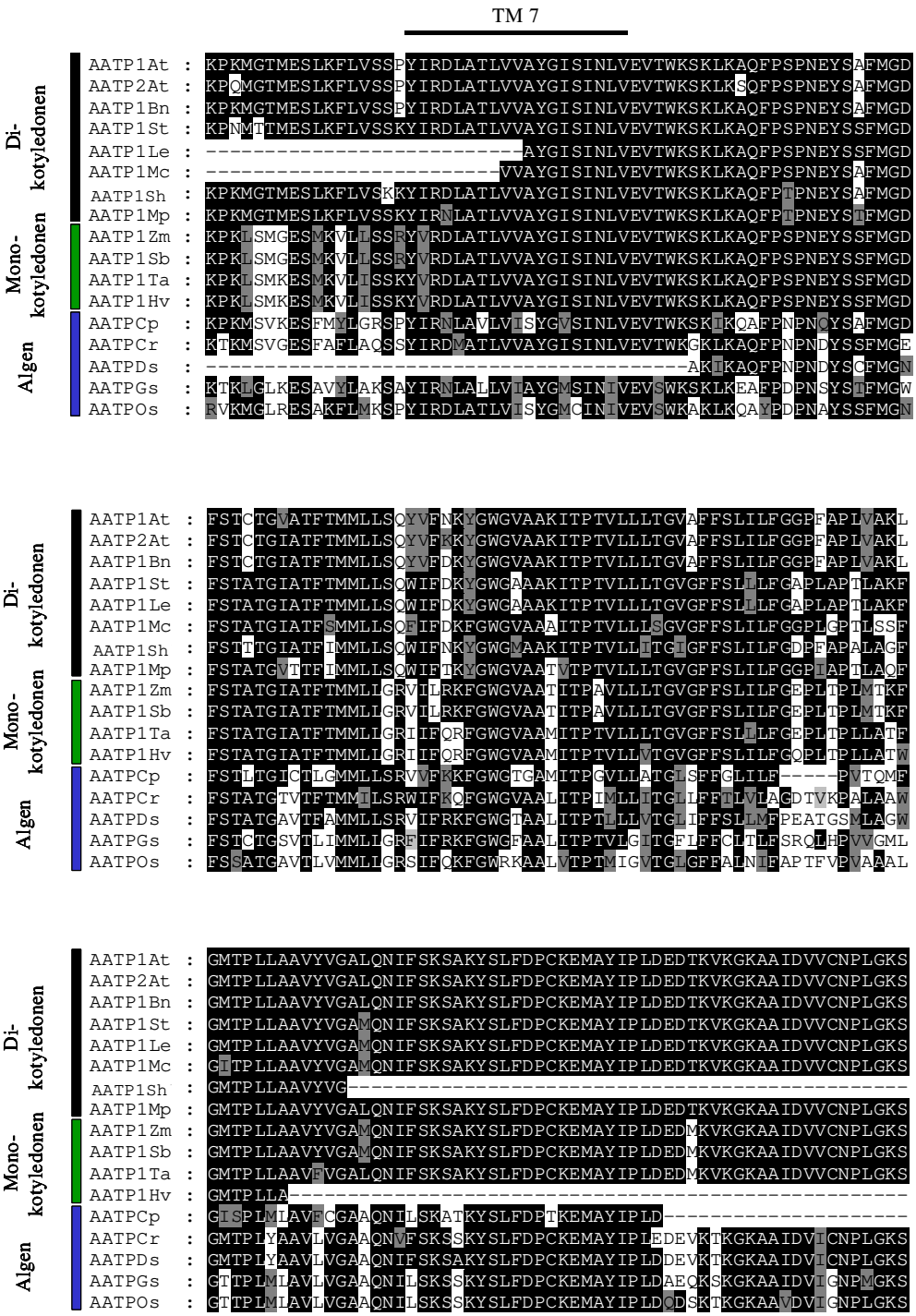
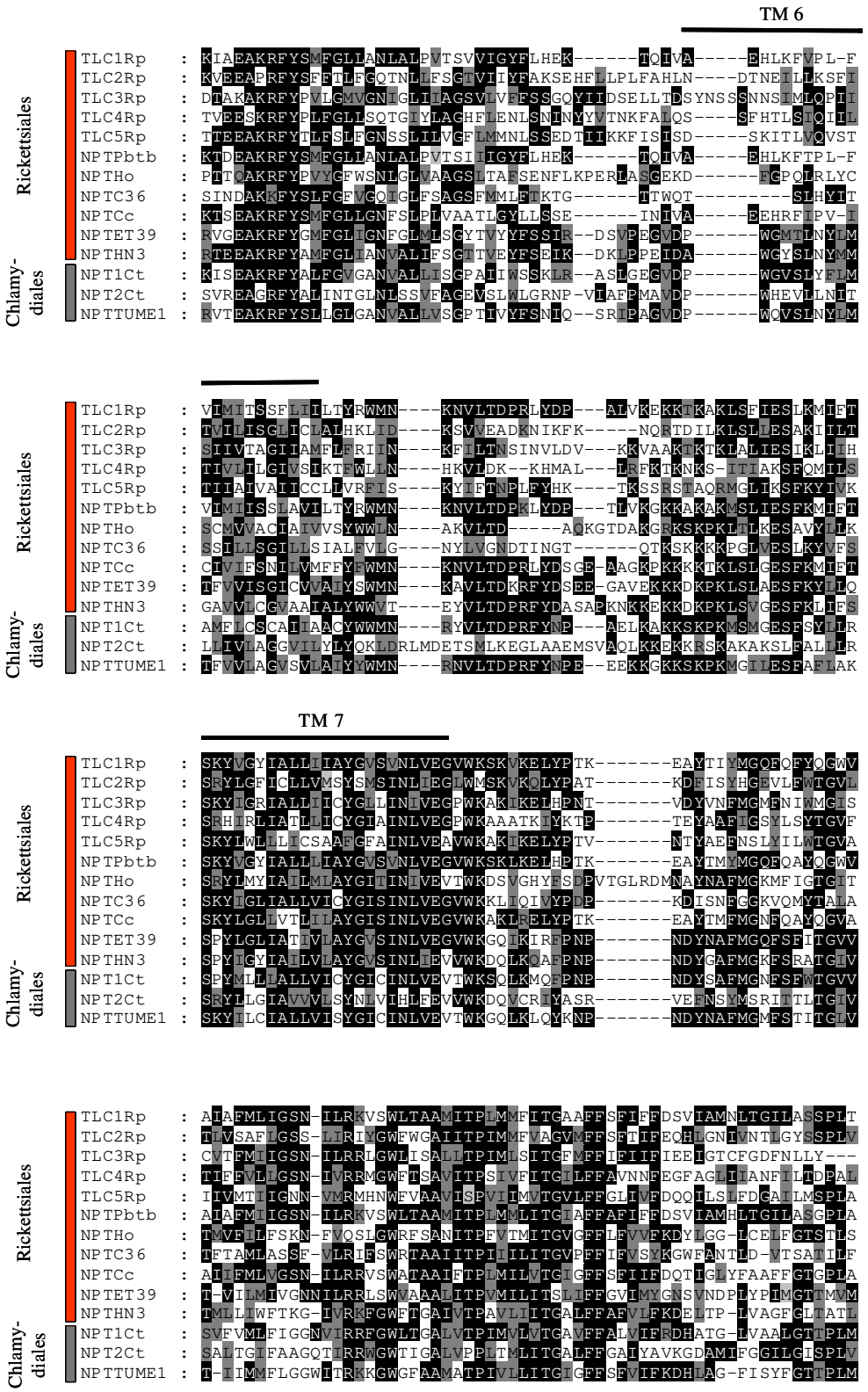

TM 7
Di-kotyledonen
Mono-kotyledonen
Algen
AATP1At
AATP2At
AATP1Bn
AATP1St
AATP1Le
AATP1Mc
AATP1Sh
AATP1Mp
AATP1Zm
AATP1Sb
AATP1Ta
AATP1Hv
AATPCp
AATPCr
AATPDs
AATPGs
AATPOs

Abb. 3.1: Protein-Alignment plastidärer ATP/ADP-Transporter aus niederen und höheren Pflanzen. Der multiple Aminosäurevergleich basiert auf den kodierenden Bereich des AATP1At-Proteins von Aminosäureposition 240 bis Aminosäureposition 570. Identische Aminosäuren sind durch schwarze Boxen, ähnliche Aminosäuren durch graue Boxen gekennzeichnet. Die jeweilige Bezeichnung der verschiedenen Transporter ist links dargestellt. Der putative Bereich für die 6. und 7. Transmembranhelix sowie die hochkonservierten Domänen sind durch Balken gekennzeichnet. Mit den schwarzen und grünen Balken sind die Transportproteine der Di- bzw. Monokotyledonen zusammengefasst. Die Transporter der eukaryotischen Algen sind mit einem blauen Balken gekennzeichnet. AATP, ATP/ADP-Transportprotein; At, Arabidopsis thaliana; Bn, Brassica napus; St, Solanum tuberosum; Le, Lycopersicon esculentum; Mc, Mesembryanthemum crystallinum; Sh, Soja hispida; Mp, Medicago truncatula; Zm, Zea mays; Sb, Sorghum bicolor; Ta, Triticum aestivum; Hv, Hordeum vulgare; Cp, Cyanophora paradoxa; Cr, Chlamydomonas reinhardtii; Ds, Dunadiella salina; Gs, Galdieria sulphuraria; Os, Odontella sinensis.

Bei dem multiplen Protein-Alignment der bakteriellen Nukleotid-Transporter wurden ebenfalls die Transportproteine aufgrund der unvollständigen Sequenzinformationen über einen gemeinsamen Aminosäurebereich miteinander verglichen, der dem kodierenden Bereich des nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporters aus Rickettsia prowazekii (TLC1Rp) von der Aminosäure 175 bis zur Aminosäure 415 entspricht (Abb. 3.2). Aus diesem Aminosäure-Vergleich geht hervor, dass die eubakteriellen Nukleotid-Transporter untereinander geringere Übereinstimmungen aufweisen als die pflanzlichen Homologen zueinander. Innerhalb der Eubakterien haben die nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportproteine eine größere Variabilität erfahren und stellen eine heterogene Gruppe dar, was sich auch in den Zahlen für die Ähnlichkeit- bzw. Identitätswerte wiederspiegelt (Tab. 7.5).


TM 6
TM 7
Rickettsiales
Chlamy-diales
TLC1Rp
TLC2Rp
TLC3Rp
TLC4Rp
TLC5Rp
NPTPbtb
NPTHo
NPTC36
NPTCc
NPTET39
NPTHN3
NPT1Ct
NPT2Ct
NPTTUME1

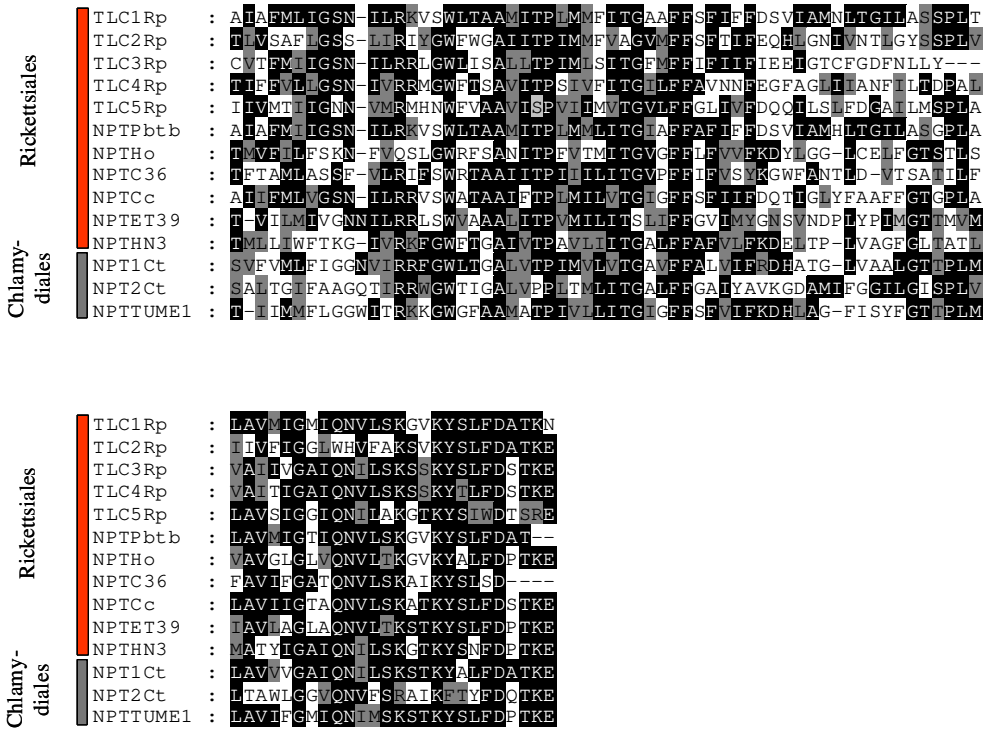
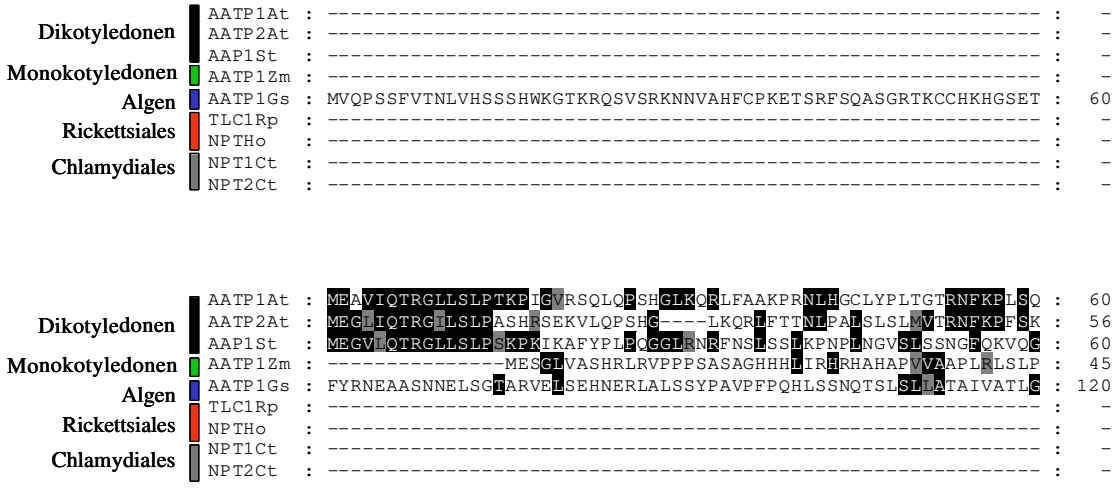


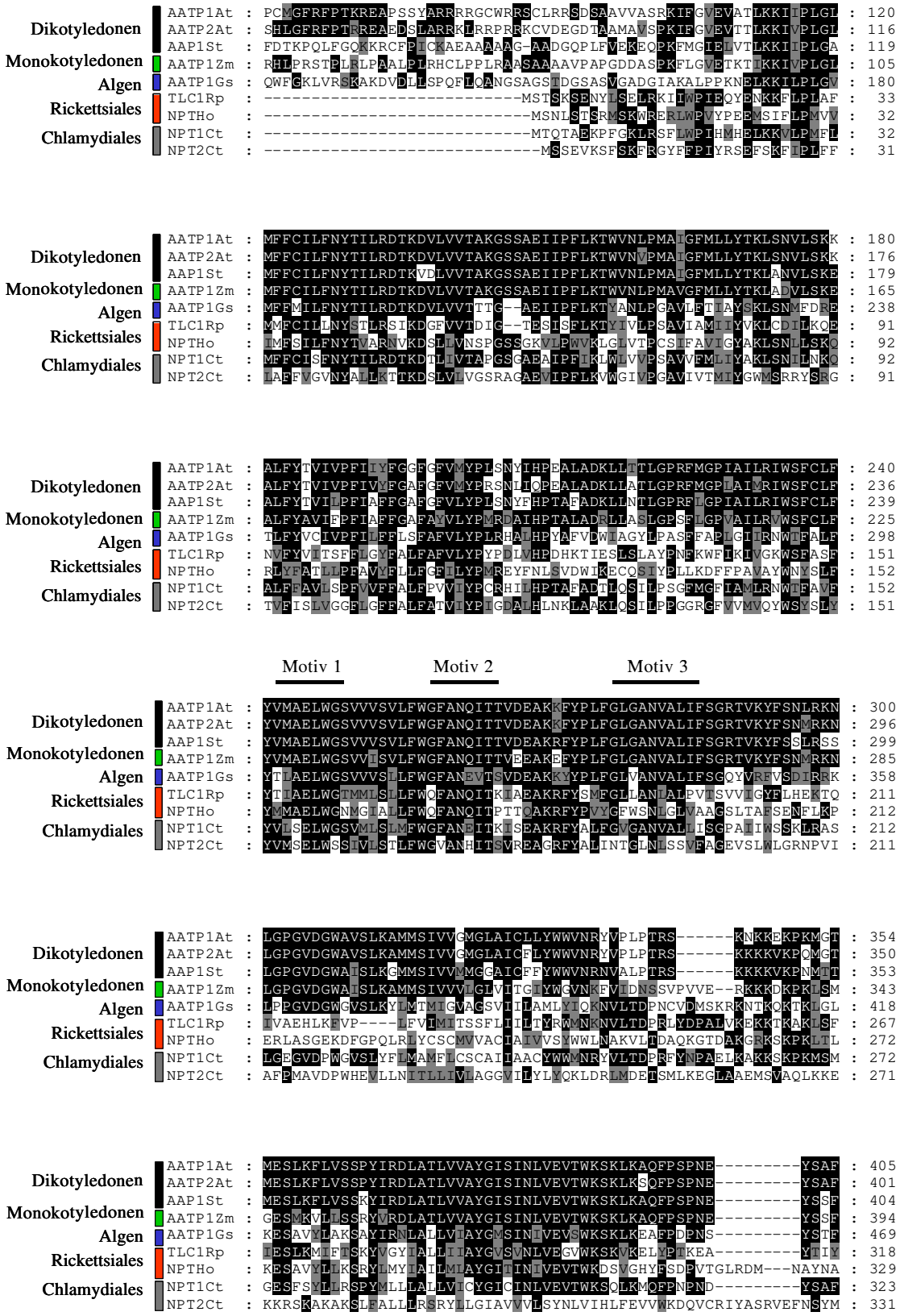
Abb. 3.2: Protein-Alignment nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter aus Eubakterien. Der multiple Aminosäurevergleich basiert auf den kodierenden Bereich des TLC1Rp-Proteins von Aminosäureposition 175 bis Aminosäureposition 415. Identische Aminosäuren sind durch schwarze Boxen, ähnliche Aminosäuren durch graue Boxen gekennzeichnet. Die jeweiligen Bezeichnung der verschiedenen Transporter ist links dargestellt, wobei die der α-Proteobakterien mit einem roten Balken zusammengefasst sind. Die chlamydialen Transporter sind mit einem grauem Balken gekennzeichnet. NPT, Nukleosidtriphosphat-Transporter; Rp, Rickettsia prowazekii; Pbtb, Rickettsia-verwandter Endoparasit der Papaya („Papaya bunchy top bacterium"); Ho, Holospora obtusa; C36, Rickettsia-verwandter Endosymbiont; Cc, Caedibacter caryophila; ET39, Caedibacter-verwandter Endosymbiont; HN3, Caedibacter-verwandter Endosymbiont; Ct, Chlamydia trachomatis; TUME1, Chlamydia-verwandter Endosymbiont.

Die Abbildung 3.3 zeigt einen Aminosäurevergleich der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter aus den Pflanzen und Eubakterien, von denen die vollständig kodierende Proteinsequenz bekannt ist. Betrachtet man dieses Alignment, so fällt die große Ähnlichkeit der plastidären ATP/ADP-Transporter und der bakteriellen Homologen auf, die sich recht gleichmäßig über den gesamten Sequenzbereich erstreckt. So lassen sich fünf hochkonservierte Domänen erkennen: AELWG (Aminosäuren 244 - 248 des AATP1At-Proteins), FANQIT (Aminosäuren 259 - 264 des

AATP1At-Proteins), GLGANVALIF (Aminosäuren 277 - 286 des AATP1At-Proteins), MAYIPLD (Aminosäuren 491 - 497 des AATP1At-Proteins) und GKSGGA (Aminosäuren 526 - 531 des AATP1At-Proteins). Dagegen findet man starke Abweichungen in den Aminosäuresequenzen vor allem im Bereich des hydrophilen „Loops“ zwischen der Transmembranhelix 6 und 7 (Aminosäuren 239 - 290 des AATP1At-Proteins) sowie des N- bzw. C-Terminus. Zudem unterscheiden sich die pflanzlichen Proteinsequenzen durch den Besitz von N-terminalen Transitpeptiden von den bakteriellen Transporter. Die Bereiche der Transitpeptide weisen jedoch keine große Übereinstimmung auf, wobei sich das um ca. 70 Aminosäuren längere Transitpeptid des ATP/ADP-Transporters aus der Rotalge Galderia sulphuraria (AATPGs) besonders hervorhebt. Für die Berechnung des Anteils ähnlicher bzw. identischer Aminosäuren wurden bei den pflanzlichen Transporter die Transitpeptide nicht berücksichtigt (Kapitel 7.5; Tab. 7.7). Die zugehörigen Werte für die Ähnlichkeit bzw. Identität zeigen, dass die pflanzlichen ATP/ADP-Transporter untereinander die größten Homologien aufweisen. Interessanterweise besitzen die chlamydialen Transporter eine höhere Ähnlichkeit zu den pflanzlichen als zu anderen eubakteriellen Homologen.

Des Weiteren ist auffallend, dass die Proteinsequenzen der Nukleotid-Transporter aus Holospora obtusa NPTHo und der zweiten Isoform aus Chlamydia trachomatis NPT2Ct von den anderen Transportproteinen stärker divergieren. Zudem zeichnen sich beide Proteine jeweils durch eine Sequenzerweiterung von sieben Aminosäuren aus. Beim NPT1Ho-Protein befindet sich der Aminosäure-Einschub im Bereich des hydrophilen „Loops“ zwischen der 7. und 8. transmembranen Domäne, im Fall des NPT2Ct-Proteins im Bereich zwischen der 6. und 7. transmembranen Domäne.




Dikotyledonen
Monokotyledonen
Algen
Rickettsiales
Chlamydiales
AATP1At
AATP2At
AAP1St
AATP1Zm
AATP1Gs
TLC1Rp
NPTHo
NPT1Ct
NPT2Ct
Motiv 1
Motiv 2
Motiv 3

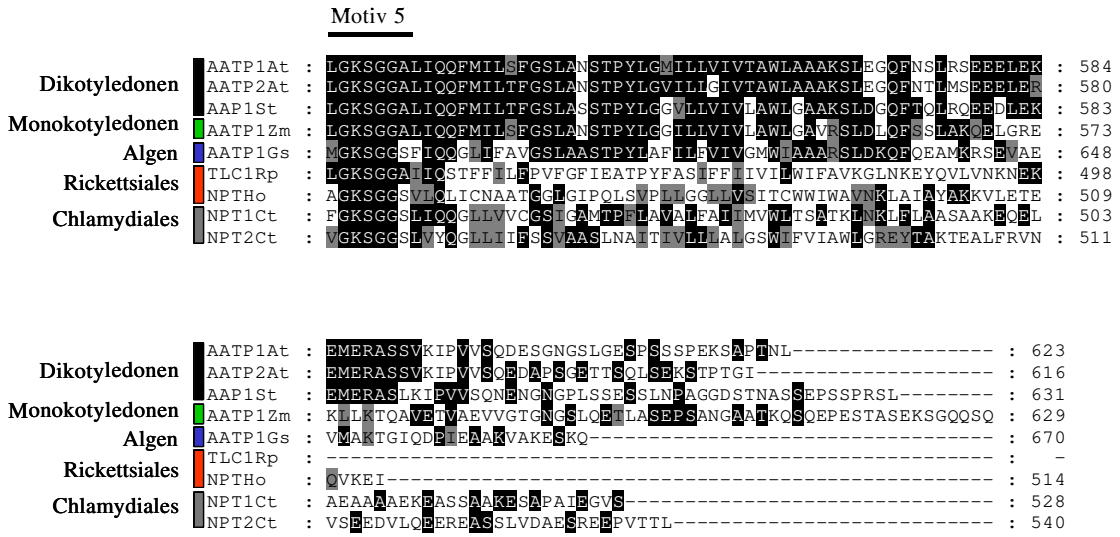


Abb. 3.3: Protein-Alignment der plastidären und bakteriellen Nukleotid-Transporter mit vollständiger Aminosäuresequenz. Identische Aminosäuren sind durch schwarze Boxen, ähnliche Aminosäuren durch graue Boxen gekennzeichnet. Die jeweilige Bezeichnung der verschiedenen Transporter ist links, die Aminosäurepositionen sind rechts dargestellt. Die plastidären Transporter der höheren Pflanzen und der Algen sind mit einem schwarzen bzw. grünen Kasten zusammengefasst. Die Transporter der α-Proteobakterien sind mit einem roten, die chlamydialen mit einem grauem Kasten umrahmt. Die putativen Bereiche für die Transmembranhelices sowie die hochkonservierten Domänen sind durch Balken gekennzeichnet.

3.1.7 Hydropathieanalyse von NPTHo

Bei den bisher bekannten nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern aus Pflanzen und Eubakterien handelt es sich um integrale Membranproteine, die zur Gruppe der 12-Helix-Transporter zugeordnet werden können (MARGER & SAIER, 1993; WINKLER & NEUHAUS, 1999).

Um Einblicke in die molekulare Struktur des nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporters aus Holospora obtusa NPTHo zu erhalten, wurde eine Hydropathieanalyse mit der abgeleiteten Proteinsequenz duchgeführt. Hydropathieanalysen erlauben eine Voraussage, welche Abschnitte in einer Proteinsequenz möglicherweise transmembrane Helices bilden. Dabei wird jeder Aminosäure ein bestimmter Hydropathiewert zugeordnet. Aus diesen Werten läßt sich dann die Abfolge hydrophiler und hydrophober Membrandomänen eines Proteins berechnen. Diese Analyse wurde mit dem Programm ProtScale nach einem von KYTE & DOOLITTLE (1982) entwickelten Algorithmus ausgeführt.

Aus der Abbildung 3.4 geht hervor, dass dem NPTHo-Protein entsprechend den homologen Transportproteinen 12 mögliche Transmembranhelices zugeordnet werden kann (WINKLER & NEUHAUS, 1999).

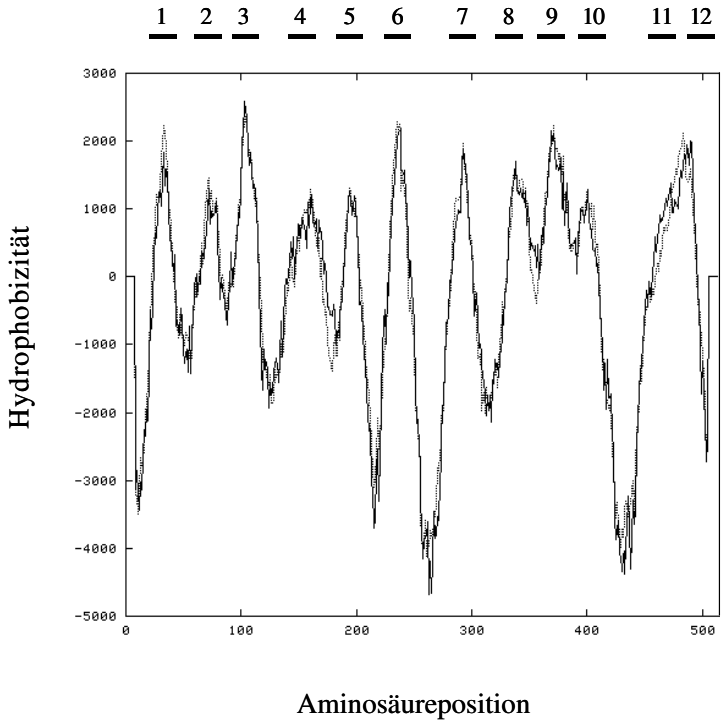


Abb. 3.4: Hydropathieanalyse der Aminosäuresequenz von NPTHo. Die Hydropathieanalyse wurde mit dem Programm TMpred nach KYTE & DOOLITTLE (1982) durchgeführt (www.ch.embnet/software/TMpred). Auf der x-Achse sind die Positionen der Aminosäuren dargestellt, die y-Achse zeigt die Hydrophobizität bei einer Intervallgröße von 15 Aminosäuren. (positive Werte = hydrophob, negative Werte = hydrophil). Die potentiellen transmembranen Bereiche sind durch Balken gekennzeichnet.

3.1.8 Erstellung eines 12-Transmembranhelix-Modells für NPTHo

Auf Grundlage der Hydropathienanalyse (Kapitel 3.1.7) wurde zusammen mit den Ergebnissen der DNA-Sequenzanalyse (Kapitel 3.1.5) und des Aminosäure-Alignments (Kapitel 3.4) ein Computermodell zur Veranschaulichung der molekularen Architektur für den nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter aus Holospora obstusa NPTHo erstellt.

Das NPTHo-Protein lässt sich ebenso wie die bisher bekannten Homologen als integrales Membranprotein mit 12 transmembranen α-helicalen Domänen darstellen, das zwischen der sechsten und der siebten Transmembranhelix einen hydrophilen „Loop“ besitzt. Diese hydrophile Schleife ist

bei den nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter ebenso wie der hydrophile N- bzw. C-Terminus vermutlich ins Cytosol gerichtet (WINKLER & NEUHAUS, 1999). Die aus dem multiplen Protein-Alignment (Abb. 3.3) ermittelten konservierten Sequenzmotive AELWG (Aminosäuren 244 - 248 des AATP1At-Proteins), FANQIT (Aminosäuren 259 - 264 des AATP1At-Proteins), GLGANVALIF (Aminosäuren 277 - 286 des AATP1At-Proteins), MAYIPLD (Aminosäuren 491 - 497 des AATP1At-Proteins) und GKSGGA (Aminosäuren 526 - 531 des AATP1At-Proteins) sind in dem Computermodell anschaulich gekennzeichnet (Abb. 3.5).

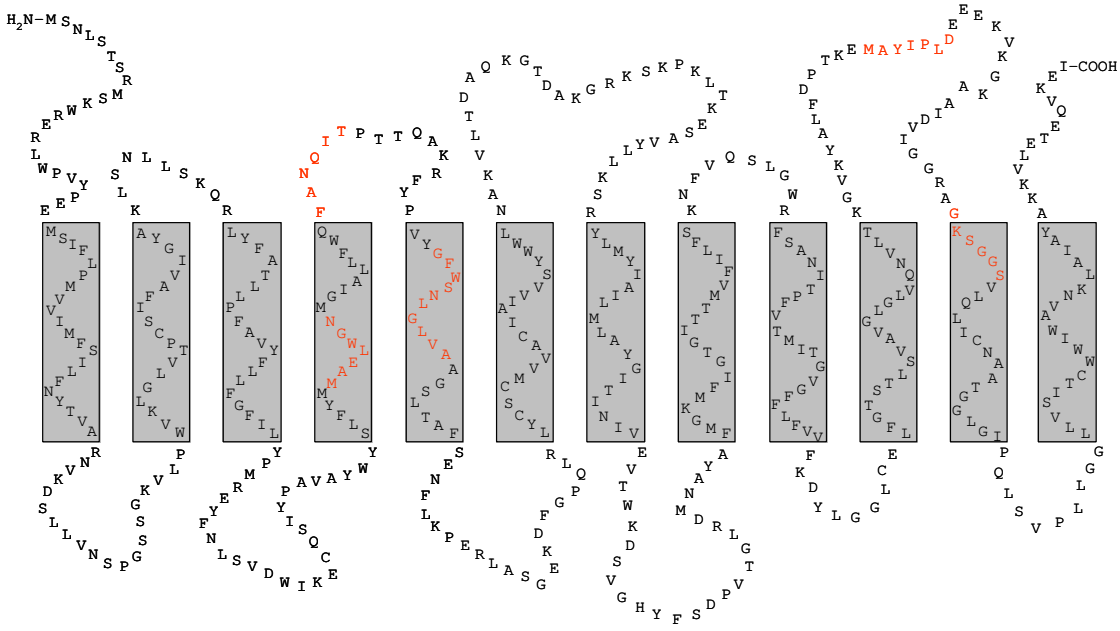


Abb. 3.5: Darstellung eines 12-Helix-Modells von NPTHo. Die konservierten Motive sind rot unterlegt. Die potentiellen α-Helices sind in Tonnenform dargestellt.

3.1.9 Phylogenetische Stammbaum-Analyse

Mit Hilfe eines phylogenetischen Stammbaums lassen sich evolutive Zusammenhänge verwandter Proteine aus den verschiedenen Organismen veranschaulichen. Ein solcher Stammbaum gibt Auskunft, wie nahe die einzelnen Proteine miteinander verwandt sind. Des Weiteren lässt sich aus einem Stammbaum ermitteln, in welchem relativen zeitlichen Abstand sich die Proteine von ihrem gemeinsamen Vorläufer verändert haben (Evolutionsgeschwindigkeit).

Bei einem multiplen Proteinalignment (Kapitel 3.1.6) werden die Ähnlichkeiten zwischen den verglichenen Sequenzen berechnet, die man als evolutive Distanzen betrachtet. Aus diesen evolutiven

Abständen lässt sich ein phylogenetischer Stammbaum konstruieren. Die Analyse der Sequenzdaten erfolgte mit dem Programm CLUSTALW und der phyolgenetische Stammbaum wurde mit dem Programm PHYLIP nach der Neighbor-Joining-Methode (SAITOU & NEI, 1987) unter Verwendung der Dayhoff PAM Matrix zur Distanzberechnung mit Hilfe der Optionen SEQBOOT, PRODIST, NEIGHBOR und CONSENSE berechnet (Kapitel 2.4.6). Um die Zuverlässigkeit der erhaltenen Stammbaum-Topologie statistisch abzusichern, wurden 100 Bootstraps durchgeführt, d.h. der Datensatz des Alignments wurde randomisiert und für jeden der entstandenen 100 Datensätze wurde eine Phylogenie berechnet. Die ermittelten Bootstrapwerte geben den prozentualen Anteil der Gruppierungen in allen ermittelten Phylogenien wieder und erlauben so eine Einschätzung der statistischen Signifikanz der beobachteten Verzweigungsmuster innerhalb des Stammbaums. Die Bearbeitung des Stammbaums erfolgte mit dem TREEVIEW-Programm (Kapitel 2.4.6).

Um die Verwandschaftsverhältnisse der plastidären ATP/ADP-Transporter innerhalb der Pflanzen zu ermitteln, wurde ein phylogenetischer Stammbaum erstellt (Abb. 3.6). Die Phylogenie des plastidären Transporters basiert auf 17 pflanzlichen Proteinsequenzen, wobei das multiple Alignment aus Kapitel 3.1.6 zur phylogenetischen Berechnung herangezogen wurde. Die Analyse bezieht sich somit für jede Sequenz auf den Proteinbereich, der dem Aminosäurebereich 240 - 570 des AATP1At-Proteins entspricht. Die Aminosäuresequenz des putativen plastidären ATP/ADP-Transporter aus Cyanophora paradoxa wurde für die Stammbaum-Analyse dieser Protein-Familie als Wurzel definiert.

Der resultierende Baum kann in zwei Hauptäste aufgeteilt werden, der monophyletisch aus dem plastidären ATP/ADP-Transporter aus Cyanophora paradoxa hervorgeht. Der obere Hauptast enthält die Transportproteine der Grünalgen und der höheren Pflanzen (Spermatophyta). Die Transportproteine der beiden Grünalgen Chlamydomonas reinhardtii und Dunaliella salina, deren Ursprung auf ein gemeinsames Vorläufer-Protein zurückgeht, bilden einen eigene distinkte Gruppe. Ebenfalls ordnen sich die Sequenzen der mono- und dikotylen Transporter in zwei getrennten Gruppen an. Unter den dikotylen Sequenzen gruppieren sich die jeweiligen Vertreter der Familien Brassicaeae, Fabaceae und Solanaceae zusammen, deren verwandtschaftliche Beziehungen dieser Proteine durch die hohen Bootstrapwerte unterstützt werden. Die Transportproteine der Monokotyledonen stammen alle aus Mitgliedern der Familie Poaceae ab und bilden innerhalb der phylogenetischen Analyse einen entsprechenden Ast, dessen Verzweigungsmuster sich durch hohe Bootstrapwerte auszeichnet. Dagegen enthält der untere Hauptast die plastidären ATP/ADP-Transporter der Rotalge Galdieria und die der heterokonten Alge Odontella, bei denen man von einer nahen Verwandschaft ausgehen kann (100 % Bootstrap).

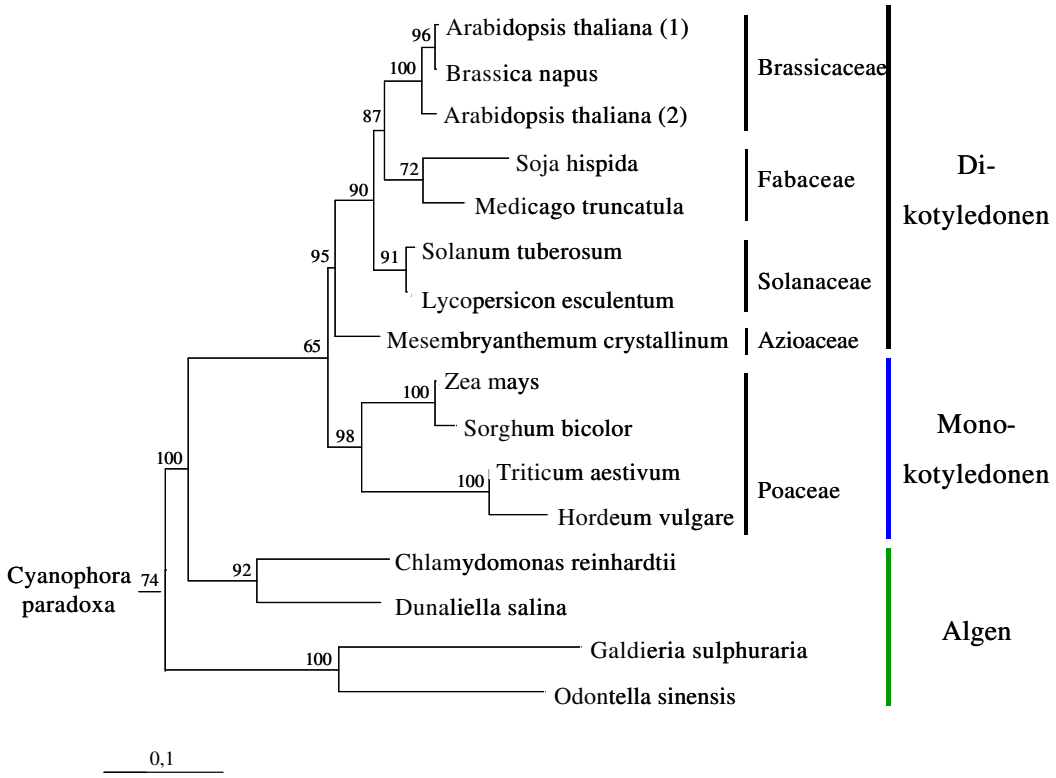


Abb. 3.6: Phylogenetischer Stammbaum der plastidären ATP/ADP-Transporter aus höheren und niederen Pflanzen. Zur Berechnung des Stammbaums diente die Neighbor-Joining-Methode unter Verwendung der Dayhoff PAM Matrix. Die Bootstrapwerte über 50 % wurden berücksichtigt und an die Verzweigungspunkte im Stammbaum eingetragen. Die Balkenlänge entspricht einer Substitutionsrate von 0,1 Austauschen pro nichtidentischer Aminosäureposition. Die Berechnung des Stammbaums basiert auf dem multiplen Alignment aus Kapitel 3.1.9 (Abb. 3.1) und somit auf insgesamt 17 pflanzliche Proteinsequenzen (Aminosäure 240 - 570 bezogen auf die AATP1At-Proteinsequenz).

Die Verwandtschaftsbeziehungen der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter aus Prokaryoten sollten ebenfalls genauer ermittelt werden. Dazu wurden insgesamt 14 eubakterielle Sequenzen des entsprechenden Aminosäure-Alignments aus Kapitel 3.1.6 in eine phylogenetische Analyse einbezogen, deren Ergebnis in Abbildung 3.7 dargestellt ist. Ausgehend vom TLC1Rp-Protein wurden der Sequenzbereich von 175 aa bis 415 aa für die Phylogenie eingesetzt.

Es wurde ein sogenannter „wurzelloser“ Distanzstammbaum erstellt, dem keines der Proteine als Ursprungsprotein zugrunde gelegt wurde. Anhand des Stammbaumes kann man eine deutliche Gliederung in zwei Proteinfamilien erkennen. So beinhaltet der obere Teilbaum die Sequenzen von

Eubakterien, die anhand der 16S-rRNA-Analyse zur Ordnung der Rickettsiales zugeordnet werden. Die Sequenzen der beiden Caedibacter-verwandten Endosymbionten ET39 und HN3 zweigen vom oberen Ast vor den anderen rickettsiellen Sequenzen ab. Aufgrund der geringen Bootstrapwerte wird jedoch diese Abzweigung nicht stark unterstützt. Innerhalb der rickettsiellen Proteinfamilie sind zwei Gruppierungen zu erkennen. Zu der ersten Gruppe gehören die Transportproteine aus Caedibacter caryophila, Rickettsia prowazekii sowie aus dem Rickettsia-vewandten Endoparasiten der Papaya (Papaya bunchy top bacterium, Pbtb) die vermutlich monophyletisch aus einem gemeinsamen Vorfahren hervorgegangen sind (100 % Bootstrap-Unterstützung). Die zweite Gruppe wird dagegen von den Sequenzen der Rickettsia-Isoformen TLC 2 - 5 gebildet, deren Äste relativ lang sind. Darüber hinaus erhält das Verzweigungsmuster keine hohe Bootstrap-Unterstützung.

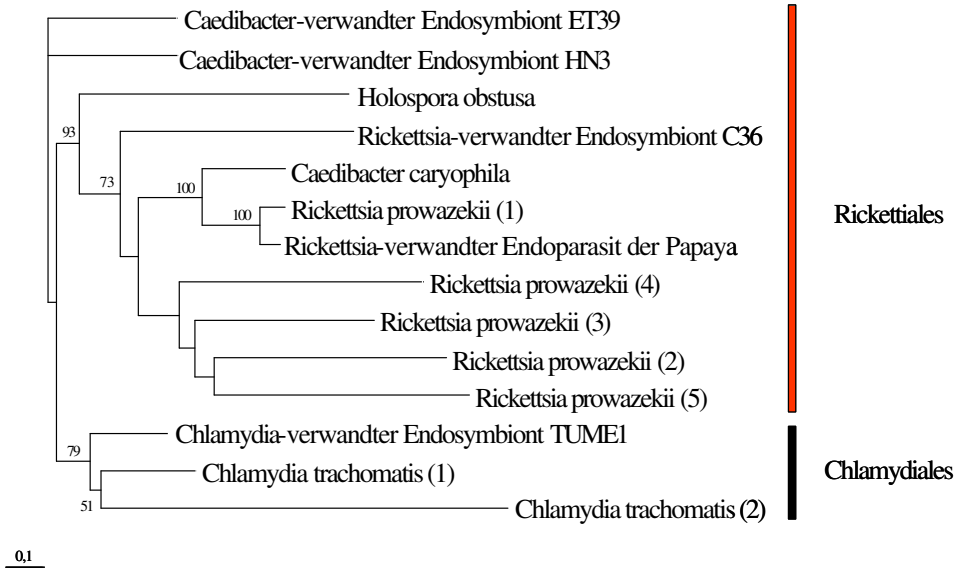


Abb. 3.7: Phylogenetischer Stammbaum der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter aus Eubakterien. Zur Berechnung des Stammbaums diente die Neighbor-Joining-Methode unter Verwendung der Dayhoff PAM Matrix. Die Bootstrapwerte über 50 % wurden berüchsicktigt und an die Verzweigungspunkte im Stammbaum eingetragen. Die Balkenlänge entspricht einer Substitutionsrate von 0,1 Austauschen pro nichtidentischer Aminosäureposition. Die Berechnung des Stammbaums basiert auf dem multiplen Alignment aus Kapitel 3.1.9 (Abb. 3.2) und somit auf insgesamt 14 bakterielle Proteinsequenzen (Aminosäure 175 -415 bezogen auf die TLC1Rp-Proteinsequenz).

Vor diesen beiden Gruppierungen sind die Sequenzen aus Holospora obtusa und dem Rickettsia-verwandten Endosymbionten C36 jeweils durch einen Seitenast deutlich abgetrennt und stehen innerhalb des oberen Teilstammbaums isoliert. Zudem ist auffallend, dass deren Astlängen im Vergleich zu den anderen relativ lang sind, wobei die Sequenz des nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporters aus Holospora obtusa am weistesten vom Verzweigungspunkt entfernt ist.

In dem Stammbaum der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter zweigen die homologen Sequenzen der beiden Caedibacter-verwandten Endosymbionten ET39 und HN3 vor den chlaymdialen und ricketsiellen Transporter ab. Diese phylogenetische Einordnung wird durch geringe Bootstrapwerte nicht stark unterstützt und stellt vemutlich ein Artefakt dar. Aufgrund der 16S-rRNA-Analyse gehören diese Endosymbionten zur Gattung Caedibacter (Dr. M. Wagner, Technische Universität München; unveröffentlicht). Demnach würde man auch deren Transportproteinen entsprechend ihrer molekularen Taxonomie zu ihren nächsten Verwandten einordnen.

Der untere Teilbaum enthält die Sequenzen der chlamydialen Transporter. Entsprechend ihrer nahen Verwandtschaft gruppieren sich die beiden Proteine aus Chlamydia trachomatis zueinander, wobei sich die zweite Isoform durch einen sehr langen Verzweigungsast auszeichnet und damit eine Sonderstellung einnimmt.

Für eine umfassende phylogenetische Analyse wurden sowohl die pflanzlichen als auch die eubakteriellen Transportproteine mit einbezogen (Abb. 3.8). Bei dieser verwandschaftlichen Untersuchung wurden repräsentativ neun vollständigen Sequenzen aus fünf Eukaryoten und vier Bakterien berücksichtigt. Die phylogenetischen Berechnungen basieren bei den ausgewählten Proteinen auf den gesamten kodierenden Bereich, wobei die plastidären Transportproteine ohne Transitpeptid eingesetzt wurden. Der resultierende Stammbaum beinhaltet drei monophyletische Teilstammbäume, deren Bootstrap-Unterstützung 100 %, 73 % bzw. 80 % beträgt. So gehen die plastidären, rickettsiellen und chlamydialen Transporter jeweils aus einem gemeinsamen Vorfahren hervor.

Der obere und größte Teilstammbaum repräsentiert die plastdiären Transporter der niederen sowie höheren Pflanzen, dessen Verzweigungsmuster (Topologie) durch hohe Bootstrapwerte unterstützt wird. Innerhalb dieser Gruppierung zweigt als erstes die Rotalgen-Sequenz ab. Unter den Sequenzen der höheren Pflanzen (Spermatophyta) besitzt der Transporter aus Mais einen separaten Seitenast und ist damit von den Vertretern der Dikotyledonen getrennt.

Die eubakteriellen Sequenzen spalten sich in zwei Teilstammbäume auf. Der eine Teilbaum enthält die Proteine von Vertretern der Rickettsiales, während die beiden chlamydialen Transporter dem anderen Teilbaum angehören. Im Vergleich zu den pflanzlichen Sequenzen weisen die Transporter aus Eubakterien längere Verzweigungsäste auf.

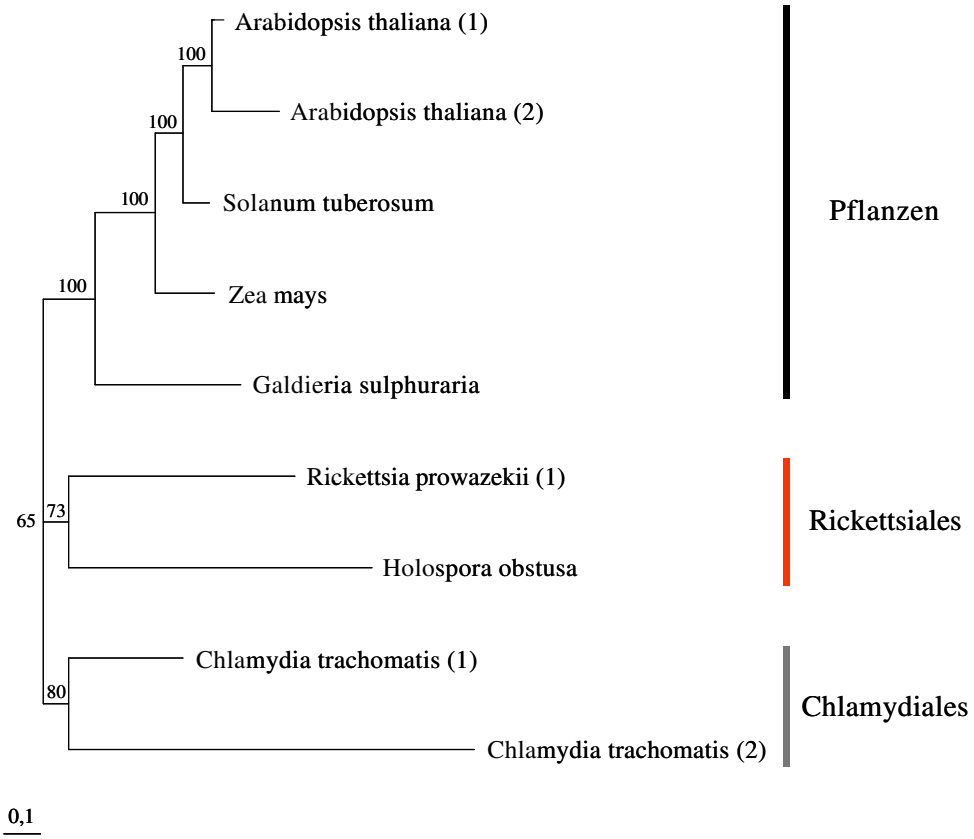


Abb. 3.8: Phylogenetischer Stammmbaum der pflanzlichen und bakteriellen nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter. Zur Berechnung des Stammbaums diente die Neighbor-Joining-Methode unter Verwendung der Dayhoff PAM Matrix. Die Bootstrapwerte über 50 % wurden berücksichtigt und an die Verzweigungspunkte im Stammbaum eingetragen. Die Balkenlänge entspricht einer Substitutionsrate von 0,1 Austauschen pro nichtidentischer Aminosäureposition. Die Berechnung des Stammbaums basiert auf das multiple Alignment aus Kapitel 3.1.9 (Abb. 3.3) und bezieht sich insgesamt auf neun Proteinsequenzen, wobei die Transitpeptide der plastidären Transportproteinen in die Berechnung nicht berücksichtigt wurden.

3.1.10 Konservierte Sequenzmotive

Ein konserviertes Sequenzmotiv ist eine Abfolge von Aminosäuren, die in allen Sequenzen einer Proteinfamile vorkommen. Oft besitzen diese konservierten Sequenzmotive übergeordnete Funktionen und werden Konsensussequenzen genannt.

Aus dem multiplen Alignment der pflanzlichen und bakteriellen nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter lassen sich fünf hochkonservierte Sequenzmotive erkennen, die bis auf nur wenige Abweichungen in allen bislang identifizierten Proteinen vorkommen (Kapitel 3.1.6; Abb. 3.3).

Bei diesen konservierten Aminosäuren handelt es sich um die Motive AELWG (Aminosäuren 244 - 248 des AATP1At-Proteins), FANQIT (Aminosäuren 259 - 264 des AATP1At-Proteins), GLGANVALIF/V (Aminosäuren 277 - 286 des AATP1At-Proteins), MAYIPLD (Aminosäuren 491 - 497 des AATP1At-Proteins) und GKSGGA (Aminosäuren 526 - 531 des AATP1At-Proteins).

Bei einer genaueren Betrachtung zeigt sich, dass drei dieser Sequenzmotive ebenfalls in allen Mitgliedern der „Mitochondrial Carrier Family“ (MCF-Familie) vorkommen. Diese Entdeckung ist äußerst interessant, da die mitochondrialen Transporter ansonsten keinerlei substantielle Ähnlichkeiten zu der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Familie aufzeigen. So bestehen die Transporter der MCF-Familie im funktionellen Zustand aus einem Homodimer mit potentiellen 2× 6 transmembranen, α-helicalen Domänen (KLINGENBERG, 1989; FIORE et al., 1998), während die nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter vermutlich als Monomere mit zwölf transmembranen α-Helices eine konträre molekulare Struktur aufweisen (WINKLER & NEUHAUS, 1999).

Die Motive GLGANVALIF/V, MAYIPLD und GKSGGA erscheinen dreimal mehr oder weniger konserviert in den Proteinsequenzen der mitochondrialen Transportproteine. In der Abbildung 3.9 sind jeweils Ausschnitte aus einem multiplen Alignment dargestellt, das mit den Programmen CLUSTAL W und GENEDOC erstellt wurde (Kapitel 2.4.6). Dieser Aminosäure-Vergleich basiert auf 29 verschiedenen Proteinen der MCF-Familie, deren Sequenzen unter den jeweiligen Zugangs-(„Accession“)-Nummern in der EMBL-Datenbank zugänglich sind (Kapitel 7.4; Tab.7.4). Bei diesen Sequenzen handelt es sich um die mitochondrialen ATP/ADP-Transporter (A-1 bis A-20), die „Graeve disease associated proteins“ (G-1; G-2), die 2-Oxoglutarat/Malat-Transporter (O-1; O-2), die Phosphat-Transporter (P-1; P-2) sowie die Protonen-leitenden Entkoppler-Proteine (U-1 bis U-3).

So ist das konservierte Motiv GLGANVALIF/V in den transmembranen Domänen TM 2, TM 4 und TM 6 der mitochondrialen Transporter mit einigen Abweichungen wiederzufinden. Vor allem ist die erste und letzte Aminosäureposition des Motivs in allen drei α-Helices stark konserviert. Ferner besitzen die mitochondrialen ATP/ADP-Transporter (A-1 bis A-20) die Aminosäureabfolgen ANV und GAN in TM 2 bzw. TM 6, die auffallend in allen Sequenzen mehr oder weniger identisch sind.

Das zweite Sequenzmotiv der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter MAYIPLD kommt innerhalb der MCF-Mitglieder als verkürztes Motiv vor. In der ersten, dritten und fünften transmembranen Domäne findet man das Motiv wieder, wobei vermutlich die Aminosäure Methionin (M) nicht konserviert und die Aminosäure Isoleucin (I) innerhalb des Motivs deletiert wurde. Am stärksten konserviert ist in allen drei α-Helices die Aminosäure Prolin (P), in TM 5 zusätzlich die Aminosäure Aspartat. Des Weiteren kommt die Aminosäureabfolge L D in der ersten transmembranen Domäne nicht innerhalb der mitochondrialen ATP/ADP-Transportern vor, sondern ist nur in den übrigen MCF-Mitgliedern zu beobachten. Dagegen erscheint die Aminosäureabfolge L D in TM 3 fast ausschließlich innerhalb der mitochondrialen ATP/ADP-Transporter (A-1 bis A-20) stark konserviert, nicht aber bei den anderen Vertretern der MCF-Familie.

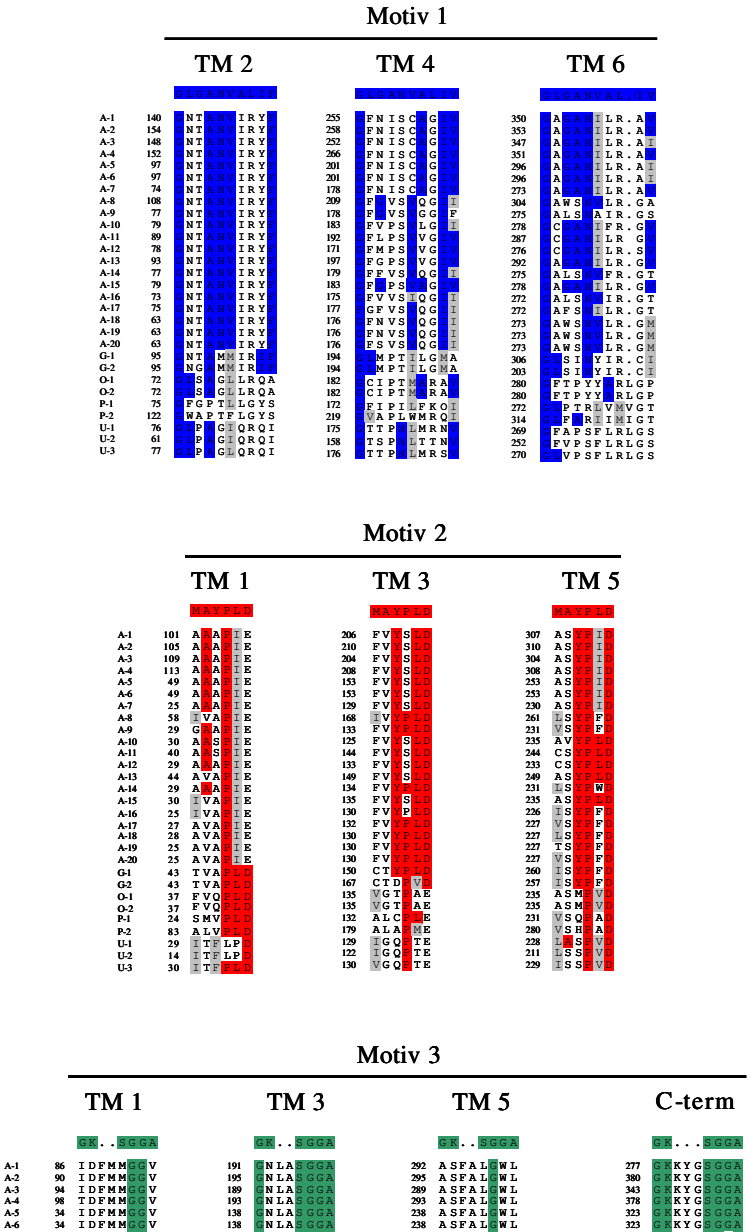


Abb. 3.9: Ausschnitte aus einem multiplen Aminosäure-Alignment basierend auf 29 verschiedene Transporter der MCF-Familie. Die drei konservierten Sequenzmotive der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter GLGANVALIF/V (blau), MAYIPLD (rot) und GKSGGA (grün) sind über dem jeweiligen Alignment-Ausschnitt der MCF-Mitglieder dargestellt. Ebenfalls sind

die einzelnen transmembranen Domänen (TM) der mitochondrialen Transporter angegeben, in denen das entsprechende Motiv vorkommt. Identische Aminosäuren sind durch farbige Boxen, ähnliche Aminosäuren durch graue Boxen gekennzeichnet. Die Abkürzungen der verschiedenen MCF-Transporter sind links aufgeführt. Vor jedem Alignment sind die Aminosäurepositionen dargestellt. A-1 bis A-20 repräsentieren mitochondriale ADP/ATP-Carrier (AAC); G-1 und G-2 repräsentieren „Graeve disease associated proteins"; O-1 und O-2 repräsentieren 2-Oxoglutarat/Malat-Transporter; P-1 und P-2 repräsentieren Phosphattransporter; U-1 bis U-3 repräsentieren Protonen-leitende Entkoppler-Proteine. A-1: Arabidopsis thaliana (AAC2), A-2: Lupinus albus, A-3: Oryza sativa, A-4: Solanum tuberosum, A-5: Triticum aestivum (AAC1), A-6: Triticum aestivum (AAC2), A-7: Chlamydomonas reinhardtii, A-8: Chlorella kesslerii, A-9: Dictyostelium discoideum, A-10: Saccharomyces cerevisiae (AAC1), A-11: Saccharomyces cerevisiae (AAC2), A-12: Saccharomyces cerevisiae (AAC3), A-13: Saccharomyces pombe, A-14 Caenorhabditis elegans, A-15: Neurospora crassa, A-16: Halocynthia roretzi, A-17: Drosophila melanogaster, A-18: Homo sapiens (AAC1), A-19: Homo sapiens (AAC2), A-20: Homo sapiens (AAC3), G-1: Rattus norvegicus, G-2: Homo sapiens, O-1: Bos taurus, O-2: Homo sapiens, P-1: Saccharomyces cerevisiae, P-2: Homo sapiens, U-1: Rattus norvegicus, U-2: Bos taurus, U-3: Homo sapiens.

In den transmembranen Domänen TM 1, TM 3 und TM 5 der MCF-Proteine findet sich das Motiv GKSGGA der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter in einer abweichenden Form mit zusätzlichen Insertionen wieder. Dabei ist ein Einschub von zwei Aminosäuren in den drei α-Helices zu beobachten, der mehr oder weniger für jede transmembrane Domäne spezifisch konserviert ist. Im Vergleich zu TM 1 und TM 5 ist das Motiv GK · · SGGA in der dritten transmembranen Domäne vorwiegend bei den mitochondrialen Adenlyat-Transportern (A-1 bis A-20) besonders stark konserviert. Darüber hinaus kommt dieses Sequenzmotiv am C-Terminus innerhalb der mitochondrialen ATP/ADP-Transporter nur bei den pflanzlichen Vertretern vor (A-1 bis A-9), wobei drei Aminosäuren inseriert wurden.

3.1.11 Ermittlung der statistischen Signifikanz der konservierten Sequenzmotive

Die hochkonservierten Sequenzmotive der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter GLGANVALIF/V, MAYIPLD und GKSGGA kommen ebenfalls in allen Mitgliedern der MCF-Familie vor, die ansonsten kaum substanielle Ähnlichkeiten zu den nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern aufweisen.

Um zu überprüfen, ob das Vorkommen dieser Sequenzmotive in den MCF-Sequenzen statistisch signifikant ist, wurde die Wahrscheinlichkeit berechnet, mit der die Aminosäuren an der entsprechenden Position innerhalb der Sequenzmotive zu finden sind. Diese Berechnungen wurden im

Vergleich sowohl für die Familie der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter als auch für die Familie der MCF-Transporter durchgeführt.

Dazu wurden 29 verschiedene Transportproteine der MCF-Familie ausgewählt, bei denen es sich um mitochondriale ATP/ADP-Transporter, „Graeve disease associated proteins“, 2-Oxoglutarat/ Malat-Transporter sowie Protonen-leitende Entkoppler-Proteine handelt (Kapitel 7.4, Tab. 7.4). Im Fall der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter wurden vierzehn Proteinsequenzen eingesetzt, von denen jeweils der vollständige kodierende Bereich bekannt ist: die beiden Isoformen des plastidären ATP/ADP-Transporters aus Arabidopsis thaliana (AATP1At, AATP2At), die plastidären ATP/ADP-Transporter aus Raps (AATP1Bn), Kartoffel (AATP1St), Mais (AATP1Zm), der Rotalge Galdieria sulphuraria (AATPGs) sowie die bakteriellen Nukleotid-Transporter aus Rickettsia prowazekii (TLC1-5Rp), Chlamydia trachomatis (NPT1Ct, NPT2Ct) und Holospora obtusa (NPTHo).

Die zu untersuchenden Proteinsequenzen wurden für die jeweilige Familie getrennt voneinander mit den CLUSTAL W-Programm verglichen (Kapitel 2.4.6). Anhand der resultierenden Protein-Alignments wurden für beide Transporter-Familien die Aminosäuren der entsprechenden Sequenzmotive quantifiziert, und zwar mit welcher Häufigkeit die Aminosäure i an der Aminosäureposition x vorzufinden ist. Da aufgrund der Gentriplikation die konservierten Sequenzmotive in den MCF-Proteinen jeweils dreimal wiederzufinden sind, wurden im Fall der MCF-Familie für jedes Sequenzmotiv die Triplikate zusammengefasst. Jedoch wurde das am C-Terminus vorkommende Sequenzmotiv GK · · SGGA bei den Mitgliedern der MCF-Familie nicht berücksichtigt. Somit wurden im Fall der mitochondrialen Transportproteine insgesamt 87 Sequenzen für die Berechnungen einbezogen.

In der Abbildung 3.10 sind die prozentualen Häufigkeiten der Aminosäuren dargestellt, mit der die jeweiligen Aminosäuren der drei konservierten Motive bei beiden Transporter-Familien vorkommen. Auffallend ist, dass diese Motive der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter mit nur wenigen Ausnahmen und mit einer hohen statistischen Signifikanz in der MCF-Familie wiederzufinden sind. Im Fall des Sequenzmotivs GLGANVALIF/V kommen bei der MCF-Familie an sieben von zehn Positionen identische Aminosäuren mit der jeweils höchsten prozentualen Häufigkeit vor. Dagegen weisen im Vergleich beider Familien nur zwei Aminosäurepositionen in den entsprechenden Motiven keine Ähnlichkeiten zueinander auf. Die Berechnungen für das zweite Motiv MAYPILD ergeben, dass bei den Vertretern der MCF-Familie über die Hälfte der Positionen mit identischen Aminosäuren besetzt sind, die darüber hinaus mit der höchsten Wahrscheinlichkeit an dieser Position vorzufinden sind. Bei dem dritten Motiv weisen die MCF-Transporter bis auf zwei Aminosäure-Insertionen zu dem nicht-mitochondrialen Sequenzmotiv identische Aminosäuren auf, wobei an vier Positionen jeweils die Aminosäure mit der höchster Häufigkeit vorkommt.

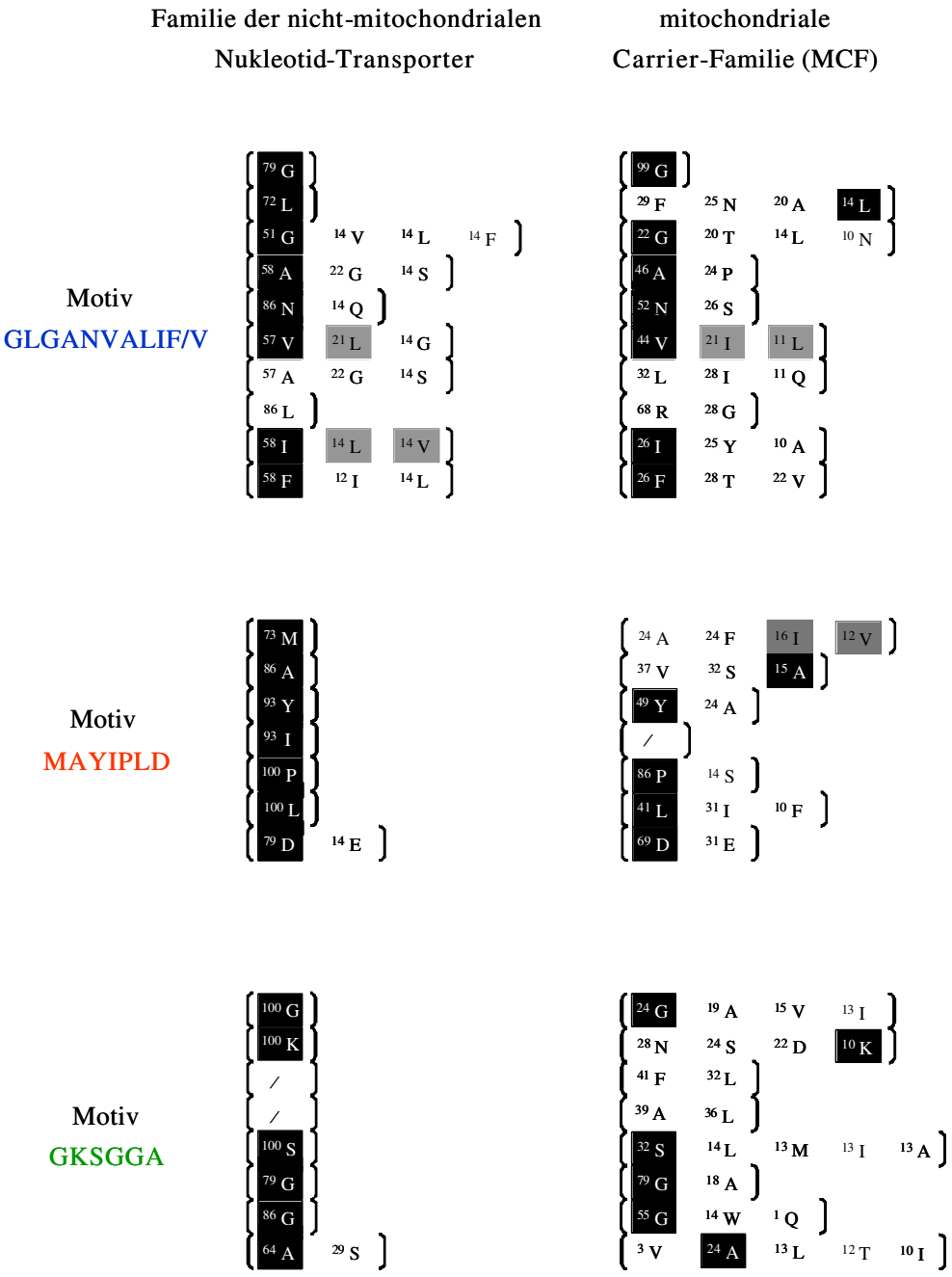


Abb. 3.10: Die prozentualen Häufigkeiten der Aminosäuren in den drei konservierten Motiven, die in beiden Transporter-Familien vorkommen. Die identischen und ähnlichen Aminosäuren sind schwarz bzw. grau markiert. Alle Aminosäuren mit einer Häufigkeit über 10% sind aufgeführt. Aminosäure-Insertionen sind mit einem Stern gekennzeichnet.

3.1.12 Erstellung eines Strukturmodells für die MCF-Familie

Anhand eines Strukturmodells soll für die MCF-Familie die Anordnung der Sequenzmotive GLGANVALIF/V, AYIPLD und GKSGGA, die auch in den nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern hochkonserviert sind, veranschaulicht werden.

Die Abbildung 3.11 zeigt ein solches Strukturmodell für ein hypothetisches MCF-Mitglied in Anlehnung an ein Modell für mitochondriale ATP/ADP-Transporterproteine nach NELSON & DOUGLAS (1993). Das dargestellte Strukturmodell weist sechs transmembrane Domänen auf, die der molekularen Architektur eines Monomers der MCF-Familie entspricht. Im funktionellen Zustand jedoch bestehen die mitochondrialen Transportproteine aus zwei identischen Monomeren (Homodimer mit 2×6 transmembranen α-Helices; KLINGENBERG, 1989; FIORE et al., 1998).

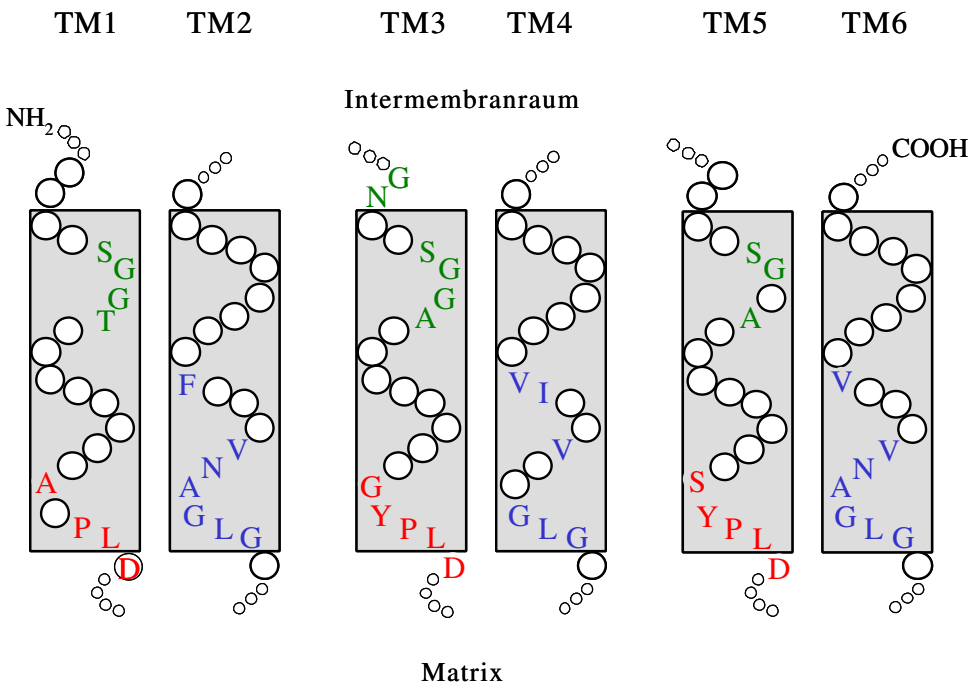


Abb. 3.11: Darstellung eines hypothetischen Strukturmodells auf Grundlage eines Modells für mitochondriale ATP/ADP-Transporter nach NELSON & DOUGLAS (1993). Die potentiellen transmembranen α-Helices sind in Tonnenform dargestellt. Die konservierten Sequenzmotive sind farbig gekennzeichnet.

Die Motive GLGANVALIF/V, AYIPLD und GKSGGA kommen dreimal in den Sequenzen der MCF-Transporter vor. Diese Sequenzmotive AYIPLD (rot) und GKSGGA (grün) befinden sich innerhalb der transmembranen Domänen TM 1, TM 3 sowie TM 5. Dagegen lässt sich die Aminosäureabfolge GLGANVALIF/V zur zweiten, vierten und sechsten Transmembranhelix

zuordnen. Aufällig ist die vorhergesagte Lage dieser Motive im Strukturmodell. So befinden sich die Motive in den jeweiligen α-helicalen Domänen annähernd an gleicher Position. Diese Anordnung entspricht den sich wiederholenden, internen Sequenzbereichen der MCF-Familie. Aufgrund einer Gentriplikation enthält jedes Monomer drei sehr ähnliche Sequenzabschnitte, die jeweils zwei Transmembranhelices bilden. Zusammengesetzt ergibt sich damit ein Monomer aus sechs α-Helices (KLINGENBERG, 1989; FIORE et al., 1998).

3.2 Molekular-genetische Analysen von nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern aus niederen Pflanzen

Für die nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter aus Cyanophora paradoxa und Chlamydomonas reinhardtii (AATPCp bzw. AATPCr) erfolgte eine weitere molekulare Charakterisierung.

In höheren Pflanzen existieren die plastidären ATP/ADP-Transporter in mehreren Isoformen. Mittels „Southern-Blot"-Analysen sollte in Vertretern der niederen Pflanzen (Algen) untersucht werden, ob Kopien des Gens für das entsprechende Transportprotein im Genom vorkommen („Multi-copy"-Gen oder „Single-copy"-Gen).

Des Weiteren sollte erstmals mittels „Northern-Blot"-Analysen der Transkriptionsgehalt der plastidären ATP/ADP-Transportproteine dieser pflanzlichen Einzeller unter Berücksichtigung des Einflusses wechselnder Lichtbedingungen untersucht werden.

3.2.1 „Southern-Blot"-Analyse

Eine „Southern-Blot"-Analyse kann Auskunft geben, ob das zu untersuchende Gen im Genom des jeweiligen Organismus als „Single-copy"-Gen vorkommt oder ob es sich um eine Genfamilie handelt.

Für die Identifizierung der Kopienzahl der putativen ATP/ADP-Transportproteine (AATP) in Vertretern der niederen Pflanzen (Algen) wurde aus Cyanophora paradoxa und Chlamydomonas reinhardtii genomische DNA isoliert und mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten (Kapitel 2.4.14). Die Ansätze wurden elektrophoretisch aufgetrennt und durch „Southern-Blotting" auf eine inerte Membran übertragen (Kapitel 2.4.15). Die genomische AATP-DNA wurde durch Hybridisierung mit einer homologen Sonde nachgewiesen. Zur Herstellung der radioaktiv markierten Sonde wurde als DNA-„Template" das jeweilige cDNA-Fragment aus Cyanophora bzw. Chlamydomonas eingesetzt (Kapitel 2.4.16 und 2.4.17), das mittels degenerierter Primer isoliert werden konnte (Kapitel 2.4.3; Tab. 2.5).

Bei der „Southern-Blot"-Analyse entstehen durch Spaltung der genomischen DNA für das jeweilige Enzym charakteristische DNA-Fragmente, wobei nur die detektiert werden, die mit der entsprechenden AATP-Sonde hybridisieren. Dabei ist die Anzahl der Fragmente davon abhängig, wie häufig das jeweilige Restriktionsenzym im Gen schneidet, und wieviele weitere homologe Gene im Genom vorkommen. Demnach ergibt das Bandenmuster des Radioautogramms, das nach der

Hybridisierung mit der homologen Sonde bei der „Southern-Blot“-Analyse entsteht, Hinweise auf die Kopienzahl des AATP-Gens im Algen-Genom.

Die in Abbildung 3.12 dargestellten Radioautogramme zeigen für die AATP-Gene aus Cyanophora paradoxa und Chlamydomonas reinhardtii nach Verdau mit den verschiedenen Restriktionsenzymen jeweils nur eine diskrete Bande. Dies deutet daraufhin, dass bei beiden Algen das AATP-Gen im Genom als ein „Single-copy“-Gen in einfacher Kopienzahl vorkommt.

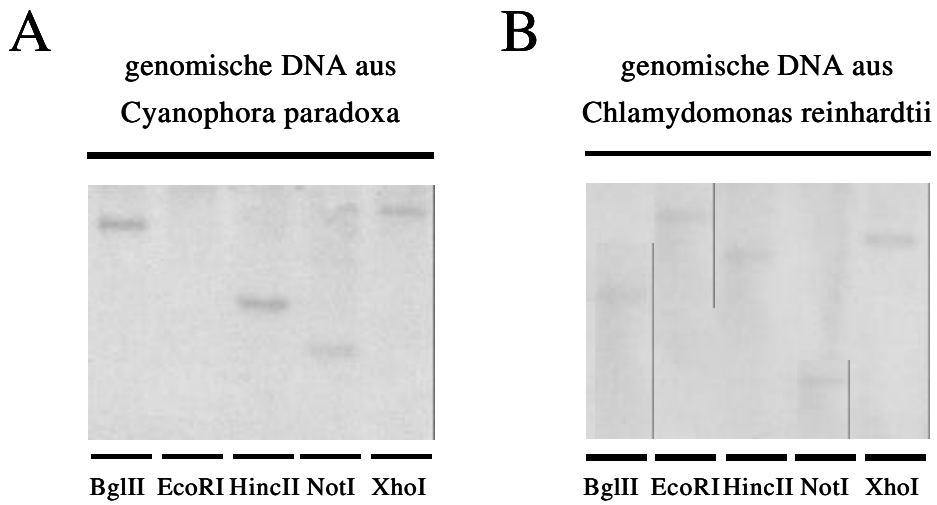


Abb. 3.12: „Southern-Blot“-Analyse mit genomischer DNA aus Cyanophora paradoxa (A) und Chlamydomonas reinhardtii (B), die mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten wurde. Pro Spur wurde jeweils 2,5 µg genomische DNA aufgetragen.

3.2.2 „Northern-Blot“-Analyse

Der Einfluß wechselnder Lichtbedingungen auf den Transkriptionsgehalt des plastidären ATP/ADP-Transportproteins in den Algen Cyanophora paradoxa und Chlamydomonas reinhardtii wurde mittels „Northern-Blot“-Analyse untersucht.

Hierzu wurden die entsprechenden Algen-Kulturen photoautotroph entweder bei Dauerlicht angezogen oder durch einen 12-stündigen Licht/Dunkelrhythmus (Wechsellicht) synchronisiert (Kapitel 2.2). Die im Licht/Dunkel-Wechsel kultivierten Algen wurden am Ende der Dunkelphase geerntet. Aus den Algen wurde Gesamt-RNA isoliert (Kapitel 2.4.7), die anschließend einer „Northern-Blot“-Analyse unterzogen wurde (Kapitel 2.4.8). Der Nachweis der AATP-mRNA erfolgte durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde. Als „Template“ für die Herstellung der homologen Sonde diente das jeweilige cDNA-Fragment aus Cyanophora bzw. Chlamydomonas

(Kapitel 2.4.16 und 2.4.17), das mittels der degenerierten Primern isoliert werden konnte (Kapitel 2.4.3; Tab. 2.5).

In der Abbildung 3.13 sind die Radioautogramme als Ergebnis der „Northern-Blot"-Analysen dargestellt. Im Fall von Cyanophora paradoxa lässt sich unter Wechsellicht-Bedingungen eine diskrete Bande von etwa 2,5 kb erkennen, die der Größe der AATP-mRNA entspricht. Dagegen ist der AATP-mRNA-Transkriptgehalt unter Dauerlichtbedingungen wesentlich geringer, da auf dieser Höhe nur eine schwache Bande detektiert werden konnte.

Bei der Grünalge wird eine gegensätzliche Beobachtung gemacht. Die größten Mengen an AATP-mRNA akkumulieren unter Dauerlichtbedingungen, während unter Wechsellicht die AATP-mRNA aufgrund geringer Transkriptgehalte kaum nachweisbar ist.

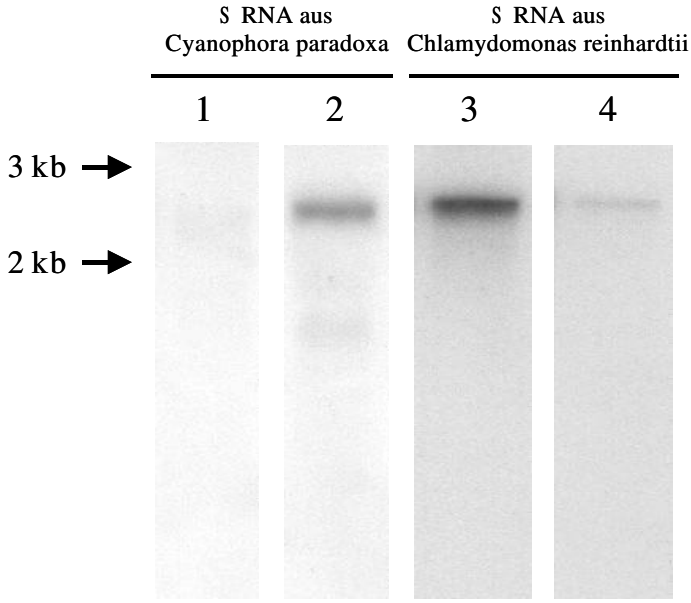


Abb. 3.13: „Northern-Blot"-Analyse mit Gesamt-RNA aus Cyanophora paradoxa und Chlamydomonas reinhardtii unter verschiedenen Lichtbedingungen. Die Algen-Kulturen wurden photoautotroph bei Dauerlicht angezogen (Spur 1 und 3) oder durch einen 12-stündigen Licht/Dunkelrhythmus (Spur 2 und 4) synchronisiert. Pro Spur wurden 10 µg Gesamt-RNA aufgetragen.

3.3 Heterologe Expression eines nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporters aus Holospora obtusa (NPTHo) in Escherichia coli

Der im Zuge der Genomsequenzierung des Eubakteriums Holospora obtusa identifizierte nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporter (NPTHo) wurde zur biochemischen Charakterisierung in Escherichia coli heterolog exprimiert. Mit Hilfe der bakteriellen Expression sollte die Transportfunktion des NPTHo-Proteins an intakten E.coli-Zellen analysiert werden, um zu überprüfen, ob dass Protein die ihm zugeschriebene Transportaktivität besitzt.

Die heterologe Expression von nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern aus Arabidopsis thaliana, Rickettsia prowazekii und Chlamydia trachomatis wurde bereits im bakteriellen System erfolgreich durchgeführt (TJADEN et al., 1998a; KRAUSE et al., 1985; TJADEN et al., 1999). Hierbei wurde gezeigt, dass die heterolog exprimierten Transportproteine funktionell in die E.coli-Cytoplasmamembran integrieren. Auf diese Weise erlaubt dieses Expressionssystem eine biochemische Charakterisierung der Transportproteine an den intakten E.coli-Zellen.

Auf Grund der erfolgreichen Expression bakterieller sowie pflanzlicher Nukleotid-Transporter zeichnet sich der E.coli-Stamm BL21 (DE3) pLysS in Verbindung mit dem pET16b-Vektor als ein effizientes Expressionssystem aus. Daher wurde die entsprechende kodierende DNA des nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporters aus Holospora obtusa (NPTHo) in den Expressionsevektor pET16b kloniert (Kapitel 3.3.1). Nach Transformation der BL21-Zellen wurde die heterologe Expression des NPTHo-Proteins und dessen Einbaus in die bakterielle Cytoplasmamembran nachgewiesen (Kapitel 3.3.2). Zur biochemischen Charakterisierung des funktionell exprimierten NPTHo-Proteins wurden an den intakten E.coli-Zellen Transportstudien durchgeführt (Kapitel 3.3.3).

3.3.1 Herstellung des Plasmid-Konstrukts zur heterologen Expression von NPTHo in E.coli

Zur heterologen Expression des nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporters aus Holospora obtusa (NPTHo) im E.coli-Stamm BL21 (DE3) pLysS wurde der Expressionsvektor pET16b verwendet (Kapitel 2.4.1 und 2.4.2). Die über die „Multiple cloning site“ (MCS) inserierte DNA steht im pET16b-Expressionsvektor unter der Kontrolle des T7-Promotors des gleichnamigen Bakteriophagens. Das Gen für die T7-RNA-Polymerase, dessen Expression durch Isopropylthiogalaktosid (IPTG) induziert werden kann, ist im BL21-Genom inseriert. Auf diese Weise wird eine gezielte Expression des Fremdproteins ermöglicht.

Für die NPTHo-Expression wurde der kodierende DNA-Abschnitt so hinter dem Histidin-kodierenden Bereich des pET16b-Vektors kloniert (pNL 8; Kapitel 2.7), dass an dem exprimierten Protein ein N-terminaler Histidin-„Tag“ angefügt wird. Ein solcher „Tag“ dient zur spezifischen Anreicherung mittels Metallchelat-Affinitätschromatographie und verändert nicht die biochemische Eigenschaften nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter aus Bakterien und Pflanzen (TJADEN et al., 1998a; TJADEN et al., 1999).

Die Abbildung 3.14 zeigt die Klonierungsstrategie für das Kontrukt pNL 8, mit dem der E.coli-Stamm BL21 transformiert wurde. Mittels PCR wurden die notwendigen Restriktionsschnittstellen durch spezifische Primer eingefügt (Kapitel 2.4.3; Tab. 2.5). Die korrekte Durchführung der Klonierungsschritte wurde jeweils durch Restriktions- und Sequenzanalysen kontrolliert.

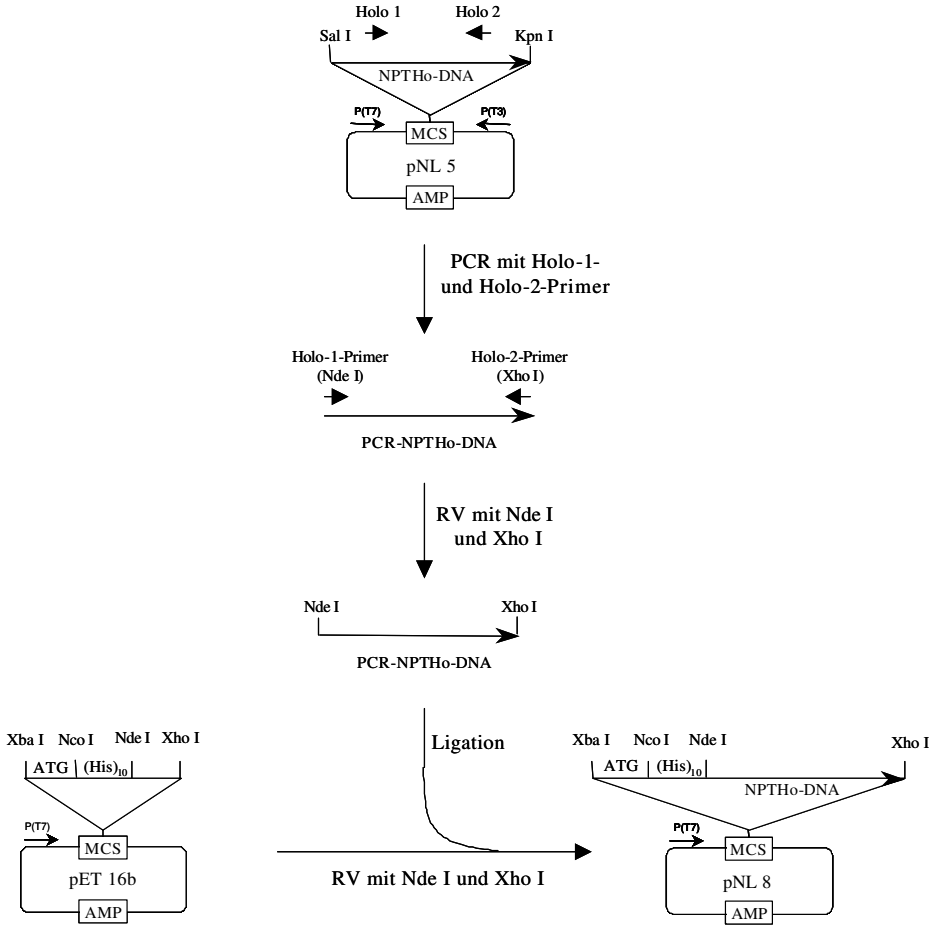


Abb. 3.14: Klonierungstrategie zur Herstellung des Konstruktes pNL8 zur heterologen Expression des nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporters aus Holospora obstusa (NPTHo). Zur Herstellung des Expressionskonstrukts pNL 8 wurde der kodierende Bereich des NPTHo-Proteins mittels PCR durch die Pfu-DNA-Polymerase amplifiziert (Kapitel 2.4.4.5). Als „Template“ diente das Konstrukt pNL 5, das die kodierende NPTHo-DNA enthält. Durch die Verwendung der PCR-Primer Holo-1 und Holo-2 (Kapitel 2.4.3; Tab. 2.5) wurden eine Nde I- und Xho I-Restriktionsschnittstelle in das amplifizierte PCR-Produkt eingeführt. Nach Restriktionsverdau des erhaltenen PCR-Produktes mit Nde I und Xho I konnte die genomische DNA „in frame“ in den mit Nde I und Xho I geöffneten pET16b-Vektor kloniert werden (pNL 8).

3.3.2 Nachweis der heterologen Expression von NPTHo in E.coli

Für eine biochemische Charakterisierung des heterolog exprimierten NPTHo-Transportproteins mittels Transportstudien an intakten E.coli-Zellen ist eine funktionelle Integration in die bakterielle Cytoplasmamembran notwendig. Wegen des geringen Expressionsniveaus ist der Nachweis heterolog exprimierter Membranproteine in den E.coli-Zellen erst durch eine radioaktive Markierung der neusynthetisierten Proteine aufgrund der hohen Sensitivität möglich. Daher sollte die bakterielle Expression des NPTHo-Proteins mittels radioaktiver Markierung mit [^{35}S]-Methionin nachgewiesen werden ([^{35}S]-Methionin-Assay; Kapitel 2.6.2). Um dies zu erreichen, wurde das im Kapitel 3.3.1 beschriebene Expressionskonstrukt pNL 8 in dem E.coli-Stamm BL21 (DE) pLysS transformiert und die Genexpression durch IPTG-Zugabe induziert (Kapitel 2.6). Als Kontrolle dienten induzierte BL21-Zellen mit dem „leerem“ pET16b-Vektor.

Der Nachweis der Integration des exprimierte NPTHo-Proteins in die E.coli-Plasmamembran wurde nach einer Membrananreicherung ermöglicht. Die angereicherten Membranproteine wurden anschließend in SDS-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt (Kapitel 2.3.2). Das heterolog exprimierte Protein lässt sich durch den Einbau der radioaktiv markierten Aminosäure im SDS-Gel durch eine abschließende Radioautographie detektieren.

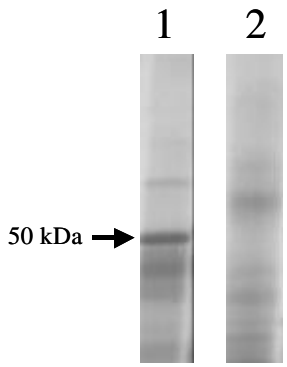


Abb. 3.15: Radioautogramm der elektrophoretisch aufgetrennten Membranproteine aus BL21-Zellen nach [^{35}S]-Methionin-Assay, die mit Expressionskonstrukt pNL 8 transformiert wurden. Als Kontrolle dienten BL21-Zellen mit dem „leeren“ Expressionsvektor pET16b.

Die Abbildung 3.15 zeigt das Radioautogramm des nach SDS-Gelelektrophorese getrockneten Gels. Im Vergleich zur Kontrolle ist in der Plasmamembranfraktion der NPTHo-exprimierenden BL21-Zellen eine diskrete Proteinbande zu erkennen. Dies ist der Nachweis für eine erfolgreiche Integration des nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporters aus Holospora obtusa in die bakterielle Plasmamembran. Die apparente Molekularmasse für das NPTHo-Protein konnte auf dem SDS-Gel mit ca. 50 kDa bestimmt werden und weicht damit von der tatsächlichen Molekularmasse (56,5 kDa) ab.

Dieser Unterschied in den Molekularmassen ist für Membranproteine aufgrund des hohen Anteils hydrophober Aminosäuren nicht ungewöhnlich. So besitzt das ricktettsielle Transportprotein TCL1Rp eine tatsächliche Molekularmasse von 56,7 kDa und erscheint in SDS-Gelen bei etwa 36,5 kDa wesentlich kleiner (Plano & Winkler, 1991).

3.3.3 Transportstudien an intakten E.coli-Zellen nach heterologer Expression von NPTHo

Um den Einbau des heterolog exprimierten nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporters aus Holospora obtusa (NPTHo) in die bakterielle Cytoplasmamembran zu überprüfen, wurden Transportmessungen an intakten induzierten E.coli-Zellen durchgeführt (Kapitel 2.6.4). Für die Transportstudien wurde der E.coli-Stamm BL21 (DE3) pLysS verwendet und mit dem Expressionskonstrukt pNL 8 transformiert (Kapitel 3.3.2). Die heterologe Genexpression erfolgte für die biochemische Charakterisierung des rekombinanten NPTHo-Proteins wie in Kapitel 2.6.4 beschrieben.

3.3.3.1 Zeitabhängigkeit der ATP- und ADP-Aufnahme an intakten E.coli-Zellen

Bei fast allen bislang bekannten nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter aus Pflanzen und Eubakterien handelt es sich um ATP/ADP-Antiporter, die ausschließlich den Transport von ATP und ADP ermöglichen und damit ein sehr definiertes Substratspektrum besitzen (KRAUSE et al., 1985; MÖHLMANN et al., 1998; TJADEN et al., 1998a; TJADEN et al., 1999). Lediglich das Transportprotein NPT2 aus Chlamydia trachomatis stellt vermutlich einen Uniporter dar, der alle vier Nukleotide ATP, CTP, GTP und UTP als Substrate akzeptiert (TJADEN et al., 1999).

Deshalb wurden die Transportversuche an den intakten und pNL 8-transformierten BL21-Zellen zunächst mit den radioaktiv markierten Nukleotiden [α ^{32}P]-ATP und [α ^{32}P]-ADP durchgeführt (Kapitel 2.6.4). Die zeitabhängige ATP- bzw. ADP-Aufnahme für das heterolog exprimierte NPTHo-Protein ist in Abbildung 3.16 dargestellt. Die Transportgeschwindigkeit für ATP und ADP steigt in den ersten zwei Minuten linear an. Nach etwa 10 Minuten strebt die Importgeschwindigkeit einem Gleichgewicht entgegen. Die nachfolgenden Transportstudien wurden innerhalb des zeitlinearen Bereichs durchgeführt, um eine Unterschätzung der Transportraten durch eine Limitierung der Aufnahmekapazität der E.coli-Zellen zu vermeiden.

Die Anfangsgeschwindigkeiten der [α ^{32}P]-ATP- und ADP-Aufnahme (gemessen bei zwei Minuten) liegt in beiden Fällen bei ca. 1,4 nmol ATP bzw. ADP $\cdot$ mg $^{-1}$ Protein. Die nicht-induzierten Kontrollen nehmen im Vergleich zu den induzierten kaum radioaktiv markiertes ATP bzw. ADP auf, was eine von der Induktion abhängige Nukleotid-Aufnahme bestätigt.

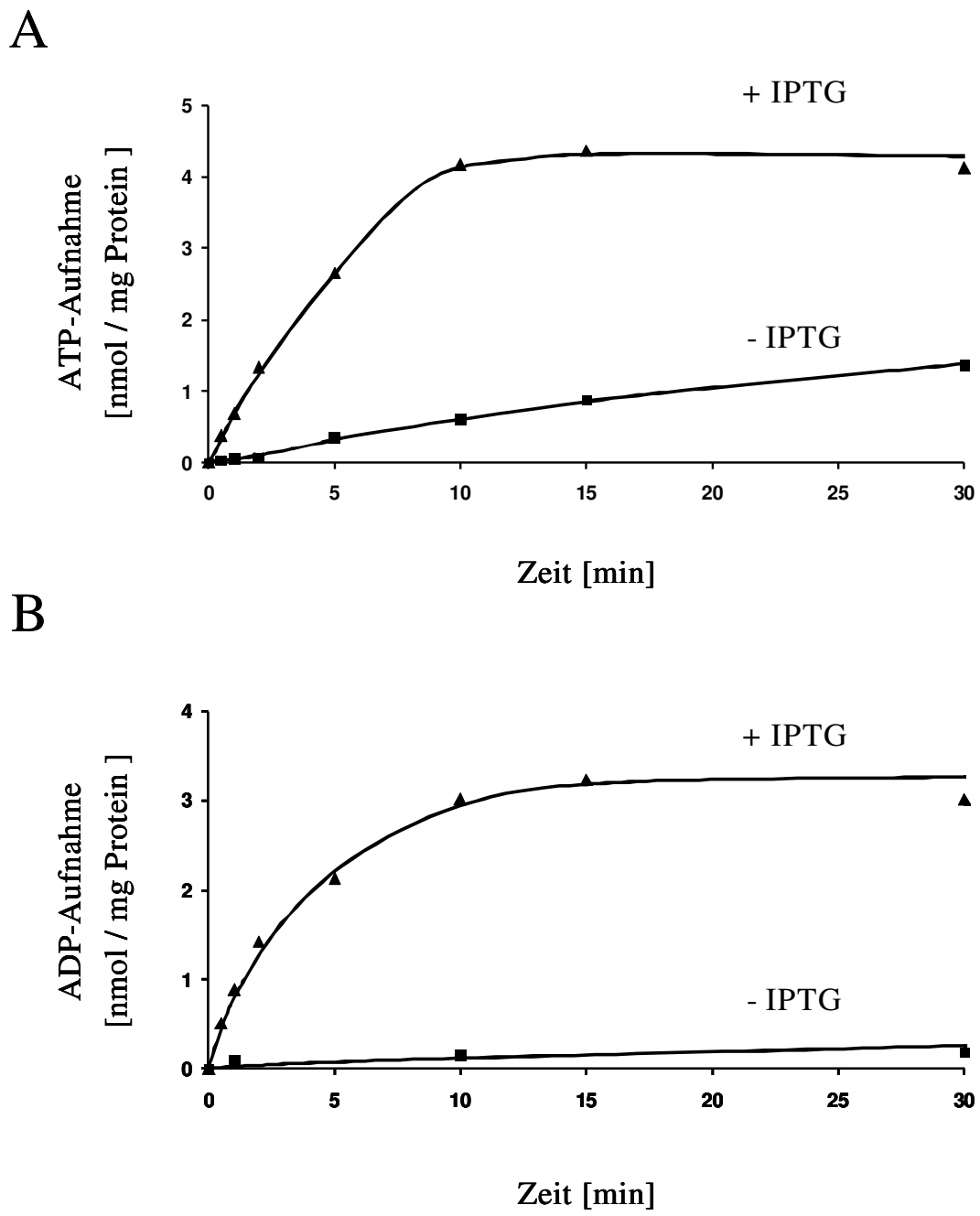


Abb. 3.16: Zeitabhängigkeit der [a ^{32}P]-ATP- und [a ^{32}P]-ADP-Aufnahme in intakte E.coli-Zellen des Stammes BL21 (DE3) pLsyS, die mit dem Expressionskonstrukt pNL 8 transformiert wurden. Die induzierten (+IPTG) Zellen wurden (A) in Anwesenheit von 50 µM [α ^{32}P]-ATP und (B) in Anwesenheit von 50 µM [α ^{32}P]-ADP für die angegebenen Zeiten bei 30°C inkubiert. Die dargestellten Werte repräsentieren den Mittelwert aus Triplikaten. Als Kontrolle dienten nicht-induzierte (- IPTG) BL21-Zellen mit dem Expressionskonstrukt pNL 8.

3.3.3.2 Einfluß verschiedener Effektoren auf die ATP-Aufnahme

Zur Untersuchung der Substratspezifität des NPTHo-Proteins wurde der Effekt verschiedener Metabolite auf die ATP-Aufnahme analysiert. Damit sollte überprüft werden, ob der nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporter aus Holospora obtusa weitere Nukleotide oder auch andere Metabolite als mögliche Transportsubstrate akzeptiert. Außerdem sollte der Einfluß von CCCP als Entkoppler des pH-Gradienten über die E.coli-Membran untersucht werden. Der Anlaß für diese Untersuchung ist das NPT2-Protein aus Chlamydia trachomatis, bei dem abweichende Substratspezifitäten beobachtet werden konnten (TJADEN et al., 1999).

Die Transportversuche wurden an den intakten und pNL 8-transformierten BL21-Zellen mit dem radioaktiv markierten Nukleotid [α ^{32}P]-ATP durchgeführt (Kapitel 2.6.4). Die potentiellen Inhibitoren wurden in 5facher Konzentration gegenüber der ATP-Konzentration eingesetzt, CCCP wurde in einer Konzentration von 50 µM zugegeben.

Das Säulendiagramm in Abbildung 3.17 fasst die Ergebnisse der Inhibitor-Versuche zusammen. Die ATP-Aufnahme des NPTHo-Proteins wird nur durch ADP deutlich gehemmt, da die Transportrate auf ca. 35 % gemindert wird. Die anderen getesteten Nukleotide und Metabolite haben keinen signifikanten inhibitorischen Effekt. Auch zeigt der Abbau des pH- und Ladungsgradienten durch CCCP keinen subtantiellen Einfluß auf die ATP-Aufnahme durch das NPTHo-Protein. Somit weist das NPTHo-Protein in Übereinstimmung mit den nicht-mitochondrialen ATP/ADP-Transporter, und mit Ausnahme des NPT2-Proteins aus Chlamydia trachomatis, kein differentes Substratspektrum auf.

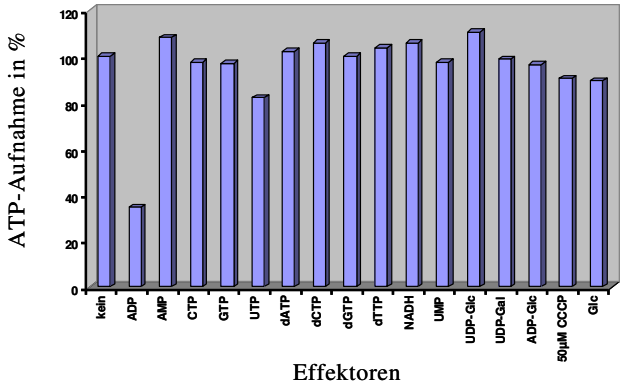


Abb. 3.18: Einfluß verschiedener Effektoren auf die [a ^{32}P]-ATP-Transportrate nach heterologer Expression von NPTHo in BL21-Zellen. Die induzierten Zellen wurden in Anwesenheit von 50 µM [α ^{32}P]-ATP für 2 Minuten bei 30°C inkubiert. Die dargestellten Werte repräsentieren den Mittelwert aus Triplikaten. Die Effektoren sind in 5-facher Konzentration gegenüber ATP eingesetzt. Der Entkoppler CCCP wurde in einer Konzentration von 50 µM bzw. 500 µM zugegeben. Die Kontrolle ohne Effektoren ist auf 100 % gesetzt.

3.3.3.3 Bestimmung der apparenten K_M- und V_{max}-Werte für ATP und ADP

Um die Affinität des Transportproteins NPTHo zu seinen Substraten ATP und ADP zu analysieren, wurde die Abhängigkeit der ATP- bzw. ADP-Aufnahme von steigenden Substratkonzentrationen ermittelt. Die Transportversuche wurden an den intakten und pNL 8-transformierten BL21-Zellen mit den radioaktiv markierten Nukleotiden [α ^{32}P]-ATP und [α ^{32}P]-ADP durchgeführt (Kapitel 2.6.4).

Die Abbildung 3.18 zeigt, dass die ATP- bzw. ADP-Aufnahme in Abhängigkeit von der Substratkonzentration einer Michaelis-Menten-Kinetik folgt. Aus dieser Darstellung geht hervor, dass bei einer ATP-Konzentration von etwa 280 nmol ATP · mg $^{-1}$ Protein · h $^{-1}$ die ATP-Aufnahme apparent gesättigt erscheint. Die ADP-Aufnahme erreicht bei einer ADP-Aufnahme von etwa 250 nmol ADP · mg $^{-1}$ Protein · h $^{-1}$ den gesättigten Bereich.

Die doppelt-reziproke Auftragung nach Lineweaver-Burk erlaubt die Berechnung der K_M- und V_{max}-Werte für die Substrate ATP und ADP. Die kinetischen Daten für das NPTHo-Protein sind den bereits ermittelten Daten nicht-mitochondrialer ATP/ADP-Transporter aus Pflanzen und Bakterien in der Tabelle 3.2 gegenübergestellt. Dabei wurde das NPT2-Transportprotein aus Chlamydia trachomatis nicht berücksichtigt, da es sich nicht um einen ATP/ADP-Antiporter handelt, sondern um einen Nukleotid-Uniporter, der die vier Nukleotide ATP, CTP, GTP und UTP vermutlich im Symport mit Protonen transportiert (TJADEN et al., 1999).

Tab. 3.2: Apparente K_M- und V_{max}-Werte des NPTHo-Proteins im Vergleich mit den bakteriellen und pflanzlichen Nukleotid-Transportern. Die K_M- bzw. V_{max}-Werte der aufgeführten Nukleotid-Transporter wurden in einer Sättigungskinetik im heterologen Expressionssystem an intakten E.coli-Zellen bestimmt. Die Daten zeigen den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Die K_M-Werte sind in µM, die V_{max}-Werte in nmol ATP bzw. ADP · mg $^{-1}$ Protein · h $^{-1}$ angegeben.

	AATP1At	AATP2At	AATP1St	TLC1 Rp	NPT1 Ct	NPT Ho
K_M (ATP)	17	22	25	75	8	300
V_{max}(ATP)	28	7	100	270	370	285
K_M (ADP)	12	20	20	50	39	340
V_{max}(ADP)	80	24	200	350	625	250

Das NPTHo-Protein besitzt wie das Transportprotein NPT2Ct, überraschend geringe Substrataffinitäten, wobei die Affinität zu ATP geringfügig höher als zu ADP ist (K_M-Wert für ATP = 300 µM; K_M-Wert für ADP = 340 µM). Im Vergleich dazu zeichnen sich die anderen Nukleotid-Transporter durch K_M-Werte für beide Substrate aus, die im Bereich von 10 bis 50 µM liegen

(Tab. 3.2). Außerdem weisen die übrigen Transportproteine stets eine höhere Affinität für ADP als für ATP auf. Ein weiterer Unterschied liegt in der maximalen Transportgeschwindigkeit, die für ADP bis zu dreimal höher als für ATP ist. Dagegen transportiert das NPTHo-Protein beide Substrate mit annähernd gleicher Geschwindigkeit.

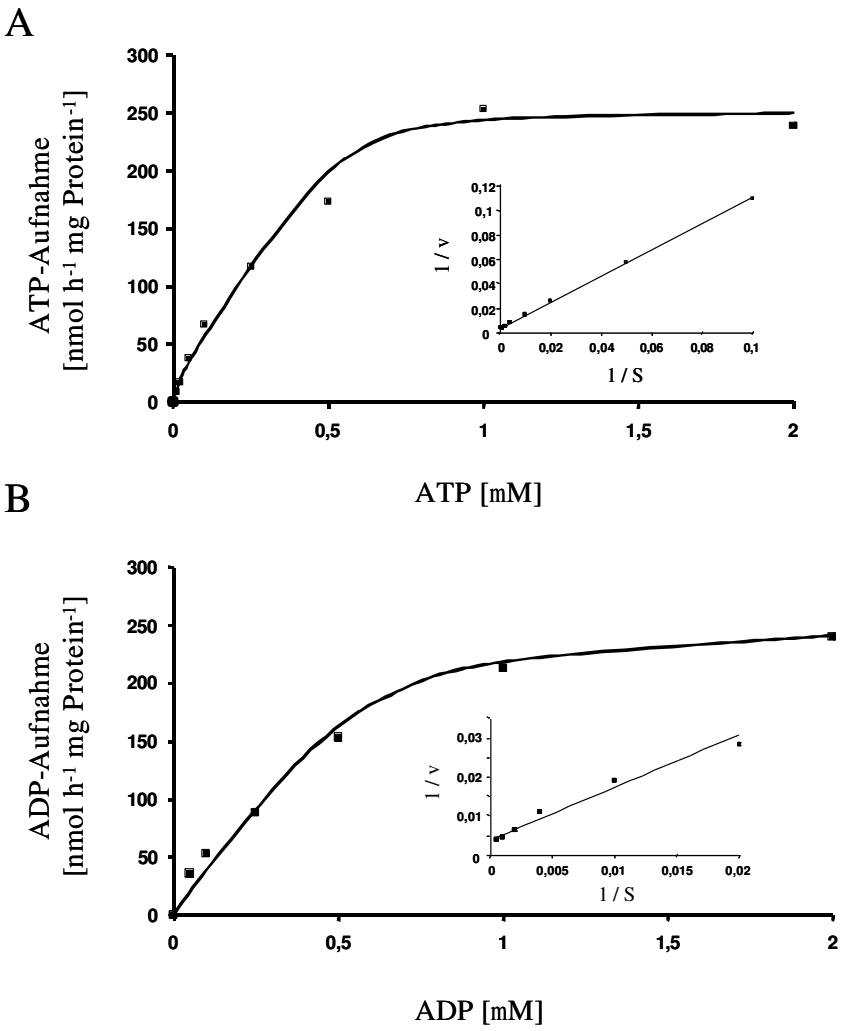


Abb. 3.18: Abhängigkeit der [a ^{32}P]-ATP- und [a ^{32}P]-ADP-Aufnahme von steigenden Substratkonzentrationen in intakte BL21-Zellen, die mit dem Expressionskonstrukt pNL 8 transformiert wurden. Die IPTG-induzierten E.coli-Zellen wurden für 2 Minuten bei 30°C mit den angegebenen Konzentrationen an [α ^{32}P]-ATP bzw. [α ^{32}P]-ADP inkubiert. Die dargestellten Werte repräsentieren jeweils den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten. Einschub: Lineweaver-Burk-Darstellung der jeweiligen ATP- und ADP-Aufnahme. (A) ATP-Aufnahme: Der resultierende K_M-Wert beträgt 300 µM und der V_{max}-Wert liegt bei 285 nmol ATP · mg $^{-1}$ Protein · h $^{-1}$. (B) ADP-Aufnahme: Der resultierende K_M-Wert beträgt 340 µM und der V_{max}-Wert liegt bei 250 nmol ATP · mg $^{-1}$ Protein · h $^{-1}$.

3.3.3.4 Analyse eines „Counter-exchange“-Mechanismus mit Hilfe von Efflux-Versuchen

Für die bislang charakterisierten ATP/ADP-Transporter aus Pflanzen und Bakterien (mit Ausnahme von NPT2Ct) konnte gezeigt werden, dass ihre Substrate in einem striktem Gegentausch-Mechanismus („Counter-exchange“) transportiert werden. Mit Hilfe von Efflux-Versuchen sollte untersucht werden, inwieweit der Transport von ATP und ADP bei dem NPTHo-Protein ebenfalls nach diesem Mechanismus erfolgt (Kapitel 2.6.4).

Bei den Efflux-Versuchen wurden zunächst die mit dem Expressionskonstrukt transformierten und IPTG-induzierten BL21-Zellen „vorbeladen“, indem die Bakterienzellen für eine vorgegebene Zeitspanne mit [α ^{32}P]-ATP bzw. [α ^{32}P]-ADP inkubiert wurden. Die Vorbeladung führt zur Aufnahme des jeweiligen radioaktiv markierten Nukleotids, vermittelt durch das heterolog exprimierte NPTHo-Transportprotein. Der Export der Nukleotide aus den E.coli-Zellen sollten im Falle eines Gegentausch-Mechanismus abhängig sein von der Präsenz des außen angebotenen Gegentausch-substrats. Um diesen Transportmechanismus zu überprüfen, wurden den vorbeladenen BL21-Zellen die Nukleotide ATP und ADP als Gegentauschsubstrate angeboten. Als Kontrolle wurde der Efflux ohne Gegentauschsubstrate in Kaliumphosphat- bzw. HEPES-Puffermedium analysiert.

Mittels einer dünnschichtchromatographischen Auftrennung wurden die exportierten, radioaktiv markierten [α ^{32}P]-Nukleotide detektierbar. Da die intakten E.coli-Zellen die importierten Nukleotide verstoffwechseln können, kann auf dieser Weise festgestellt werden, ob es sich bei der exportierten Radioaktivität um radioaktives ATP oder ADP handelt. Der Anteil der exportierten Nukleotide konnte anschließend im Szintillationszähler quantifiziert werden.

Als Vergleich wurden ebenfalls Efflux-Versuche für den plastidären ATP/ADP-Transporter aus Arabidopsis thaliana AATP1At durchgeführt. Für die heterologe Expression des AATP1At wurde der E.coli-Stamm BL21 (DE3) pLysS und das Expressionskonstrukt pET 6 verwendet (TJADEN et al., 1998a). Aus den Radioautogrammen des AATP1At-Proteins ist ersichtlich (Abb. 3.19), dass als radioaktives Nukleotid sowohl ATP als auch ADP im Gegentausch mit ATP bzw. ADP exportiert wird. Der größte Anteil an radioaktiven Nukleotiden erscheint jedoch als ADP, woraus sich sowohl für die ATP- als auch für ADP-Vorbeladung ein ATP/ADP-Verhältnis von etwa 0,07 bis 0,17 ergibt (Tab. 3.3). Bei den Efflux-Experimenten ohne Gegentauschsubstrat wurde sowohl in Kaliumphosphat- als auch in HEPES-Puffermedium weder ATP noch ADP exportiert. Die geringen ADP-Kontaminationen im Kaliumphosphat-Puffermedium lassen sich eventuell auf unsauberes Waschen der E.coli-Zellen nach der ADP-Vorbeladung zurückführen.

Die DC-Analyse für das NPTHo-Protein führt dagegen zu abweichenden Ergebnissen (Abb. 3.20). Sowohl bei der ATP- als auch bei der ADP-Vorbeladung stimulieren ATP und ADP als Gegentauschsubtrate ausschließlich den ADP-Export, nicht aber ATP-Export. Dieses Ergebnis geht aus dem ATP/ADP-Verhältnis von ungefähr 0,01 deutlich hervor, was einer ATP-Exportrate von einem Prozent entspricht (Tab. 3.3). Ohne Gegentauschsubstrat wird bei den Efflux-Experimenten

auch nur ADP als radioaktives Nukleotid freigesetzt, jedoch nur in Kaliumphosphat-Puffermedium. Damit weist der nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporter aus Holospora obtusa vermutlich einen bisher unbekannten Transportmechanismus auf.

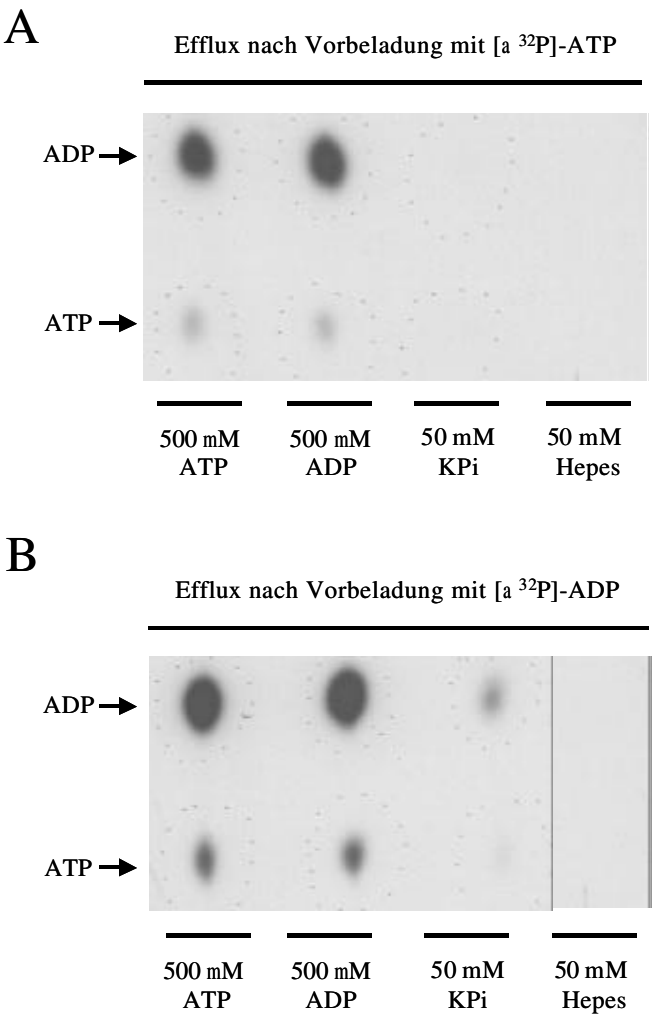


Abb. 3.19: Radioautogramm des Efflux-Experiments mit AATP1At, das die Auftrennung von radioaktiv markiertem ATP und ADP mittels Dünnschichtchromatographie zeigt. Die induzierten E.coli-Zellen mit dem Expressionskonstrukt pET6 wurden für 2 Minuten mit 100 µM [α ^{32}P]-ATP (A) bzw. [α ^{32}P]-ADP (B) vorbeladen. Die Efflux-Versuche erfolgten für 2 Minuten mit den Gegentauschsubstraten ATP und ADP (jeweils 500 µM) sowie in Gegenwart von 50 mM Kaliumphosphat- bzw. HEPES-Puffermedium (pH 7,2). Nach Zentrifugation der Bakterienzellen wurde der Überstand mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt.

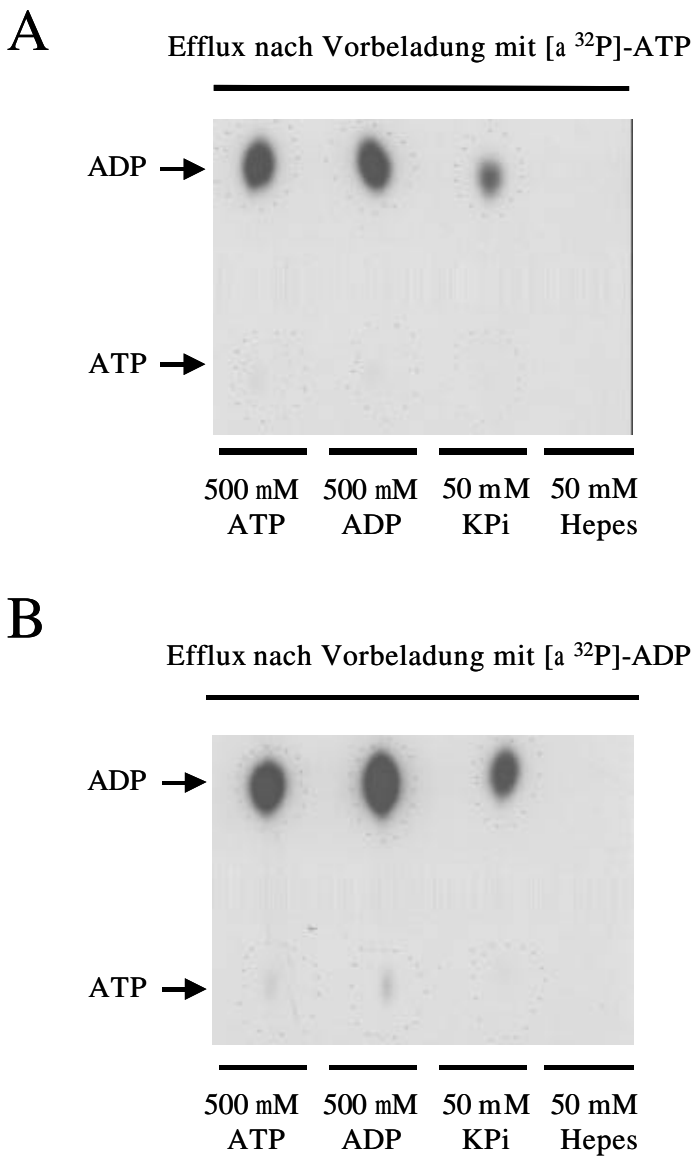


Abb. 3.20: Radioautogramm des Efflux-Experiments mit NPTHo, das die Auftrennung von radioaktiv markiertem ATP und ADP mittels Dünnschichtchromatographie zeigt. Die induzierten E.coli-Zellen mit dem Expressionskonstrukt pNL 8 wurden für 2 Minuten mit 100 µM [α ^{32}P]-ATP (A) bzw. [α ^{32}P]-ADP (B) vorbeladen. Die Efflux-Versuche erfolgten für 2 Minuten mit den Gegentauschsubstraten ATP und ADP (jeweils 500 µM) sowie in Gegenwart von 50 mM Kaliumphosphat- bzw. HEPES-Puffermedium (pH 7,2). Nach Zentrifugation der Bakterienzellen wurde der Überstand mittels Dünnschichtchromatographie aufgetrennt.

Tab. 3.3: Die bei den Efflux-Experimenten erhaltenen ATP/ADP-Verhältnisse für das AATP1At- und NPTHo-Protein. Der Anteil der exportierten, radioaktiv markierten Adenylate wurde nach der DC-Analyse im Szintillationszähler quantifiziert, aus dem das jeweilige ATP/ADP-Verhältnis ermittelt wurde.

	Efflux nach Vorbeladung mit [α^{32}P]-ATP			
ATP/ADP-Verhältnis	ATP	ADP	KH_2PO_4	HEPES
AATP1At	0,1	0,07	-	-
NPTHo	0,009	0,014	0,011	-
	Efflux nach Vorbeladung mit [α^{32}P]-ADP			
ATP/ADP-Verhältnis	ATP	ADP	KH_2PO_4	HEPES
AATP1At	0,17	0,16	0,1	-
NPTHo	0,014	0,017	0,014	-

3.3.3.5 Analyse der Nukleotid-Verteilung in den E.coli-Zellen nach der ATP- bzw. ADP-Vorbeladung

Es sollte überprüft werden, ob sich die abweichenden Efflux-Ergebnisse im Fall des NPTHo-Proteins eventuell durch ein verändertes Nukleotid-Verhältnis in den Bakterienzellen erklären lässt oder ob es sich hierbei um einen Transporter-bedingten Effekt handelt (Kapitel 3.3.3.4).

Da intakte E.coli-Zellen aufgenommenes ATP bzw. ADP verstoffwechseln können, erfolgte eine Untersuchung, zu welchen Anteilen beide Nukleotide in den Bakterienzellen nach der Vorbeladung mit radioaktiv markiertem ATP bzw. ADP vorliegen. Diese Analyse wurde sowohl mit den AATP1At- als auch mit den NPTHo-exprimierenden E.coli-Zellen durchgeführt.

Dazu wurden die E.coli-Zellen zunächst mit den radioaktiv markierten Nukleotiden vorbeladen, zur Entfernung der nicht aufgenommenen Radioaktivität gewaschen und schließlich bei 95°C abgetötet. Das Bakterienlysat wurde schließlich auf DC-Platten aufgetragen. Auf diese Weise konnten die im Zuge der Vorbeladung importierten Nukleotide mittels Dünnschichtchromatographie identifiziert werden.

Das Radioautogramm zeigt die Auftrennung der radioaktiv markierten Nukleotide durch eine Dünnschichtchromatographie. Hieraus wird deutlich, dass die AATP1At- und NPTHo-exprimierenden E.coli-Zellen annähernd das gleiche ATP/ADP-Verhältnis aufweisen (Abb. 3.21). In beiden Fällen liegt sowohl nach ATP- als auch ADP-Vorbeladung etwa 1,3-mal mehr ADP als ATP in den E.coli-Zellen radioaktiv markiert vor.

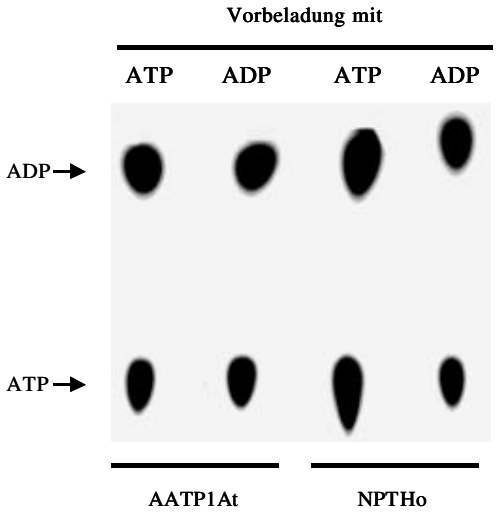


Abb. 3.21: Radioautogramm der dünnschichtchromatographischen Auftrennung der Nukleotide, die das ATP/ADP-Verhältnis in den E.coli-Zellen nach Vorbeladung mit radioaktiv markiertem ATP bzw. ADP zeigt. Die induzierten E.coli-Zellen mit den Expressionskonstrukten pET 6 bzw. pNL 8 wurden für 2 Minuten mit 100 µM [α ^{32}P]-ATP- bzw. -ADP vorbeladen. Nach Entfernung der nicht aufgenommenen Radioaktivität wurden die Bakterien bei 95°C für 5 Minuten abgetötet. Ein Aliquot des Bakterienlysats wurde mittels Dünnschichtchromatographie analysiert.

3.3.3.6 Einfluß von Kaliumphosphat auf die ATP- bzw. ADP-Aufnahme

Um den bei den Efflux-Versuchen des NPTHo-Proteins beobachteten Phosphat-Effekt näher zu untersuchen (Kapitel 3.3.3.4), wurde die ATP- bzw. ADP-Aufnahme (Influx) an NPTHo-exprimierenden E.coli-Zellen in Gegenwart von Kaliumphosphat- bzw. HEPES-Puffermedium durchgeführt. Die Transportversuche erfolgten an den intakten pET 6- bzw. pNL 8-transformierten BL21-Zellen mit [α ^{32}P]-ATP (Kapitel 2.6.4).

Aus der Abbildung 3.22 ist ersichtlich, dass die ATP-Transportrate des NPTHo-Proteins sowohl im Kaliumphosphat- als auch im HEPES-Puffermedium annähernd gleich ist. Dagegen ist die ADP-Transportrate im 50 mM HEPES-Puffermedium deutlich gemindert.

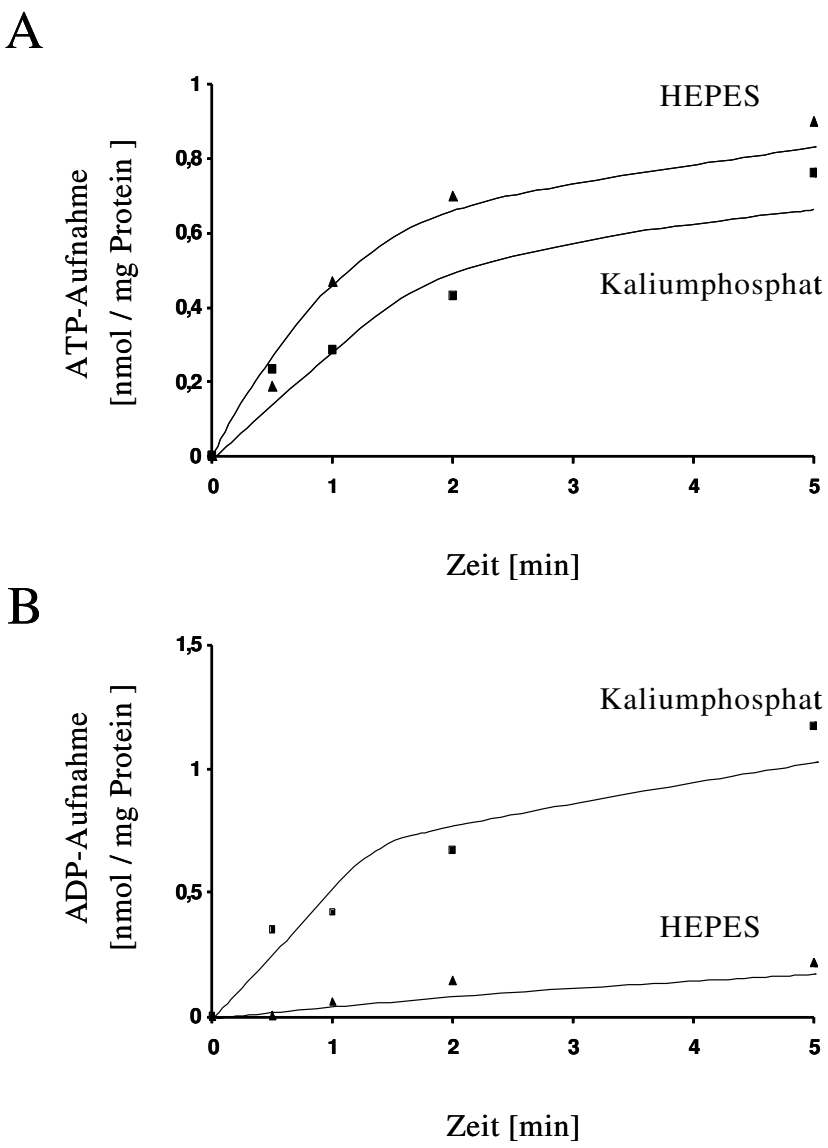


Abb. 3.22: Einfluß von Kaliumphosphat- und HEPES-Puffermedium (pH 7,2) auf die ATP-Aufnahme (A) bzw. ADP-Aufnahme (B) von NPTHo. Die induzierten E.coli-Zellen mit dem Expressionskonstrukt pNL 8 wurden in Anwesenheit von 50 µM [α ^{32}P]-ATP bzw. [α ^{32}P]-ADP in 50 mM Kaliumphosphat- oder HEPES-Puffermedium (pH 7,2) für die angegebenen Zeiten inkubiert. Die dargestellten Werte repräsentieren den Mittelwert aus Triplikaten.

4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit ist es, zur Aufklärung der Evolution plastidärer und eubakterieller Nukleotid-Transporter beizutragen, deren Entstehung bislang noch völlig ungeklärt ist. Aufgrund biochemischer und molekularer Eigenschaften fasst man die in Plastiden höherer Pflanzen (Spermatophyta) und in obligat intrazellulären, bakteriellen Endoparasiten identifizierten Proteine zur Familie der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter zusammen. Unter Verwendung molekularbiologischer Methoden und Computer-gestützter Analysen konnten weitere, bisher unbekannte homologe Transportproteine in verschiedenen Pro- und Eukaryoten nachgewiesen werden. In Kapitel 4.1 wird das Vorkommen und die verwandtschaftliche Beziehung (Phylogenie) dieser Transporter innerhalb der Organismenreiche diskutiert. Darüber hinaus kann eine eventuelle evolutive Verbindung mit den Transportern der „Mitochondrial Carrier Family“ (MCF) hergestellt werden, aus der sich die evolutive Entstehung nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter ableiten lässt. Im anschließenden Kapitel 4.2 werden die molekularen Charakteristika nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter in eukaryotischen Algen (niedere Pflanzen) eingehender betrachtet. Ferner werden in Kapitel 4.3 die biochemischen Eigenschaften eines nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporters aus Holospora obtusa vorgestellt, der vermutlich einen bisher unbekannten Transportmechanismus aufweist.

4.1 Evolution nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter

Bislang konnten in einigen Plastiden höherer Pflanzen sowie in zwei intrazellulären Eubakterien Nukleotid-Transporter identifiziert werden, deren Aminosäuresequenz signifikante Ähnlichkeiten aufweisen. Diese Proteine besitzen jedoch keine substantiellen Gemeinsamkeiten zu den mitochondrialen Nukleotid-Transportern der MCF-Familie (WINKLER & NEUHAUS, 1999).

Aufgrund des weiten phylogenetischen Abstandes zwischen Pflanzen und Eubakterien ist die Sequenzverwandtschaft dieser nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter bemerkenswert. Um den evolutiven Zusammenhang der vermutlich miteinander verwandten Transportproteine zu verstehen, war das Ziel dieser Arbeit, weitere homologe Proteine in den verschiedenen Organismen zu identifizieren und zusammen mit den bisher bekannten Transportern die Entstehung dieser Familie zu rekonstruieren.

4.1.1 Vorkommen nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter

Für die Untersuchung zum Vorkommen nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter wurden aus evolutiver Sicht interessante Vertreter der Pro- und Eukaryoten ausgewählt. Auf diese Weise konnte für eine molekularbiologische bzw. Computer-gestützte Analyse ein weites Spektrum der Organismenreiche abgedeckt werden (Kapitel 3.1).

Vorkommen nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter innerhalb der Eukaryoten

Das Reich der Eukaryoten umfasst sowohl einfache heterotrophe Organismen (Protisten und Protozoen) als auch vielzellige Organismen mit wesentlich komplexeren Strukturen und Funktionen, zu denen die Pilze, Tiere und Pflanzen gezählt werden. Im Rahmen der Arbeit wurde umfassend untersucht, inwiefern der nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporter in allen Abteilungen der Eukaryoten verbreitet ist (Kapitel 3.1).

Zu Beginn dieser Arbeit waren nur in den höheren Pflanzen Arabidopsis, Raps, Kartoffel und Mais DNA-Sequenzen bekannt, die für einen nicht-mitochondrialen, plastidären Nukleotid-Transporter kodieren (KAMPFENKEL et al., 1995; TJADEN et al., 1998a; MÖHLMANN et al., 1998; NEUHAUS, unveröffentlicht). Mittels „Targeting"-Experimente an isolierten Plastiden konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass das in-vitro-synthetisierte pflanzliche Transportprotein in der inneren Hüllmembran der Plastiden lokalisiert ist (NEUHAUS et al., 1997). Bezüglich der physiologischen Funktion wird angenommen, dass der plastidäre Transporter den ATP-Import, im strikten Gegentausch mit ADP, in die Plastiden katalysiert (HELDT, 1969; MÖHLMANN et al., 1998; TJADEN et al., 1998a). So haben NEUHAUS & EMES (2000) postuliert, dass vermutlich alle höheren Pflanzen (Spermatophyta) einen plastidären ATP/ADP-Transporter besitzen, um die Plastiden mit ausreichend Energie in Form von ATP zu versorgen.

In dieser Arbeit wurden weitere, bisher unbekannte homologe Transportproteine in höheren Pflanzen, und zwar innerhalb der Angiospermen identifiziert (Kapitel 3.1.3; Tab. 3.1). Die Angiospermen (Bedecktsamer) lassen sich in die Klassen Magnoliopsida (niedere Dikotylen), Dicotyledoneae (höhere Dikotylen) und Monocotyledoneae untergliedern (SOLTIS et al., 1998). Insgesamt weist diese Abteilung, zu der die meisten Nutz- und Kulturpflanzen angehören, die größte Artenfülle auf. Daher stehen für zahlreiche Mitglieder dieser Abteilung Sequenz-Informationen durch entsprechende EST- und Genom-Projekte zur Verfügung, die in der vorliegenden Doktorarbeit als Grundlage zur Analyse genutzt wurden.

Es konnten in verschiedenen Familien der dikotylen Pflanzen DNA-Fragmente für putative plastidäre ATP/ADP- Transporter identifiziert werden (siehe Anhang; Kapitel 7.2). Neben der Kartoffel (Solanum tuberosum) als Nachtschattengewächs (Solanaceae) existiert auch in der Tomate (Lycopersicon esculentum) ein homologes Transportprotein. Des Weiteren liegen für die Fabaceen Medicago truncatula (Hopfenklee), Lotus japonicus (Hornklee) sowie Sojabohne (Soja hispida) DNA-Sequenzen vor, die für einen plastidären ATP/ADP-Transporter kodieren. Ebenfalls konnte für die echte Pfefferminze (Mentha piperita), die zur Familie der Lamiaceen (Lippenblütler) gehört, und für die „Mittagsblume" Mesembryanthemum crystallinum, die sich durch einen Salz-induzierbaren CAM-Stoffwechsel („Crassulacean Acid Metabolism") auszeichnet, auf molekularer Ebene nachgewiesen werden, dass sie ein homologes Protein besitzen. Auch in monokotylen Pflanzen wurden homologe DNA-Sequenzen identifiziert, die vermutlich für einen plastidären ATP/ADP-Transporter kodieren: Hordeum vulgare (Gerste), Sorghum bicolor (Hirse), Oryza sativa (Reis) und Triticum aestivum

(Weizen). Alle diese Vertreter sind wichtige Kulturpflanzen und ordnen sich in die Familie der Poaceen ein (siehe Anhang; Kapitel 7.2).

Darüber hinaus konnte in der Arbeit gezeigt werden, dass die Existenz plastidärer ATP/ADP-Transporter nicht nur auf höhere Pflanzen beschränkt ist, sondern dass auch niedere Pflanzen (Algen) einen entsprechendes Protein besitzen (Tab. 3.1). Aufgrund ihrer ursprünglicheren Entstehung ist die Analyse der Algen für die Evolution dieser Transporter-Familie von großem Interesse. In repräsentativen Vertreter der Glaukophyta, Chlorophyta, Rhodophyta und Heterokontophyta wurden bislang unbekannte DNA-Teilsequenzen für putative plastidäre ATP/ADP-Transporter auf molekularer Ebene entdeckt (siehe Anhang; Kapitel 7.2).

Als Vertreter der Glaukophyta wurde in Cyanophora paradoxa ein cDNA-Fragment eines putativen plastidiären ATP/ADP-Transporters nachgewiesen (siehe Anhang; Kapitel 7.2.2). Die Familie der Glaukophyta werden als die ursprünglichsten Algen angesehen, da sie sich durch einen zum Cyanobakterium ähnlichen Plastiden mit einer rudimentären prokaryotischen Zellwand auszeichnen (LÖFFELHARDT & BOHNERT, 1994). Auch Grünalgen (Chlorophyta) besitzen als unmittelbare Vorläufer der höheren Pflanzen (BHATTACHARYA & MEDLIN, 1998) einen plastidären ATP/ADP-Transporter. Eine entsprechende kodierende DNA-Sequenz konnte sowohl in Chlamydomonas reinhardtii als auch in Dunaliella salina nachgewiesen werden (siehe Anhang; Kapitel 7.2.1 und 7.2.3). Auf molekularer Ebene wurde ebenfalls ein putativer plastidärer ATP/ADP-Transporter in der Kieselalge Odontella sinensis identifiziert (siehe Anhang; Kapitel 7.2.10). Diese zur den Heterokontophyta gehörende Alge weist, wie alle anderen Mitglieder dieser Abteilung, komplexe Plastiden auf, deren Entstehung auf eine sekundäre Endosymbiose zurückzuführen ist (MAIER, 1996). Des Weiteren wurde in einem Vertreter der Rotalgen (Rhodophyta), Porphyra yezoensis, ein cDNA-Sequenzabschnitt isoliert, der vermutlich für einen plastidären ATP/ADP-Transporter kodiert (siehe Anhang; Kapitel 7.2.12). Aus der thermoacidophilen Rotalge Galdieria sulphuraria wurde bereits zuvor ein homologes Transportprotein im Rahmen einer Diplomarbeit molekular und biochemisch charakterisiert (STAMME, 1999).

Die weite Verbreitung des plastidären ATP/ADP-Transporters innerhalb der niederen und höheren Pflanzen legt somit den Schluss nahe, dass im gesamten Pflanzenreich und damit auch in den bisher nicht analysierten Moosen (Bryophyta), Farnen (Pteridophyta) und Gymnospermen (Nacktsamer) homologe Proteine existieren. Darüber hinaus wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit zahlreiche Genom- und EST-Sequenzdatenbanken von einzelligen Eukaryoten sowie von Pilzen, Tieren und dem Menschen analysiert (Kapitel 2.5). So konnten außerhalb des Pflanzenreichs keine weiteren Transportproteine in Eukaryoten identifiziert werden, die zu dieser Familie signifikante Ähnlichkeiten aufweisen. Daraus lässt sich folgern, dass es sich bei dem plastidären ATP/ADP-Transporter um ein Pflanzen-spezifisches Protein handelt und innerhalb der Eukaryoten ausschließlich auf Plastiden-haltige Organismen beschränkt ist.

Vorkommen nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter innerhalb der Prokaryoten

Aufgrund der Existenz nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter in einigen intrazellulären Bakterien wurde das Vorkommen von weiteren Sequenzhomologen innerhalb der Prokaryoten untersucht, die sich in Archae- und Eubakterien unterteilen (Kapitel 3.1).

Für diese Analyse standen innerhalb der Archaebakterien die vollständigen Sequenzinformationen von drei archealen Genomen zur Verfügung (Kapitel 2.5; Tab. 2.5). In den Genomen der methanogenen Methanobacterium thermoautotrophicum und Methanococcus jannaschii, sowie in dem Genom des hyperthermophilen Archaeoglobus fulgidus wurden keine entsprechenden DNA-Sequenzen gefunden, die für einen nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter kodieren.

Innerhalb der Eubakterien waren zu Beginn der Arbeit nur die nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter der intrazellulären, humanpathogenen Eubakterien Rickettsia prowazekii und Chlamydia trachomatis bekannt (WILLIAMSON et al., 1989; TJADEN et al., 1999). Diese obligaten Endoparasiten besitzen ein relativ kleines Genom von nur etwa 1 Mb, das jeweils vollständig sequenziert wurde (ANDERSON et al., 1998; STEPHANS et al., 1998).

Das Genom von Rickettsia prowazekii enthält insgesamt fünf homologe Strukturgene, die für nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporter (TLC1-5Rp) kodieren (STEPHANS et al., 1998). Bisher wurde lediglich das TLC1Rp-Protein im bakteriellen Expressionsystem funktionell charakterisiert, bei dem es sich um einen ATP/ADP-Antiporter handelt (PLANO & WINKLER, 1991). Im Genom von Chlamydia trachomatis wurden dagegen nur zwei Gene für nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporter entdeckt, deren Transporteigenschaften nach heterologer Expression in Escherichia coli untersucht wurden (STEPHANS et al., 1998; TJADEN et al., 1999). Das NPT1Ct-Protein katalysiert, wie der rickettsielle und alle plastidären Transporter, einen Austausch von ATP und ADP, während NPT2Ct als Netto-Importer für GTP, UTP, ATP und CTP fungiert. Vermutlich ist diese Nukleotid-Aufnahme mit einem einwärtsgerichteten Protonengradienten energetisiert (TJADEN et al., 1999).

Durch den Besitz eines ATP-Transportsystems sind Rickettsia prowazekii und Chlamydia trachomatis in der Lage, ATP zu importieren und den cytosolischen ATP-„Pool“ der eukaryotischen Wirtszelle auszubeuten. Sie werden daher als „Energieparasiten“ bezeichnet, obwohl ihre Genome für Enzyme kodieren, die an einer ATP-Synthese mittels Substratkettenphosphorylierung bzw. oxidative Phosphorylierung beteiligt sind (ANDERSSON, 1998b; ILIFFE-LEE & MCCLARTY, 1999). Es wird angenommen, dass ihre eigene ATP-Synthese nicht zum Überleben ausreicht (STEPHANS et al., 1998). Darüber hinaus sind Rickettsia prowazekii und Chlamydia trachomatis auf den Import von allen anderen Nukleotiden angewiesen (Ausnahme: Chlamydia ist in der Lage, CTP und UTP de novo zu synthetisieren). In beiden Genomen ist das Gen für das ubiquitäre Enzym Phosphoribosylpyrophosphat-Synthase nicht vorhanden, welches eine zentrale Rolle im Nukleotidstoffwechsel von Pro- und Eukaryoten besitzt (ANDERSSON et al., 1998a; STEPHANS et al., 1998). Chlamydien und Rickettsien können demnach ihre eigene RNA- bzw. DNA-Synthese nur durch die Aufnahme von Nukleotiden aus dem Cytosol der Wirtszelle bewerkstelligen (ANDERSSON, et al., 1998a; STEPHANS et al., 1998). Dieser

Nukleotid-Import wird in Chlamydia trachomatis vermutlich durch das NPT2Ct-Protein katalysiert (TJADEN et al., 1999), während für Rickettsia prowazekii eine solche Transportfunktion unter den vier homologen Nukleotid-Transportern (TLC2-5Rp) bislang noch nicht nachgewiesen werden konnte (H. H. Winkler, University of South Alabama, persönliche Mitteilung).

Da ATP und alle anderen Nukleotide – im Gegensatz zu den meisten Nährstoffen – nicht im Außenmedium verfügbar sind, geht man derzeit davon aus, dass Nukleotid-Transportproteine bei Prokaryoten ausschließlich auf obligat endosymbiontisch bzw. endoparasitisch lebende Bakterien beschränkt sind (WINKLER & NEUHAUS, 1999). Diese Annahme wird in der vorliegenden Doktorarbeit anhand zahlreicher Genomanalysen verschiedener Eubakterien bestätigt. In freilebenden Eubakterien konnten keine homologen Transportproteine nachgewiesen werden (Kapitel 2.5; Tab. 2.8). Alle im Rahmen dieser Arbeit identifizierten nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter existieren in intrazellulären Eubakterien. Es konnten erstmals homologe DNA-Sequenzen aus verschiedenen obligaten Endosymbionten einfacher Protozoen bzw. aus einem pflanzenpathogenen Endoparasiten isoliert werden (Kapitel 3.1). Es ist festzuhalten, dass ein solches Transportsystem nicht in allen Eubakterien vorkommt, die als Symbionten oder Parasiten strikt intrazellulär leben, sondern offensichtlich auf wenige Gruppen beschränkt ist.

In Kooperation mit Dr. F. Lang (University of Montreal) und Dr. J. Kusch (Universität Kaiserslautern) wurden DNA-Sequenzen aus den obligaten Endosymbionten Holospora obtusa bzw. Caedibacter caryophila identifiziert, die für einen putativen nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter kodieren. Diese Eubakterien leben im Makronukleus des Pantoffeltierchens Paramecium caudatum und gehören innerhalb der α-Proteobakterien zur Ordnung Rickettsiales (SPRINGER et al., 1993; AMANN et al., 1991).

Mittels Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) konnten verschiedene bakterielle Endosymbionten in freilebenden Amöben der Gattung Acanthamoeba nachgewiesen werden (FRITSCHE et al., 1999; FRITSCHE et al., 2000; FRITSCHE, unveröffentlicht). Eine 16S-rRNA-Analyse ergab, dass es sich bei den bislang unbekannten, intrazellulären Endosymbionten um ein Rickettsia-verwandtes Bakterium (C36), zwei Caedibacter-verwandte Bakterien (HN3 und ET39) sowie ein Chlamydia-verwandtes Bakterium (TUME1) handelt. Diese vier Endosymbionten besitzen ebenfalls nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporter. Die entsprechenden DNA-Sequenzen wurden in Kooperation mit der Gruppe von Dr. M. Wagner (Technische Universität München) isoliert.

Innerhalb der Ordnung Rickettsiales konnte vor kurzem der erste phytopathogene Parasit identifiziert werden (DAVIS et al., 1998). Dieser obligate Endoparasit verursacht in der Papaya (Carica papaya) eine für diese Pflanze typische Krankheit, die sog. „Papaya bunchy top disease“. In Kooperation mit Prof. H. H. Winkler (University of South Alabama) und Dr. D. Davis (University of Florida) wurden ebenfalls in dem Rickettsia-verwandten Parasiten ein bisher unbekannter nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter auf molekularer Ebene nachgewiesen.

Zusammenfassend ergeben sich im Rahmen dieser Doktorarbeit folgende Erkenntnisse über das Vorkommen nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter in Prokaryoten: 1. Ein solches Transportsystem konnte nicht in den Archaebakterien, sondern lediglich in Eubakterien identifiziert werden. 2. Die Mitglieder dieser Transporter-Familie kommen bedingt durch ihre Eigenschaft, Nukleotide zu transportieren, ausschließlich in strikt intrazellulären Eubakterien vor, jedoch nicht in freilebenden Bakterien. 3. Bislang konnten homologe Transportproteine ausschließlich in Endosymbionten bzw. Endoparasiten der Ordnung Rickettsiales und Chlamydiales nachgewiesen werden. Demnach ist die Familie der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter nicht über das gesamte Prokaryoten-Reich verbreitet, sondern vermutlich auf einige wenige endosymbiontisch bzw. endoparasitisch lebende Eubakterien beschränkt.

4.1.2 Phylogenetische Analyse nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter

Die mögliche Phylogenie der in dieser Doktorarbeit identifizierten und bisher bekannten nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter wurde analysiert. Die Verwandtschaft dieser Transporter-Familie wurde auf Grundlage eines multiplen Proteinalignments berechnet und in einem Evolutions-stammbaum veranschaulicht (Kapitel 3.1.9).

Phylogenie nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter aus Pflanzen

Die verwandtschaftlichen Beziehungen der plastidären ATP/ADP-Transporter, die sich in einem phylogenetischen Stammbaum darstellen lassen, stimmen mit der allgemein akzeptierten Vorstellung über die Pflanzen- bzw. Plastidenevolution überein (Kapitel 3.1.9; Abb. 3.6). Somit stellt auch der plastidäre ATP/ADP-Transporter offentsichtlich einen guten molekularen Marker dar, um die evolutiven Beziehungen im Pflanzenreich weiter zu beschreiben.

Eine Analyse der ribosomalen RNA bestätigt den monophyletischen Ursprung aller Pflanzen, die aus einer einzigen primären Endosymbiose zwischen einem heterotrophen Eukaryot und einem Vertreter der Cyanobakterien hervorgegangen ist (BHATTACHARYA & MEDLIN, 1998). Im Verlauf der pflanzlichen Evolution entwickelte sich aus dem phototrophen Eubakterium der Plastid (DOUGLAS, 1998). Als direkte Nachfahren dieser primären Endosymbiose gehen die Algen der Abteilung Glaukophyta hervor, die phylogenetisch eine nicht weiter fortgeführte Seitenlinie von der pflanzlichen Hauptentwicklungslinie bildet (PALMER, 2000). Diese stammesgeschichtlich primitivsten und demnach ältesten „Pflanzen“ innerhalb des rezenten Pflanzenreichs weisen noch einen zum Cyanobakterium ähnlichen Plastiden auf (LÖFFELHARDT & BOHNERT, 1997). Damit stellt der putative plastidäre ATP/ADP-Transporter aus Cyanophora paradoxa das vermutlich ursprünglichste Transport-protein der plastidären Homologen dar.

Die Rotalgen (Rhodophyta) haben sich ebenfalls relativ früh von der Entwicklungslinie der Pflanzen abgetrennt (BHATTACHARYA & MEDLIN, 1998). Der Stammbaum der plastidären ATP/ADP-Transporter bestätigt, dass das homologe Protein der Rotalge Galdieria sulphuraria aus demselben

Vorläufer-Protein hervorgeht wie die Transporter der Grünalgen und höheren Pflanzen (Abb. 3.6). Jedoch hat sich der Rotalgen-Transporter von den anderen abgetrennt und sich unabhängig von diesem im Laufe der Evolution relativ stark divergent entwickelt. Diese Eigenentwicklung des plastidären ATP/ADP-Transporters aus Galdieria sulphuraria lässt sich auf die Anpassung dieser thermoacidophilen Alge an ihren extremen Lebensraum (hohe Temperaturen und niedrige pH-Werte) zurückführen.

Das plastidäre ATP/ADP-Transportprotein der Kieselalge Odontella sinensis weist eine nahe Verwandtschaft zum Rotalgen-Transporter auf, die in einem gemeinsamen Vorläufer begründet ist (Abb. 3.6). Diese phylogenetische Beziehung zwischen den Transportproteinen beider Algen-Gruppen lässt sich anhand der Plastidenevolution erklären. Als ein Vertreter der Heterokontophyta besitzt Odontella sinensis komplexe Plastiden, die durch sekundäre Endosymbiose entstanden sind (MAIER, 1996). Aufgrund der hohen Sequenzähnlichkeit des plastidären Odontella-Genoms mit den Plastiden-Genom einer Rotalge geht man davon aus, dass im Fall der Kieselalge eine Rotalge von einem heterotrophen Flagellat phagocytiert wurde (KOWALLIK et al., 1995; REITH & MUNHOLLAND, 1995). Im Verlauf der coevolutiven Entwicklung ist die Rotalge schrittweise bis auf den Plastiden und die Plasmamembran reduziert worden (MAIER, 1996) und die Gene für Plastiden-Proteine aus dem Kern bzw. Plastiden der Rotalge wurden in den Kern des Wirtes verlagert. Auf diese Weise könnte das im Kern lokalisierte Gen für den plastidären ATP/ADP-Transporter des Rotalgen-Vorläufers ins Odontella-Genom gelangt sein. Der Stammbaum-Analyse vorhergesagte monophyletische Ursprung unterstützt diese Hypothese (Abb. 3.6).

Für die stammesgeschichtliche Herkunft der Pflanze gilt als gesichert, dass sich der Großteil der heute lebenden Landpflanzen, also Moose (Bryophyta), Farne (Pteridophyta) und höhere Pflanzen (Spermatophyta) aus ursprünglichen Grünalgen (Chlorophyta) entstanden sind. Gemäß dieser verwandtschaftlichen Beziehung gehen in diesem Stammbaum die plastidären ATP/ADP-Transporter der Grünalgen und die der höheren Pflanzen aus einem gemeinsamen Vorfahren hervor, wobei sich die homologen Proteine der Grünalgen, Chlamydomonas reinhardtii und Dunaliella salina, von der Hauptentwicklungslinie der höheren Pflanzen abgespalten haben. Die Nukleotid-Transporter beider Grünalgen-Vertreter lassen sich auf ein monophyletisches Vorläufer-Protein zurückführen, haben sich aber dann in zwei divergierende Linie aufgespalten (Abb. 3.6).

Der verwandtschaftliche Zusammenhang höherer Pflanzen (Spermatophyta) in Bezug auf den plastidären ATP/ADP-Transporter konnte lediglich für die mono- und dikotylen Pflanzen analysiert werden. In dem Stammbaum sind die homologen Transportproteine der Mono- und Dikotyledoneae aus einem gemeinsamen Vorläufer-Protein hervorgegangen und bilden jeweils eine eigenständige monophyletische Gruppe. Diese phylogenetische Einordnung der Transportproteine stimmt mit der taxonomischen Einteilung des Pflanzenreichs überein (SOLTIS et al, 1998). Innerhalb der mono- und dikotylen Gruppe erfolgt die resultierende Anordnung der Transportproteine im Stammbaum ebenfalls entsprechend den Verwandtschaftsbeziehungen der jeweiligen Pflanzenart, aus denen sie identifiziert

worden sind. So gruppieren sich erwartungsgemäs die jeweiligen Vertreter einer Familie zusammen (Abb. 3.6).

Phylogenie nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter in Eubakterien:

Für die phylogenetische Analyse nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter aus Eubakterien wurde ein wurzelloser Stammbaum erstellt, dem kein Transportprotein als Ursprung zugrunde gelegt wurde (Kapitel 3.1.9; Abb. 3.7). Der resultierende Stammbaum gliedert die eubakteriellen Nukleotid-Transporter in zwei Gruppen, die der molekularen Taxonomie der Eubakterien entspricht. So bilden die homologen Transportproteine der Rickettsiales bzw. Chlamydiales jeweils eine monophyletische Gruppe.

Rickettsia bildet innerhalb der α-Proteobakterien die Stammgattung der Rickettsiales, eine heterogene Gruppe von gram-negativen Eubakterien, von denen die meisten als Parasiten oder Endosymbionten in eukaryotischen Zellen existieren (ANDERSSON, et al., 1998a; DRANCOURT & RAOULT, 1994). Chlamydien hingegen bilden innerhalb der Eubakterien eine eigenständige Gattung, die sich ebenfalls durch eine obligat intrazelluläre Lebensweise auszeichnen (WEISBURG et al., 1986). Beide eubakteriellen Gruppen besitzen keinerlei offensichtliche verwandtschaftliche Beziehung (OLSEN, 1994).

Innerhalb der Chlamydiales gehen beide nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter aus dem Endoparasiten Chlamydia trachomatis (NPT1Ct und NPT2Ct) auf ein gemeinsames Vorläufer-Protein zurück (Abb. 3.7). Demnach sind beide Transporter-Isoformen im Chlamydia-Genom durch eine Genduplikation entstanden. Im Laufe der Proteinevolution hat sich jedoch NPT2Ct im Vergleich zu NPT1Ct relativ stark vom Ur-Protein entfernt. Da das NPT2Ct-Protein einen abweichenden Transportmechanismus aufweist (TJADEN et al., 1999), legt dies den Schluss nahe, dass Mutationen zu dem Funktionswandel der chlamydialen Isoform geführt haben könnten.

Zudem lässt sich aus dem chlamydialen Teilstammbaum ableiten, dass die Transporter-Isoformen des Endoparasiten Chlamydia trachomatis NPT1Ct und NPT2Ct aus einem Vorläufer des chlamydialen Endosymbionten TUME1 entstanden sind (Abb. 3.7). Die nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter der parasitisch lebenden Rickettsien sind ebenfalls aus den Vorläufern der rickettsiellen Endosymbionten hervorgegangen. Dies entspricht der allgemeinen Vorstellung, dass sich die parasitische Lebensweise aus einer symbiontischen Beziehung im Zuge der Koevolution entwickelt hat (STEINERT et al., 2000). Entsprechend sind die Nukleotid-Transporter der Endosymbionten ursprünglicher als die der verwandten Endoparasiten.

Innerhalb der Rickettsiales haben sich die nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter aus dem endosymbiontisch lebenden Holospora obtusa und dem Rickettsia-verwandten Endosymbionten C36 vom dem monophyletischen rickettsiellen „Ur“-Protein relativ stark verändert, was im Stammbaum durch sehr lange Verzweigungsäste wiedergegeben wird (Abb. 3.7). Es stellt sich daher die Frage, inwiefern Mutationen als Folge der divergenten Entwicklung zu neuen Transporteigenschaften geführt

haben. Aufgrund der vollständig bekannten kodierenden Nukleotidsequenz des Holospora-Transporters konnte in der vorliegenden Doktorarbeit die Funktion dieses Proteins in einem bakteriellen Expressionssystem charakterisiert werden (Kapitel 4.3).

Die nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter aus dem Endoparasiten Caedibacter caryophila, dem Endoparasiten Rickettsia prowazekii (1) und dem Rickettsia-verwandten Endoparasiten der Papaya-Pflanze bilden innerhalb der Rickettsiales eine eigenständige Gruppe, die in einem gemeinsamen Vorläufer-Protein ihren Ursprung hat (Abb. 3.7). Bislang konnte nur für das TLC1Rp-Protein gezeigt werden, dass es sich um einen klassischen ATP/ADP-Antiporter handelt (PLANO & WINKLER, 1989). Trotz intensiver Bemühungen ist es bis jetzt noch nicht gelungen, die vollständigen kodierenden Sequenzen aus Caedibacter caryophila und aus dem phytopathogenen Papaya-Parasiten für eine biochemische Charakterisierung der Transportproteine zu isolieren. Aufgrund der nahen Verwandtschaft zum TLC1Rp-Protein und der geringen Veränderung in der Proteinsequenz könnte man spekulieren, dass sie ebenfalls ein Austausch von ATP im strikten Gegentausch mit ADP katalysieren.

Die übrigen nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter aus Rickettsia prowazekii (TLCRp2-5) bilden eine eigene, monophyletische Gruppe (Abb. 3.7). Wie der homologe TLC1Rp-Transporter gehen sie aus demselben „Ur"-Protein hervor. Das Vorkommen dieser Isoformen beruht auf Genduplikationen im Rickettsia-Genom (ANDERSSON, et al. 1998a). Eine Analyse der Transportfunktionen von TLCRp2-5 im E.coli-System zeigte, dass für keines der heterolog exprimierten Proteine die Funktion eines ATP/ADP-Transporters nachgewiesen werden konnte (Prof. H. H. Winkler, University of South Alabama; unveröffentlicht). Darüber hinaus weisen diese rickettsiellen Isoformen eine starke Divergenz auf.

Aus der Tatsache, dass Rickettsia prowazekii fünf Sequenzhomologe (tlcRp2-5) in seinem relativ kleinen Genom besitzt, stellt sich die Frage nach der Funktion dieser Gene. Da schon geringe Aminosäure-Substitutionen zu drastischen Veränderungen der Transportereigenschaften führen können, erweist sich eine biochemische Charakterisierung der vier Transporter-Isoformen als äußerst müßig. Die chlamydialen Transportproteine NPT1Ct und NPT2Ct unterscheiden sich trotz der hohen Ähnlichkeit zueinander (ca. 56 %) in ihren biochemischen Eigenschaften (TJADEN et al., 1999). Ebenso führt der Austausch von zwei Aminosäuren in der strikt NAD-abhängigen Leucin-Dehydrogenase aus Thermoactinomyces intermedicus zu einem Enzym, das die gleiche Reaktion unter Verwendung von NADP als Coenzym katalysiert (GALKIN et al., 1997). Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass aus dem mitochondrialen ADP/ATP-Antiporter durch eine chemische Modifizierung mittels Thiol-Reagenzien ein Uniporter ohne Verlust der katalytischen Aktivität entstanden ist (DIERKS et al., 1990). Als weiteres Beispiel bewirkt die Substitution eines bestimmten Lysin-Restes eine veränderte Substratspezifität des Glukose-6-Phosphat/Phosphat-Transporters aus E.coli. So kann die Mutante kein Glukose-6-Phosphat mehr transportieren, jedoch katalysiert sie effizient den Transport von Phosphoenolpyruvat (PEP) sowie 3-Phosphoglycerat im Phosphat-gekoppelten Mechanismus (HALL et al., 1999).

Aus der Phlyogenie nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter ergeben sich folgende Erkenntnisse: Obwohl für die verwandtschaftliche Analyse der Ursprung eubakterieller Transporter nicht definiert wurde, ist dennoch festzuhalten, dass bei Chlamydiales und Rickettsiales die Transportproteine der jeweiligen Endosymbionten älter bzw. ursprünglicher sind. Darüber hinaus besitzen die parasitisch lebenden Vertreter beider Ordnungen mehrere Isoformen für nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporter (aufgrund fehlender Information kann für den Rickettsia-verwandten Parasiten der Papaya keine Aussage zur Anzahl gemacht werden). Diese Endoparasiten haben sich auf höhere Eukaryoten (Wirbeltiere, Mensch) spezialisiert und als pathogene Organismen Virulenzfaktoren erworben, die an der Entstehung von Krankheiten beteiligt sind. Von den in einfachen Protozoen lebenden Endosymbionten geht man derzeit davon aus, dass der Nukleotid-Transporter als „single copy"-Gen im entsprechenden Genom vorkommt (Dr. M. Wagner, Technische Universität München; Dr. J. Kusch, Universität Kaiserslautern; Dr. F. Lang, University of Montreal; unveröffentlicht). So könnte die Anpassung an eine parasitischen Lebensweise und/oder die Spezialisierung auf mehrzellige tierische Organismen zu einem weiteren Verlust von metabolischen Eigenschaften geführt haben. Im Gegenzug sind aber neue, funktionsfähige Gene erforderlich, die durch Genduplikationen und anschließendem Selektionsdruck aus diesen Genkopien entstehen könnten.

4.1.3 Konservierte Sequenzmotive und evolutive Verbindung zur MCF-Familie

Aus einem Vergleich der Aminosäure-Abfolge (Alignment) der pflanzlichen und bakteriellen nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter gehen fünf hochkonservierte Sequenzmotive hervor, die bis auf nur wenige Abweichungen in allen bislang identifizierten Proteinen vorkommen (Kapitel 3.4; Abb. 3.3). Bei diesen konservierten Aminosäuren handelt es sich um die Motive AELWG (Aminosäuren 244 - 248 des AATP1At-Proteins), FANQIT (Aminosäuren 259 - 264 des AATP1At-Proteins), GLGANVALIF/V (Aminosäuren 277 - 286 des AATP1At-Proteins), MAYIPLD (Aminosäuren 491 - 497 des AATP1At-Proteins) und GKSGGA (Aminosäuren 526 - 531 des AATP1At-Proteins).

Aufgrund des weiten phylogenetischen Abstandes zwischen Pflanzen und Eubakterien ist die Sequenzverwandtschaft der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter bemerkenswert. Bei verwandten Proteinen nimmt man an, dass im Laufe der Evolution die konservierten Sequenzmotive aufgrund geringer Aminosäurevariabilität erhalten geblieben sind. Denn oft besitzen diese Motive übergeordnete Funktionen und werden als Konsensussequenzen bezeichnet (SAIER, 1994).

Überraschendweise zeigte sich, dass drei der fünf hochkonservierten Motive ebenfalls in den Mitgliedern der „Mitochondrial Carrier Familiy" (MCF-Familie) vorkommen (Kapitel 3.1.10; Abb. 3.9). Zudem konnte berechnet werden, dass die Motive GLGANVALIF/V, MAYIPLD und GKSGGA mit einer relativ hohen statistischen Signifikanz in den Aminosäuresequenzen der MCF-Proteine wiederzufinden sind (Kapitel 3.1.11; Abb. 3.10). Diese Entdeckung ist äußerst interessant, da die mitochondrialen Transporter ansonsten keinerlei substantiellen Ähnlichkeiten zu der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Familie aufweisen. So bestehen die Transporter der MCF-Familie im

funktionellen Zustand aus einem Homodimer mit potentiellen 2×6 transmembranen, α-helicalen Domänen (KLINGENBERG, 1989; FIORE et al., 1998), während die nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter vermutlich als Monomere mit zwölf transmembranen α-Helices eine unterschiedliche molekulare Struktur aufweisen (WINKLER & NEUHAUS, 1999). Dennoch könnten beide Transporter-Familien über die obengenannten Sequenzmotive in Verbindung stehen.

Besonders auffällig ist, dass die Motive GLGANVALIF/V, MAYIPLD und GKSGGA in den Proteinsequenzen der MCF-Transporter dreimal mehr oder weniger konserviert vorkommen, da sie sich in den jeweiligen α-helicalen Domänen in annähernd gleicher Position befinden. Diese vorhergesagte Anordnung der Sequenzmotive geht aus einem hypothetischen Strukturmodell hervor, das sich auf der Grundlage eines Modells für mitochondriale ADP/ATP-Transporter nach NELSON & DOUGLAS (1993) ableitet (Kapitel 3.1.12; Abb. 3.11). Für die Enstehung der MCF-Familie wird angenommen, dass sie ursprünglich aus einem Sequenzabschnitt hervorgegangen ist, der für zwei α-helicale Domänen und eine hydrophile Schleife („Loop“) kodiert. Dieses „Ur-Gen“ wurde tripliziert (Gentriplikation) und bildete sodann ein Monomer mit sechs transmembranen α-Helices (SAIER, 2000). Demnach besteht das Monomer aus drei sich wiederholenden, internen Sequenzbereichen. Ausgehend davon könnte postuliert werden, dass die Sequenzmotive GLGANVALIF/V, MAYIPLD und GKSGGA bereits im „Ur-Gen“ der mitochondrialen Transportproteine vorhanden waren. Dies könnte erklären, warum die Motive in funktionellen MCF-Mitgliedern dreimal in annähernd gleicher Position vorzufinden sind.

Nach SAIER (1994) ist das triplizierte Gen, das für ein als Homodimer funktionelles Monomer kodiert, im Laufe der Evolution mehrfach dupliziert worden. Die resultierenden Gensequenzen haben sich dann unabhängig voneinander divergent entwickelt. Auf diese Weise konnten zahlreiche MCF-Proteine mit unterschiedlichen Transporteigenschaften entstehen, wie der mitochondriale ADP/ATP-Carrier, der 2-Oxoglutarat/Malat-Transporter, der Phosphat-Transporter, der Tricarboxylat-Transporter sowie die Protonen-leitenden Entkoppler-Proteine (UCP, „uncoupling proteins“). Trotz der divergenten Entwicklung mitochondrialer Transporter sind Teile der Sequenzmotive GLGANVALIF/V, MAYIPLD und GKSGGA über 500 Millionen Jahre erhalten geblieben. Es stellt sich so die Frage, ob diese Sequenzmotive eine besondere Bedeutung für die Transportfunktion besitzen oder ob sie rein zufällig in beiden Transporter-Familien vorkommen.

Durch zielgerichtete Mutagenese an dem plastidären ATP/ADP-Transporter aus Arabidopsis thaliana (AATP1At) konnte in der Tat bestätigt werden, dass es sich bei dem Sequenzmotiv GKSGGA um eine äußerst bedeutende Struktur für den Nukleotid-Transport handelt. Austausche des Aminosäurerest Lysin_{527} in diesem Motiv führten stets zu veränderten Transporteigenschaften des AATP1At-Proteins, wodurch die Erkennung für das Substrat ATP, nicht aber für ADP beeinträchtigt wurde (TRENTMANN et al., 2000).

Aufgrund dessen könnte postuliert werden, dass diese Motive - vermutlich in beiden Transporter-Familien - essentielle Funktionen ausüben und aus diesem Grund in den Aminosäuresequenzen

konserviert wurden. Die Entwicklung dieser Sequenzmotive könnte in beiden Familien unabhängig voneinander erfolgt sein (Konvergenz). Jedoch lässt sich aus einem hypothetischen Modell für die Entstehung nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter eine eventuelle evolutive Verbindung zwischen beiden Familien herleiten, wobei der Ursprung dieser Motive in der „de novo"-Entstehung der MCF-Familie begründet liegt (Kapitel 4.1.4). Damit beruht das Vorkommen dieser Sequenzmotive möglicherweise auf eine Verwandtschaft (Homologie) zwischen den Protein-Familien.

4.1.4 Evolutionsmodell zur Entstehung nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter

Ziel der vorliegenden Doktorarbeit war es, Einblicke in die Evolutionsgeschichte nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter zu bekommen. Der evolutive Zusammenhang zwischen den pflanzlichen und eubakteriellen Transportproteinen ist bislang noch völlig ungeklärt. Mit der Identifizierung weiterer Sequenzhomologen konnte in der vorliegenden Doktorarbeit eine neue Hypothese zur evolutiven Entstehung nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter aufgestellt werden, die eine eventuelle Verbindung mit den Transportern der „Mitochondrial Carrier Familiy" (MCF) indiziert.

Aus evolutiver Sicht ist für die Transporter-Familie mit der molekularen Identifizierung eines putativen plastidären ATP/ADP-Transporters aus Cyanophora paradoxa ein entscheidener Schritt gelungen. Da die älteste bzw. ursprünglichste Pflanze ein solches Transportsystem besitzt, kann aufgrund des monophyletischen Ursprungs aller rezenten Pflanzen postuliert werden, dass ein homologer Transporter in allen Plastiden-haltigen Organismen existiert und damit im gesamten Pflanzenreich verbreitet ist.

Daraus ergibt sich ein direkter Zusammenhang zwischen der Entstehung der Pflanzen und dem plastidären ATP/ADP-Transporter. Nach der allgemein anerkannten Endosymbiontentheorie ist die erste Pflanzenzelle aus einer primären Endosymbiose zwischen einem heterotrophen Eukaryoten und einem Cyanobakterium entstanden, wobei der Plastid aus dem freilebenden photoautotrophen Eubakterium hervorgegangen ist (PALMER, 2000; MCFADDEN, 2000). Die Etablierung und Stabilisierung der Endosymbiose führt zu einem Selektionsvorteil für beide Partner, wobei als treibende Kraft vermutlich eine stoffwechselphysiologische Abhängigkeit angenommen wird (MARTIN & MÜLLER, 1998). So bewirkt eine langfristige Anpassung eine Abstimmung der Stoffwechselprozesse von Wirt und Endosymbiont aufeinander (MARTIN & HERMANN, 1998).

Für das phagozytierte Cyanobakterium stellt das intrazelluläre Milieu ein Lebensraum mit konstanten Bedingungen dar. Es kommt zu einem Verlust von nicht mehr benötigten metabolen Eigenschaften, was mit einer Reduktion des Genoms verbunden ist (STEINERT et al., 2000). Das Cyanobakterium verliert unter anderem seine respiratorischen Gene, da der nächtliche Energie-Bedarf durch die Wirtszelle gedeckt werden kann. Der Wirt versorgt den anabolen Stoffwechsel des Cyanobakteriums mit ATP, das in den Mitochondrien im Zuge der oxidativen Phosphorylierung synthetisiert wird. Im Gegenzug erhält die heterotrophe Wirtszelle die Photoassimilate des Endosymbionten und ist damit von der exogenen Zufuhr organischer Substrate unabhängig. Für den

Metaboliten-Austausch zwischen Wirt und Endosymbionten sind geeignete Transportproteine erforderlich. Es wird angenommen, dass die heutigen plastidären Transporter (Triosephosphat/ Phosphat-, Glukose-6-Phosphat/Phosphat-; Phosphoenolpyruvat/Phosphat- sowie der 2-Oxoglutarat/ Malat-Translokator für diese Organell-Cytoplasma-Kommunikation neu entstanden sind (FLÜGGE, 1998; MCFADDEN, 2001). So könnte für den plastidären ATP/ADP-Transporter ebenso eine „de novo"-Entstehung postuliert werden. Die physiologische Bedeutung eines solchen Transportproteins liegt in dem ATP-Import und damit in der nächtlichen Versorgung des Chloroplasten mit Energie in Form von ATP für den Stärkeabbau (NEUHAUS & SCHULTE, 1996), die Fettsäure- und Protein-Biosynthese (NEUHAUS & EMES, 2000).

Die eukaryotische Wirtszelle besitzt mit dem mitochondrialen ADP/ATP-Carrier (ACC) bereits ein solches ATP-Transportsystem, dass bei der Entstehung der ersten eukaryotischen Zelle „de novo" gebildet worden ist (WHATLEY et al., 1997; SAIER, 2000). Dieses Transportprotein, das den Export von ATP katalysiert und somit eine entgegengesetzte Transportrichtung aufweist, kann aus biochemischen und energetischen Gründen den ATP-Import in die Plastiden nicht bewerkstelligen. Jedoch könnte der mitochondriale Carrier möglicherweise für die Bildung eines plastidären ATP-Transporters als Vorlage gedient haben. So könnten die für eine Nukleotid-Transportfunktion essentiellen Genabschnitte in ein hypothetisches Strukturgen eingebaut worden sein, das für ein Membranprotein mit 12 potentiellen Transmembranhelices kodiert. Die Verwendung von sogenannten Modulen für die Entstehung neuer Proteine ist ein weit verbreitetes Phänomen (LENGELER et al., 1994). Dies könnte erklären, warum Teile der Sequenzmotive GLGANVALIF/V, MAYIPLD und GKSGGA in beiden Protein-Familie vorkommen (Kapitel 4.1.3). Ein solcher evolutiver Zusammenhang zwischen den mitochondrialen und nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern würde für eine homologe Entwicklung dieser Motive sprechen.

Ein weiteres Indiz spricht für die „de novo"-Entstehung des plastidären ATP/ADP-Transporters: Im Zuge der Endosymbiose sind zahlreiche cyanobakterielle Gene durch horizontalen Gentransfer ins Wirtsgenom übertragen worden (MARTIN et al., 1998). Auf diese Weise könnte ebenfalls das Gen für den plastidären ATP/ADP-Transporter in den Kern der Pflanzenzelle gelangt sein. Aufgrund der vollständigen Genomsequenz von Synechocystis sp. PCC6803 kann jedoch dieser cyanobakterielle Ursprung ausgeschlossen werden, da in diesem Genom keine homologen Gene zu den bereits bekannten plastidären ATP/ADP-Transportern identifiziert wurden (KANEKO et al., 1996).

Die mögliche Enstehung des plastidären ATP/ADP-Transporters im Zuge der Entstehung der ersten Pflanzenzelle erklärt nicht das Vorkommen homologer Transportproteine in einigen intrazellulären Eubakterien. Interessanterweise besitzt das Genom von Chlamydia trachomatis neben den nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern (NPT1Ct und NPT2Ct) weitere Gene, zu denen man in pflanzlichen Organismen Homologe findet (STEPHANS et al., 1998). Es wird angenommen, dass die Chlamydien diese „pflanzlichen Gene" mittels horizontalen Gentransfers aus einer frühen, einzelligen Pflanzenzelle erworben haben (WOLF et al, 1999). Dies legt den Schluss nahe, dass auch das Gen für

den plastidären ATP/ADP-Transporter über diesen Weg ins Chlamydien-Genom gelangte. So weisen die Nukleotid-Transporter aus Chlamydia trachomatis NPT1Ct und NPT2Ct hohe Ähnlichkeiten (bis zu 65 %) zu den pflanzlichen Transportproteinen auf, vor allem zu den Homologen der niederen Pflanzen (siehe Anhang; Kapitel 7.5; Tab. 7.6). Ein solches Nukleotid-Transportsystem bietet den Chlamydien einen Selektionsvorteil (STEPHANS et al., 1998).

Ebenfalls beruht das Vorkommen nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter in einigen Vertretern der Rickettsiales vermutlich auf einen horizontalen Gentransfer. WOLF et al. (1999) postulieren einen horizontaler Gentransfer zwischen Chlamydien und Rickettsien. Beide Bakteriengruppen kommen als obligat intrazelluläre Endosymbionten vor, die in Acanthamoeben existieren (FRITSCHE et al., 1999; FRITSCHE et al., 2000) (Kapitel 4.1). Der Austausch von DNA setzt eine gleiche ökologische Nische der Organismen voraus. So das grundsätzlich ein solcher Gentransfer zwischen Chlamydien und Rickettsien in den Protozoen stattfinden könnte. Da Chlamydia trachomatis im Vergleich zu Rickettsia prowazekii mehr Pflanzengene erworben hat (ANDERSSON et al., 1998a; STEPHANS et al., 1998), nimmt man an, dass der Gentransfer vom chlamydialen zum rickettsialen Eubakterium erfolgte (WOLF et al., 1999). Somit wird ein chlamydialer Ursprung der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter in Eubakterien angenommen. Ein entgegengesetzter Transfer müsste den anschließenden Verlust der zuvor erworbenen Gene im Rickettsia-Genom postulieren.

Prinzipiell wäre ebenfalls ein horizontaler Gentransfer zwischen Rickettsien und höheren Pflanzen möglich, da vor kurzem innerhalb der Rickettsiales ein phytopathogener Endoparasit der Papaya-Pflanze entdeckt worden ist (DAVIS et al., 1998). Die Rickettsien könnten über diesen Weg das Gen für nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter erworben haben. Dementsprechend wäre der Transfer nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter durch zwei unabhängige Ereignisse von der Pflanze auf die Chlamydien bzw. Rickettsien möglich. Jedoch besitzen die rickettsiellen Transportproteine die höchsten Ähnlichkeiten zu den chlamydialen Transportern (bis zu 60 %) und nicht zu den plastidären ATP/ADP-Transporter höherer Pflanzen (40 -50 %), was eher einen horizontalen Gentransfer zwischen Chlamydien und Rickettsien vermuten lässt. Ebenfalls indizieren zwei weitere chlamydiale und rickettsielle Proteine einen horizontalen Gentransfer zwischen diesen beiden Eubakterien (WOLF et al., 1999). Neben dem nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter kodieren die Genome von Chlamydia trachomatis und Rickettsia prowazekii für ein hypothetisches Membranprotein, dessen Funktion unbekannt ist. Dieses Protein weist einen eukaryotischen Ursprung auf und kommt innerhalb der Prokaryoten nur in Chlamydien und Rickettsien vor. Zum anderen zeigt die dCTP-Deaminase, die zwar im Eubakterienreich weit verbreitet ist, eine auffallend starke Ähnlichkeit zwischen den Chlamydien und Rickettsien gegenüber den anderen Bakterien (WOLF et al., 1999).

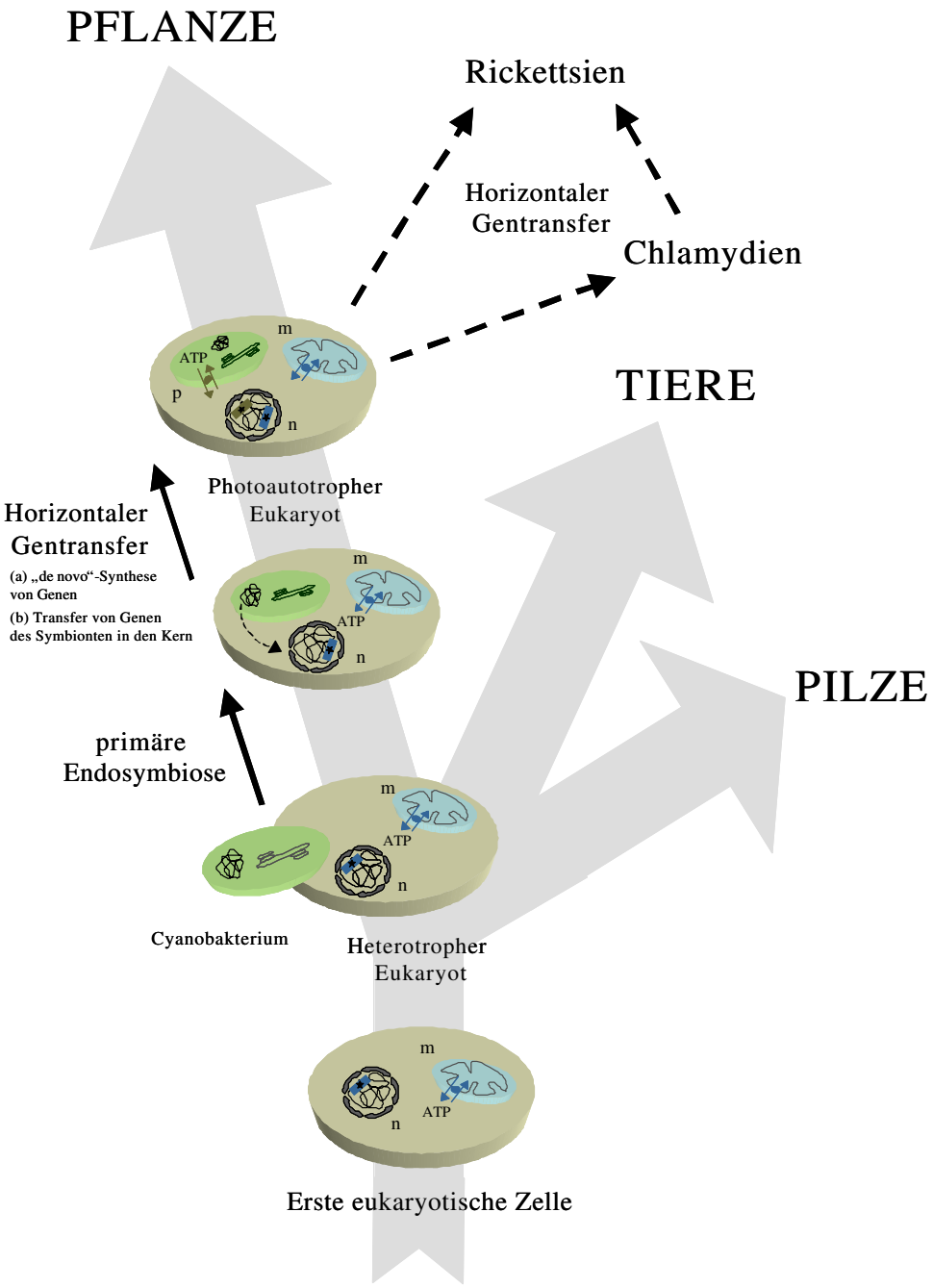


Abb. 4.1: Evolutionsmodell zur Entstehung nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter. (n) Nukleus; (m) Mitochondrium; (p) Plastid. › konserviertes Sequenzmotiv; Gen für das plastidäre ATP/ADP-Transportprotein; Gen für den mitochondrialen ADP/ATP-Transportprotein.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporter innerhalb der Prokaryoten vermutlich nur auf die endosymbiontisch bzw. endoparasitisch lebenden Eubakterien der Ordnung Rickettsiales und Chlamydiales beschränkt ist. Dafür gibt es nun folgende Erklärungsmöglichkeit: Im Gegensatz zu freilebenden Bakterien sind diese obligat intrazellulär lebenden Endosymbionten von der Außenwelt abgeschirmt und besitzen daher keinerlei Möglichkeiten zum Genaustausch mit weiteren Bakterienspezies (MORAN, 1996). Daher ist es nicht zu einer Verbreitung des durch horizontalen Gentransfer erworbenen Transporters im Laufe der bakteriellen Evolution gekommen.

Diese komplexe Zusammenhänge sind in der Abbildung 4.1 schematisch dargestellt. Im Zuge der Genomsequenzierung bleibt es abzuwarten, ob noch weitere nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporter in Eu- bzw. Prokaryoten existieren, die das in dieser Doktorarbeit erstellte Evolutions-modell dieser Transporter-Familie unterstützen ode rin Frage stellen. Vor allem bleibt die Frage offen, inwiefern der pflanzliche Nukleotid-Transporter, der von den Chlamydien bzw. Rickettsien durch den horizontalen Gentransfer erworben wurde, innerhalb der endosymbiontisch bzw. endoparasitisch lebenden Eubakterien verbreitet ist.

4.2 Molekular-genetische Analysen nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter aus niederen Pflanzen

Die plastidären nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter der niederen Pflanzen (Algen) sind aus physiologischer Sicht von Interesse. Die niederen Pflanzen stellen eine große und vielfältige Pflanzengruppe dar, wobei jede Alge für sich typische Eigenschaften besitzt und sich damit von den höheren Pflanzen hervorhebt.

Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden bislang unbekannte plastidäre ATP/ADP-Transporter in repräsentativen Vertretern der Glaukophyten, Chlorophyten, Rhodophyten und Heterokontophyten identifiziert (Kapitel 3.1.1). Die cDNAs der homologen Transportproteine aus der zur Glaukophyta gehörende Alge Cyanophora paradoxa (AATPCp) und der Grünalge Chlamydomonas reinhardtii (AATPCr) dienten einer molekular-genetischen Analyse (siehe Anhang; Kapitel 7.2). Aufgrund der urspünglicheren Entstehung wurde an diesen zwei Algen untersucht, inwiefern sich die plastidären ATP/ADP-Transporter einzelliger phototropher Organismen im Vergleich zu den bisher charakterisierten Transportproteinen höherer Pflanzen auf molekularer Ebene unterscheiden.

In höheren Pflanzen existiert der plastidäre ATP/ADP-Transporter als Genfamilie. So besitzt das Arabidopsis-Genom, das kleinste Genom dicotyledoner Pflanzen, zwei homologe Gene (aatp1At und aatp2At), die für plastidäre ATP/ADP-Transporter kodieren (KAMPFENKEL et al., 1995). Auch in anderen höheren Pflanzen, wie Kartoffel und Raps, kommen mehrere homologe Transporter-Isoformen vor (MÖHLMANN, 1997; TJADEN et al., 1998b; NEUHAUS, unveröffentlicht). Mittels „Southern-Blot"-Analyse konnte in dieser Doktorarbeit gezeigt werden, dass die plastidären ATP/ADP-Transporter der Algen Cyanophora paradoxa und Chlamydomonas reinhardtii als „Single-copy"-Gen vorkommen

(Abb. 3.12). Ebenfalls existiert im Genom der Rotalge Galdieria sulphuraria nur eine homologe Kopie (STAMME, 1999). Demnach besitzen vermutlich alle einzelligen phototrophen Eukaryoten (Algen) lediglich ein Protein, das den plastidären Import von ATP im Gegentausch mit ADP katalysiert.

Das Vorkommen mehrerer AATP-Isoformen in höheren Pflanzen beruht möglicherweise auf Genduplikationen, die im Genom entstanden sind. Man nimmt an, dass im Laufe der Pflanzenevolution die Anpasssung an neue Lebensräume zur Ausbildung höherer Organisationsformen (Vielzeller) sowie zur Differenzierung in Gewebe bzw. Organen geführt hat. Diese Weiterentwicklung erfordert zum einen die Bildung neuer Gene, um diese komplexeren Strukturen und Funktionen zu kodieren, zum anderen die Bildung von Genkopien, um eine differentielle Expression zu ermöglichen. So entstehen nach der Genduplikation zunächst zwei identische Gen-Kopien, die sodann in ihrer Aminosäureseqeunz annähernd konserviert bleiben oder sich im Laufe der Evolution divergent entwickeln. Dabei können entsprechende Mutationen zur Entstehung neuer Funktionen führen.

Im Fall der zwei Isoformen AATP1 und AATP2 aus Arabidopsis thaliana konnte nach heterologer Expression in E.coli gezeigt werden, dass beide homologen Genkopien für Proteine mit annähernd gleichen Transporteigenschaften kodieren (TJADEN et al., 1998; MÖHLMANN et al., 1998). Man vermutet daher, dass ihre Existenz auf eine unterschiedliche organ-, entwicklungs- bzw. umweltspezifische Expression zurückzuführen ist (MÖHLMANN et al., 1998). Ebenso kann die Bedeutung der zwei aatp-Gene darin bestehen, dass das eine Gen als „Ersatzkopie“ fungiert, falls das andere Gen durch Mutationen inaktiviert wird.

Da offensichtlich in Algen nur ein plastidäres ATP/ADP-Transportprotein existiert, stellt sich die Frage, welche physiologische Rolle dieser Transporter für einen einzelligen phototrophen Eukaryoten spielt. Die wesentliche Funktion des plastidären ATP/ADP-Transporter in höheren Pflanzen ist die Versorgung der Plastiden mit ATP. So wird in heterotrophen Plastiden vorrangig ATP für die Stärke-, Aminosäure- und Fettsäure-Biosynthese benötigt, während die Chloroplasten vermutlich nur nachts auf den Import von exogenem ATP angewiesen sind (EMES & NEUHAUS, 1997; NEUHAUS & WAGNER, 2000).

Aus der „Northern-Blot“-Analyse des plastidären ATP/ADP-Transporters aus Cyanophora paradoxa (AATPCp) geht deutlich hervor, dass unter diurnalen Bedingungen am Ende der Dunkel- bzw. Nachtphase das AATPCp-Transkript stark akkumuliert (Abb. 3.13.). Dagegen weist eine Cyanophora-Kultur, die im Dauerlicht angezogen wurde, keine mRNA des plastidären Transportproteins auf, was mit den Beobachtungen von SCHLICHTING et al. (1990) übereinstimmt. Diese Gruppe konnte zeigen, dass in Dauerlicht-Kulturen kein ATP-Import an isolierten Cyanellen gemessen wird. Somit kann nun postuliert werden, dass der AATPCp-Transkriptgehalt mit der entsprechenden Proteinmenge bzw. -aktivität korreliert. Physiologisch bedeutet dies für die Alge, dass der plastidäre ATP/ADP-Transporter vermutlich ausschließlich nachts eine übergeordnete Rolle spielt.

Da die Cyanelle ein intermediäres Organell zwischen einem Cyanobakterium und einem Chloroplasten darstellt (HELMCHEN et al., 1995), besitzt demnach auch ihr Stoffwechsel einige

cyanobakterielle bzw. chloroplastidäre Eigenschaften (SCHLICHTING et al., 1990). Im Licht decken die Cyanellen ihren eigenen ATP-Bedarf durch Photophosphorylierung und sind nicht auf exogenes ATP angewiesen. Dagegen wird das Cytosol von der Cyanelle mit Photoassimilaten versorgt, die über ein Triosephosphat/Phosphat-Translokator Triosephosphate exportiert werden (SCHLICHTING & BOTHE, 1993). Nachts jedoch, wenn keine Photosynthese erfolgt, benötigen die anabolen Reaktionen der Cyanelle Energie in Form von ATP. Da die Glukose extraplastidär in Form von Stärke gespeichert wird (SCHLICHTING et al., 1990), ist die Cyanelle nicht in der Lage, über einen glykolytischen Glukose-Abbau mittels einer plastidären NAD^+-abhängigen Glycerinaldeyd-3-Phosphatdehydrogenase endogenes ATP bereitzustellen (NEUHAUS & SCHULTE, 1997). Die nächtliche Zufuhr von cytosolischem ATP, die durch einen entsprechenden ATP-Importer gewährleistet wird, ist damit für die Cyanelle essentiell. Somit ist es schlußendlich nicht überaschend, daß in der vorliegenden Arbeit die Existenz eines putativen plastidären ATP/ADP-Tansporters auf molekularer Ebene bewiesen zu haben. Überraschend war eher, daß SCHLICHTING et al. (1990) aufgrund von Transportmessungen an isolierten Cyanellen die Existenz dieses Transportproteins ausschloss. So bleibt demnach festzuhalten, dass Cyanellen eine ähnliche Transporter-Ausstattung wie die Chloroplastiden höherer Pflanzen besitzen.

Bei der „Northern-Blot"-Analyse des plastidären ATP/ADP-Transporters Chlamydomas reinhardtii aus wurde bei bezüglich der mRNA-Akkumulation interessanterweise eine gegenteilige Beobachtung gemacht. So liegt unter Dauerlicht-Bedingungen eine viel stärkere mRNA-Akkumulation des plastidären ATP/ADP-Transporters (AATPCr) vor als im Vergleich zur Dunkelphase des diurnalen Rhythmus (Abb. 3.13). Unter der Annahme einer Korrelation zwischen dem Transkriptgehalt und der Transportaktivität im Fall des AATPCr-Proteins, wird eine stärkere ATP-Versorgung des Plastiden unter Dauerlicht-Bedingungen indiziert. Dies würde bedeuten, dass dem plastidären ATP/ADP-Transporter eine wesentliche Rolle im photoautotrophen Stoffwechsel zukommt. Ein mögliche Erklärung dafür wäre, dass die photosynthetische ATP-Synthese nicht ausreicht, um den ATP-Bedarf des Plastiden im Licht zu decken. Dieses Defizit könnte der plastidäre ATP/ADP-Transporter durch den Import von cytosolischem ATP in die Plastiden beheben, das zuvor im Zuge der oxidativen Phosphorylierung in den Mitochondrien synthetisiert wird. Warum der Plastid unter diesen Bedingungen zusätzliches exogenes ATP benötigt, ist jedoch unklar.

Um einen tieferen Einblick in die physiologische Bedeutung des plastidären ATP/ADP-Transporters für den photoautotrophen Stoffwechsel von Chlamydomonas reinhardtii zu erhalten, sollen zukünftig transgene Algen mit veränderten AATPCr-Aktivitäten hergestellt werden. Auf diese Weise könnte der direkte Einfluss des plastidären ATP/ADP-Transporters auf den Algenstoffwechsel analysiert werden.

4.3 Biochemische Charakterisierung der Transporteigenschaften eines nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporters aus Holospora obtusa

Holospora obtusa lebt als obligater Endosymbiont im Makronukleus des Pantoffeltierchens Paramecium caudatum und gehört innerhalb der α-Proteobakterien zur Ordnung Rickettsiales (SPRINGER et al., 1993; AMANN et al., 1991). Im Rahmen eines Holospora-Genom-Projekts wurde in Kooperation mit Dr. F. Lang (University of Montreal) eine DNA-Sequenz identifiziert, die für einen putativen nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter (NPTHo) kodiert. Aus einer phylogenetischen Analyse geht hervor, dass sich das NPTHo-Protein im Laufe der Evolution von dem monophyletischen rickettsiellen „Ur"-Protein relativ stark verändert hat (Kapitel 4.1.2). In der vorliegenden Doktorarbeit sollte eine biochemische Charakerisierung des nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporters aus Holospora obtusa im bakteriellen Expressionssystem erfolgen, um Auskunft zu erhalten, inwiefern die divergente Entwicklung möglicherweise zu veränderten Transporteigenschaften geführt hat.

4.3.1 Kinetische Daten des NPTHo-Proteins im Vergleich zu den bisher bekannten Nukleotid-Transportern

Die biochemische Charakterisierung zahlreicher nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter wurde bereits mittels heterologer Expression im bakteriellen E.coli-System erfolgreich durchgeführt (KRAUSE et al., 1985; TJADEN et al., 1998; MÖHLMANN et al., 1998; TJADEN et al., 1999). Hier nun konnte für den nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter aus Holospora obtusa ebenfalls gezeigt werden, dass das heterolog exprimierte NPTHo-Protein funktionell in die bakterielle Cytoplasmamembran integriert wird (Kapitel 3.3).

Durch eine radioaktive Markierung des exprimierten Proteins im E.coli-System und einer anschließenden Membranproteinanreicherung wurde nachgewiesen, dass NPTHo in der bakteriellen Plasmamembran eingebaut wird (Abb. 3.15). Des Weiteren zeigten Transportstudien an intakten E.coli-Zellen, die nach IPTG-Induktion den nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter aus Holospora obtusa exprimieren, eine von der Induktion abhängige ATP- bzw. ADP-Aufnahme (Abb. 3.16). Untersuchungen zur Substratspezifität des NPTHo-Proteins demonstrierten, dass diese Transporter nur ATP und ADP transportieren, andere Nukleotide bzw. Metabolite werden nicht als mögliche Transportsubstrate akzeptiert (Abb. 3.17). Demnach weist das NPTHo-Protein in Übereinstimmung mit den eubakteriellen und plastidären ATP/ADP-Transporter (mit Ausnahme des NPT2-Proteins aus Chlamydia trachomatis) ein identisches Substratspektrum auf (KRAUSE et al., 1985; MÖHLMANN et al., 1998; TJADEN et al., 1998; TJADEN et al., 1999). Die Affinität zu seinen Substraten ATP und ADP wurde in dieser Doktorarbeit für das NPTHo-Protein ermittelt (Abb 3.18). Die apparenten Substrataffinitäten des Holospora-Transporters für ATP und ADP liegen bei 300 µM bzw. 340 µM. Damit besitzt NPTHo deutlich geringere Affinitäten im Vergleich zu den anderen homologen ATP/ADP-Transportproteinen, deren K_M-Werte für beide Substrate im Bereich stets von 10 bis 50 µM liegen

(Tab. 3.2). Außerdem weisen die letztgenannten Proteinen stets eine höhere Affinität für ADP als für ATP auf (MÖHLMANN et al., 1998; TJADEN et al., 1998; TJADEN et al., 1999). Das NPTHo-Protein katalysiert den Import beider Substrate mit annähernd gleicher maximalen Geschwindigkeit (V_{max}), während bei den anderen Homologen die V_{max}-Werte für ADP bis zu dreimal höher sind als für ATP. Es ist auffällig, dass die eubakteriellen Transporter, einschließlich NPTHo, wesentlich höhere V_{max}-Werte für ihre Substrate aufweisen als die pflanzlichen Transportproteine (Tab. 3.2). Es könnte sich hierbei um eine biochemische Eigenschaft der eubakteriellen Proteinen handeln. Da die heterologe Expression im E.coli-System erfolgte, wäre es jedoch auch denkbar, dass bei den bakteriellen Transporter ein höheres Expressionsniveau oder eine bessere Integration in die E.coli-Plasmamembran dafür verantwortlich ist.

4.3.2 Möglicher Transportmechanismus des NPTHo-Proteins

Die bislang charakterisierten ATP/ADP-Transporter aus höheren Pflanzen sowie aus den intrazellulären Endoparasiten Rickettsia prowazekii (TLC1Rp) und Chlamydia trachomatis (NPT1Ct) transportieren ihre Substrate in einem striktem Gegentausch („Counter-exchange“). Dabei erfolgt ein Export von ATP bzw. ADP nur, wenn ein ADP oder ATP importiert wird (WINKLER & NEUHAUS, 1999). Demnach ist der Nukleotid-Transport stets von der Präsenz des Gegentauschsubstrats abhängig. Ein solcher Transportmechanismus konnte für die eubakteriellen und plastidären ATP/ADP-Transporter mittels „Efflux“-Experimente an den isolierten Eubakterien bzw. Plastiden sowie im heterologen E.coli-System analysiert werden (HELDT, 1969; HATCH et al., 1982; KRAUSE et al., 1985; SCHÜNEMANN et al., 1993; NEUHAUS et al., 1997; TJADEN et al., 1998a).

Bei diesen „Efflux“-Versuchen werden die Bakterien bzw. die Plastiden mit radioaktiv markiertem ATP oder ADP „vorbeladen“, wobei das entsprechende ATP/ADP-Transportprotein deren Aufnahme katalysiert. Im Falle eines „Counter-exchange“-Mechanismus sollte dann der Nukleotid-Export („Efflux“) aus den Zellen bzw. Organellen von den außen angebotenen Gegentauschsubstraten abhängig sein. Daher wurden den vorbeladenen Bakterien bzw. Plastiden als Gegentauschsubstrat ATP oder ADP angeboten, wobei die exportierten, radioaktiv markierten Nukleotide analysiert wurden (Kapitel 3.3.3.4).

Aufgrund der identischen Substratspektren wurde ebenfalls für das NPTHo-Protein ein Antiportmechanismus wie für die bisher charakterisierten ATP/ADP-Transporter postuliert. Im Rahmen von „Efflux“-Experimente konnte jedoch eine überraschende Entdeckung gemacht werden, die vollkommen von den Beobachtungen der bekannten ATP/ADP-Antiportern abweicht (Abb. 3.19 und Abb. 3.20). Diese „Efflux“-Ergebnisse sowie die im vorherigen Kapitel 4.3.1 erläuterten kinetischen Daten führen zu folgenden zwei Kernaussagen, mit denen sich im Wesentlichen die biochemischen Transporteigenschaften des NPTHo-Proteins zusammenfassen lassen:

1. Das NPTHo-Protein importiert ATP und ADP, während jedoch nur ADP (kein ATP) exportiert wird (Abb. 3.16 und 3.20).

2. Phosphat besitzt einen stimulierenden Einfluß auf den ADP-Transport des NPTHo-Proteins, nicht aber auf den ATP-Transport („Phosphat-Effekt“) (Abb. 3.20 und 3.22).

Aufgrund dieser biochemischen Transporteigenschaften sind für das NPTHo-Protein unter physiologischen Bedingungen folgende Transportmechanismen möglich: 1. Das NPTHo-Protein katalysiert den ADP/ADP-Antiport (Abb. 4.2a), d.h. ein ADP^{3-} wird in die Bakterienzelle importiert und im strikten Gegentausch ein ADP^{3-} ins Cytosol der Wirtszelle exportiert („Counter-exchange“). Ein solcher Austausch, bei dem der Netto-Transport null ist, wäre physiologisch unbedeutend, der sowohl für die Wirtszelle als auch für den Endosymbionten weder Nutzen noch Schaden würde. 2. Das NPTHo-Protein katalysiert den ATP/ADP-Antiport, wobei ein ATP^{4-} aus dem Wirts-Cytosol importiert und gleichzeitig ein endogenes ADP^{3-} exportiert wird (Abb. 4.2b). Bei diesem Transport wird netto eine negative Ladung transportiert (elektrogener Transport), was zu einer Erhöhung des elektrochemischen Potentials über der Cytoplasmamembran führt. Damit muss das Holospora-Bakterium unter „in vivo“-Bedingungen gewährleisten, dass dieser Ladungsgradient durch bestimmte Mechanismen stetig wieder abgebaut wird. Ebenfalls führt dieser Nukleotid-Antiport, bei dem im Netto-Transport ein Phosphat importiert wird, zu einer Phosphat-Akkumulation in dem Endosymbionten. Derzeit ist jedoch unbekannt, wie Holospora dieser Phosphat-Imbalance entgegenwirken kann.

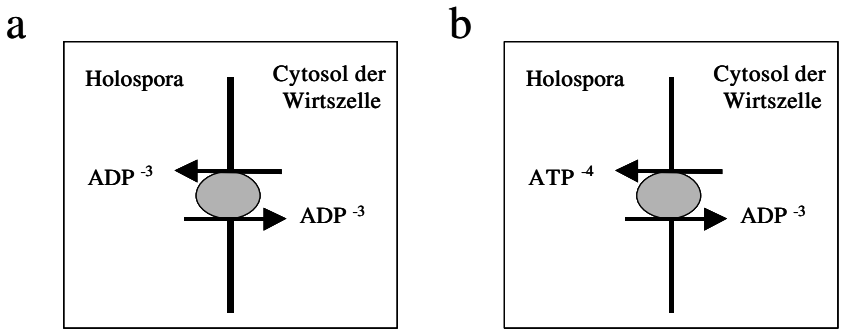


Abb. 4.2: Schema der möglichen Transportmechanismen für das NPTHo-Protein. (a) ADP/ADP-Antiport; (b) ATP/ADP-Transport.

Die physiologische Bedeutung dieser Transportrichtung der Nukleotide (Abb. 4.2b), die auch für die übrigen eubakteriellen und plastidären ATP/ADP-Transportern „in vivo“ postuliert wird, ist die Versorgung der intrazellulären Eubakterien bzw. Plastiden mit ATP (Winkler & Neuhaus, 1999). Ebenfalls steht dieser ATP-Import und ADP-Export im Einklang mit der Lebensweise von Holospora obtusa. Aus den Informationen des laufenden Holospora-Genomprojekts geht hervor, dass dieser Endosymbiont des Parameciums keine eigene ATP-Synthese über oxidative Phosphorylierung betreiben kann (Dr. F. Lang, University of Montreal, persönliche Mitteilung). So wäre ein möglicher ATP-Export durch das NPTHo-Protein für Holospora fatal. Jedoch ist das NPTHo-Protein aufgrund seiner

biochemischen Besonderheit nicht in der Lage, ATP zu exportieren. Durch diese, bisher einzigartige Transporteigenschaft besitzt der Endosymbiont des Parameciums einen erheblichen Selektionsvorteil gegenüber den anderen intrazellulären Eubakterien, die einen „klassischen“ ATP/ADP-Antiporter besitzen und unter physiologisch ungünstigen Bedingungen (geringes ATP/ADP-Verhältnis der Wirtszelle) potentiell ATP exportieren. Holospora unterliegt somit niemals der Gefahr, ATP zu verlieren.

Darüber hinaus wurde für das NPTHo-Protein ein stimulierender „Phosphat-Effekt“ für den ADP-Transport, nicht aber für den ATP-Transport beobachtet (Abb. 3.20 und 3.22). Dabei könnte das Phosphat möglicherweise zwei verschiedene Funktionen für den NPTHo-vermittelten Transport erfüllen: 1. WINKLER & DAUGHERTY (1984) postulieren, dass das Phosphat eine wichtige regulatorische Funktion für das rickettsielle Transportprotein besitzt. 2. Der Phosphat-stimulierende Effekt könnte darin begründet sein, dass es sich hier in der Tat um ein Phosphat-gekoppelten ATP/ADP-Transporter handelt, wobei Phosphat als Ko-Transportsubstrat fungiert. Damit könnte der Holospora-Transporter ATP^{4-} im strikten Gegentausch mit ADP^{3-} und Phosphat $^{1-}$ als Gegentauschsubstrate importieren, was einer Stöchiometrie von 1 : 2 entspricht (Abb. 4.3). Ein solcher ATP : ADP/Phosphat-Transport ist elektroneutral und zeichnet sich des Weiteren durch eine ausgeglichene Phosphat-Bilanz aus. Interessanterweise ist für die Glucose-6-Phosphat/Phosphat-Transporter aus Lactococcus lactis und E.coli bereits ein solcher Phosphat-gekoppelter Transportmechanismus beschrieben worden (SONNA et al., 1988; KRÄMER, 1994). Unter physiologischen Bedingungen katalysieren die letztgenannten Transporter den Transport von Glukose-6-Phosphat $^{1-}$ und Phosphat $^{1-}$ im Gegentausch mit Phosphat $^{2-}$, wobei netto ein Glukose-6-Phosphat importiert wird (SONNA, et al., 1988).

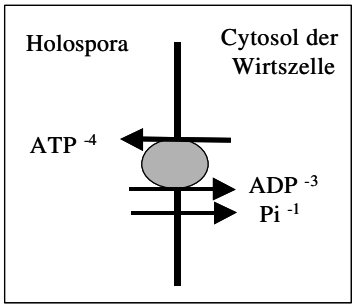


Abb. 4.3: Schema eines möglichen Transportmechanismus des NPTHo-Proteins: Der Phosphat-gekoppelte ATP/ADP-Transport.

Im Gegensatz zu den eubakteriellen und plastidären ATP/ADP-Transportern zeichnet sich das NPTHo-Protein durch eine weitere biochemische Besonderheit aus, die jedoch keine physiologische Relevanz hat. So wurde für das NPTHo-Transportprotein ein Phosphat-stimulierender ADP-Uniport beobachtet (Abb. 3.20), der sich nur unter Annahme eines Phosphat-gekoppelten Transportmechanismus erklären lässt. Das NPTHo-Protein könnte den Export von ADP^{3-} im Kotransport mit

Phosphat $^{1-}$ und im Gegentausch mit einem Phosphat $^{1-}$ katalysieren (Abb. 4.4). Dieser Netto-Export von ADP, der für den Endosymbionten infolge des Nukleotid-Verlusts eher von Nachteil wäre, würde „in vivo“ nie stattfinden.

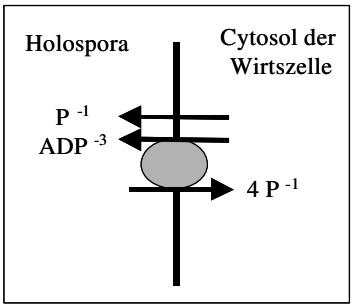


Abb. 4.4: Schema eines möglichen Transportmechanismus des NPTHo-Proteins: Der Phosphat-stimulierender ADP-Uniport.

Die Annahme eines solchen Phosphat-gekoppelten Antiportmechanismus, der aufgrund seiner biochemischen Besonderheiten für das NPTHo-Proteins indiziert wurde, könnte eines der wesentlichen bisherigen Probleme eines ATP/ADP-Antiports der eubakteriellen und plastidären ATP/ADP-Transporter lösen (elektrogener Transport; Phosphat-Imbalance). Ein ATP/ADP+Phosphat-Transport ist elektroneutral und würde daher das elektrochemische Potential der Membran nicht verändern. Die Nukleotide könnten infolge eines hohen cytosolischen ATP/ADP-Quotient der Pflanzen- bzw. Wirtszelle (STITT et al., 1982; WINKLER & DAUGHERTY, 1984) entlang ihres Konzentrationsgefälles transportiert werden. Das chemische Potential würde so zu einem gerichteten ATP-Import führen (katalysierte Diffusion). Damit könnte die seit langem offene Frage nach der antreibenden Kraft für diese nicht-mitochondrialen Transporter mit diesem Transportmechanismus geklärt werden.

Außerdem führt ein ATP/ADP+Phosphat-Transport zu einer ausgeglichenen Phosphat-Stöchiometrie, so dass die Eubakterien und Plastiden keiner Phosphat-Akkumulation ausgesetzt sind. Ein konstanter Phosphat-Spiegel in allen zellulären Kompartimenten ist für die Zelle außerordentlich wichtig, da Phosphat für viele Stoffwechselreaktionen regulatorische Funktionen besitzt. Derzeit ist unklar, wie eine solche Phosphat-Imbalance ausgeglichen werden könnte, bislang keine Transporter der bakteriellen Cytoplasmamembran bzw. an der inneren Plastidenmembran identifiziert wurden, die einen eventuellen Phosphat-Export katalysieren. Durch den oben dargestellten ATP/ADP+Phosphat-Transport könnte erstmals indiziert werden, wie die Eubakterien und die Plastiden die Phosphat-Problematik des ATP-Imports umgehen können.

Ebenso könnte ein Phosphat-gekoppelter Transportmechanismus der eubakteriellen und plastidären ATP/ADP-Transporter möglicherweise erklären, warum die Mitglieder dieser Transporter-Familie keine substantiellen molekularen Änlichkeiten zu den mitochondrialen ADP/ATP-Carrier der „Mitochondrial Carrier Family“ (MCF-Familie) aufweisen (WINKLER & NEUHAUS, 1999). Diese

Unterschiede würden demnach bei beiden Transport-Typen auf vollkommen unterschiedliche Transportmodi beruhen. Der mitochondriale ADP/ATP-Carrier katalysiert den elektrogenen Austausch von ATP $^{4-}$ und ADP $^{3-}$ und nutzt als antreibende Kraft das elektrochemische Membranpotential der inneren Mitochondrienmembran, das durch den Protonentransport der oxidativen Phosphorylierung gebildet wird (sekundär aktiver Transport). Auf diese Weise wird bevorzugt ATP $^{4-}$ exportiert und ADP $^{3-}$ importiert (KLINGENBERG,1989).

Zukünftige Experimente sollen den in dieser Arbeit postulierten Phosphat-gekoppelten Antiport für die nicht-mitochondrialen ATP/ADP-Transporter verifizieren. So soll zunächst durch weiterführende Transportstudien untersucht werden, ob Phosphat als Cosubstrat transportiert wird. So kann bislang über den Mechanismus dieser Transporter-Familie nur spekuliert werden, wobei die biochemsichen Daten des NPTHo-Protein die ersten Hinweise für einen solchen ATP/ADP+Phosphat-Transport indizieren. Dennoch bleibt die Bestätigung durch fehlende experimentielle Beweise abzuwarten.

4.3.3 Die evolutive und physiologische Bedeutung des NPTHo-Proteins

Aufgrund seiner biochemischen Besonderheit, kein ATP zu exportieren, nimmt der nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporter aus Holospora obtusa unter den bislang charakterisierten ATP/ADP-Transportern aus Eubakterien und Plastiden eine Sonderstellung ein. Diese abweichenden Transporteigenschaften lassen sich auf seine divergente Entwicklung zurückführen (Kapitel 4.1.2). So wird ebenfalls für die chlamydialen Transportproteine NPT1Ct und NPT2Ct postuliert, das sie im Zuge der Evolution unterschiedliche biochemische Eigenschaften erhalten haben (TJADEN et al., 1999).

Das NPTHo-Protein zeichnet sich im Vergleich zu den anderen Transportern dieser Familie dadurch aus, dass es nicht ATP-Export zu katalysieren vermag. Diese Transporteigenschaft könnte im Laufe der Proteinevolution durch Mutationen entstanden sein. Da Holospora die Fähigkeit zur eigenen ATP-Synthese mittels oxidativer Phosphorylierung verloren hat (Dr. F. Lang, University of Montreal, persönliche Mitteilung), könnte ein entsprechender Selektionsdruck auf das nptHo-Gen diesen Funktionswandel bewirkt haben, denn ein ATP-Export hätte für das Holospora-Bakterium fatale Folgen. Durch die Eigenschaft kein ATP zu exportieren, besitzt der Endosymbiont des Parameciums einen erheblichen Selektionsvorteil gegenüber den obligat intrazellulären Eubakterien Rickettsia prowazekii und Chlamydia trachomatis. Der rickettsielle und chlamydiale Endoparasit besitzt jeweils einen „klassischen“ ATP/ADP-Antiporter (TLC1Rp und NPT1Ct) und könnte unter physiologisch ungünstigen Bedingungen (geringes ATP/ADP-Verhältnis der Wirtszelle) sein endogenes ATP exportieren. Jedoch sind Rickettsien und Chlamydien, wenn auch unzureichend, zur eigenen ATP-Synthese befähigt (ANDERSSON et al., 1988a; STEPHANS et al., 1998).

Es ist allgemein bekannt, dass die Mutationsrate in obligat intrazellulären Endosymbionten bzw. -parasiten höher ist als in freilebenden Eubakterien (MORAN, 1996). Eine Erklärung für diese beschleunigte Mutationsrate liegt in ihrer geringen Populationsgröße begründet, wodurch die Wahrscheinlichkeit verringert ist, eingetretene Mutationen durch homologe Rekombination zu

entfernen. Demnach können sich Mutationen eher manifestieren als bei freilebenden Bakterien mit großen Populationen.

Es gibt zahlreiche Beispiele, bei denen schon geringe Aminosäure-Substitutionen zu drastischen Veränderungen der Transportereigenschaften geführt haben: 1. Der Austausch von zwei Aminosäuren in der strikt NAD-abhängigen Leucin-Dehydrogenase aus Thermoactinomyces intermedicus führt zu einem Enzym, das die gleiche Reaktion unter Verwendung von NADP als Coenzym katalysiert (GALKIN et al., 1997). 2. Durch eine chemische Modifizierung mittels Thiol-Reagenzien ist aus dem mitochondrialen ADP/ATP-Antiporter ein Uniporter, ohne Verlust der katalytischen Aktivität, entstanden (DIERKS et al., 1990). 3. Die Substitution eines einzigen Lysin-Restes bewirkt eine veränderte Substratspezifität des Glukose-6-Phosphat/Phosphat-Transporters aus E.coli. So kann die Mutante kein Glukose-6-Phosphat mehr transportieren, jedoch katalysiert sie effizient den Transport von Phosphoenolpyruvat (PEP) sowie 3-Phosphoglycerat im Phosphat-gekoppelten Mechanismus (HALL et al., 1999).

Die biochemischen Erkenntnisse über das NPTHo-Protein liefern einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Lebensweise des Endosymbionten im Makronukleus des Pantoffeltierchens Paramecium caudatum (SPRINGER et al., 1993; AMANN et al., 1991). Bisher konnte zwar der Infektionszyklus von Holospora obstusa aufgedeckt werden (GÖRTZ & BRIGGE, 1998), jedoch ist nichts über den Energiestoffwechsel von Holospora obtusa bekannt, da eine direkte Untersuchung der Physiologie dieser Endosymbionten aufgrund ihrer extrem schwierigen Anzuchtbedinungen äußerst problematisch ist. So sollen durch ein entsprechendes Genom-Projekt weitere Auskünfte über Metabolismus des Holospora- Bakteriums geben (Dr. F. Lang, University of Montreal).

5 Zusammenfassung

Die Evolution plastidärer und eubakterieller Nukleotid-Transporter, die man aufgrund biochemischer und molekularer Eigenschaften zur Familie der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter zusammenfasst, ist noch völlig ungeklärt. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde die evolutive Sequenzverwandtschaft dieser nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern aus Pflanzen und Eubakterien eingehender untersucht. So konnten folgende wichtige Fragestellungen beantwortet werden:

1. Ist der nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporter ausschließlich auf intrazelluläre Bakterien und Plastiden beschränkt?

Unter Anwendung molekularbiologischer Techniken sowie der Computer-gestützten Analyse laufender Genom- und EST-Projekte wurde im gesamten Organismenreich (Eu- und Prokaryoten) nach weiteren homologen nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern gesucht. Aufgrund der gewonnenen Daten konnte postuliert werden, dass die nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter innerhalb der Eukaryoten ausschließlich auf Plastiden-haltige Organismen beschränkt und damit im gesamten Pflanzenreich verbreitet sind. Innerhalb der Prokaryoten wurden Mitglieder dieser Transporter-Familie bislang nur in einigen wenigen endosymbiontisch bzw. endoparasitisch lebenden Eubakterien identifiziert, die der Gattung Rickettsiales und Chlamydiales angehören.

2. Wie haben sich diese Transporter innerhalb der beiden Organismenreiche entwickelt?

Aufgrund der molekularen Identifizierung eines nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporters aus Cyanophora paradoxa, konnte ein monophyletischer Ursprung aller homologen plastidären Transportproteine postuliert werden, da somit die älteste bzw. ursprünglichste Pflanze ein entsprechendes Transportsystem besitzt. Darüber hinaus wurde angenommen, dass im Verlauf der Pflanzenevolution zwischen niederen und höheren Pflanzen infolge der Ausbildung höherer Organisationsformen (Vielzeller) und der Differenzierung in Gewebe bzw. Organen Genduplikationen stattgefunden haben. Das eingeschränkte Vorkommen der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter innerhalb der Eubakterien wurde dadurch erklärt, dass die Chlamydien und Rickettsien als obligat intrazellulär lebende Eubakterien von der Außenwelt abgeschirmt sind und daher keine Möglichkeit zum Genaustausch mit weiteren Bakterienspezies besitzen. Dass Vorkommen eines solchen Transportsystems in Vertreter wurde in dieser Arbeit als mögliche Folge eines horizontaler Gentransfers diskutiert.

3. Woher stammt das Gen (Ursprung des Gens) und über welche möglichen evolutiven Wege könnte es auf die jeweiligen Organismen übertragen worden sein?

Zahlreiche Indizien sprechen für eine „de novo"-Entstehung der pflanzlichen Nukleotid-Transporter im Zuge der primären Endosymbiose zwischen einem heterotrophen Eukaryoten und einem Cyanobakterium (Entstehung der ersten Pflanzenzelle). Bei dieser Neuentstehung wurde ein möglicher evolutiver Zusammenhang zwischen den mitochondrialen und nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern indiziert, der für eine homologe Entwicklung der Sequenzmotive GLGANVALIF/V, MAYIPLD und GKSGGA in beiden Transporter-Familie sprechen könnte.

Für den chlamydialen Nukleotid-Transporter wurde in der vorliegender Arbeit postuliert, dass Chlamydien dieses Gen sowie einige andere „pflanzliche Gene" mittels horizontalen Gentransfer aus einer frühen, einzelligen Pflanzenzelle erworben haben. Ferner wurde diskutiert, welche Wege für einen horizontaler Gentransfer zwischen Rickettsien und Chlamydien bzw. Rickettsien und Pflanzen möglich sein könnten, um das Vorkommen rickettsieller Nukleotid-Transporter zu erklären.

4. Inwiefern haben sich die Transporteigenschaften nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter im Laufe ihrer divergenten Entwicklung verändert?

Der nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporters aus Holospora obtusa (NPTHo), einem obligaten Endosymbiont des Pantoffeltierchens, zeichnet sich im Vergleich zu den bisher charakterisierten Nukleotid-Transporter durch einzigartige Transporteigenschaften aus, die dem intrazellulären Eubakterium einen erheblichen Selektionsvorteil verleihen. Aus den kinetischen Daten des NPTHo-Protein wurde ein neuer Phosphat-gekoppelten Transportmechanismus postuliert, der auf die nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter übertragen ist, wodurch sich die generellen Probleme des bislang postulierten „einfachen" ATP/ADP-Antiports lösen lassen.

6 Literaturverzeichnis

Andersson, S. G. E.; Zomorodipour, A.; Anderson, J. O.; Sicheritz-Pontén, T.; Cecilia, U.; Alsmark, M.; Podowski, R. M.; Näslund, A. K.; Eriksson, A. S.; Winkler, H. H.; Kurland, C. G. (1998a) The genome sequence of Rickettsia prowazekii and the origin of mitochondria. Nature 396: 133-140.

Andersson, S. G. E. (1998b) Bioenergetics of the obligate intrcellular parasite Rickettsia prowazekii. Biochim. Biophys. Acta 1365: 105-111.

Amann, R.; Springer, N.; Ludwig, W.; Görtz, H. D.; Schleifer, K. H. (1991) Identification in situ and phylogeny of uncultured bacterial endosymbionts. Nature 351: 161-164.

Amati, B. B.; Goldschmidt-Clermont, M.; Wallace, C. J.; Rochaix, J. D. (1989) cDNA and deduced amino acid sequences of cytochrom c from Chlamydomonas reinhardtii: unexpected functional and phylogenetic implications. J. Mol. Biol. Evol. 28: 151-160.

Benton, W. D.; Davis, R. W. (1977) Screening λgt recombinant clones by hybridization to single plaques in situ. Science 196: 180-182.

Bhattacharya, D.; Medlin, L. (1995) The phylogeny of plastids: a review based on comparisons of small-subunit ribosomal RNA coding regions. J. Phycol. 31: 489-498.

Bhattacharya, D.; Medlin, L. (1998) Algal phylogeny and the origin of land plants. Plant Physiol. 116: 9-15.

Bowman, S.; Lawson, D.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Churcher, C. M.; Craig, A.; Davies, R. M.; Devlin, K.; Feltwell, T.; Gentles, S.; Gwilliam, R.; Hamlin, N.; Harris, D.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Horrocks, P.; Jagels, K.; Jassal, B.; Kyes, S.; McLean, J.; Moule, S.; Mungall, K.; Murphy, L.; Barrell, B. G. et al. (1999) The complete nucleotide sequence of chromosome 3 of Plasmodium falciparum. Nature 400: 532-528.

Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle pf protein-dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-254.

Brocks, J. J.; Logan, G. A.; Buick, R.; Summons, R. E. (1999) Archean molecular fossils and the early rise of eukaryotes. Science 285: 1033-1036.

Bult, C. J.; White ,O.; Olsen, G. J.; Zhou, L.; Fleischmann, R. D.; Sutton, G. G., Blake, J. A.; FitzGerald, L. M.; Clayton, R. A.; Gocayne, J. D.; Kerlavage, A. R.; Dougherty, B. A.; Tomb, J. F.; Adams, M. D.; Reich, C. I.; Overbeek, R.; Kirkness, E. F.; Weinstock, K. G.; Merrick, J. M.; Glodek, A.; Scott, J. L.; Geoghagen, N. S.; Venter, J. C. et al. (1996) Complete genome sequence of the methanogenic archaeon, Methanococcus jannaschii. Science 273: 1058-1073.

Cavalier-Smith, T. (2000) Membrane heredity and early chloroplast evolution. Trends in Plant Science 5: 174-182.

Chapman, R. L.; Buchheim, M. A. (1991) Ribosomal RNA gene sequences: anaylsis and significance in the phylogeny and taxonomy of green algae. Crit. Rev. Plant Sci. 10: 343-368.

Chomczynski, P.; Sacchi, N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Ana. Biochem. 162: 156-159.

Chou, I. T.; Glasser, C. S. (1997) Characterization of the cyclophilin gene family of Arabidopsis thaliana and phylogenetic analysis of known cyclophilin proteins. Plant Mol. Biol. 35: 873-892.

Church, G. M.; Gilbert, W. (1984) Genomic sequencing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79: 7624-7628.

Cole, S. T.; Brosch, R.; Parkhill, J. ; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S. V.; Eiglmeier, K.; Gas, S.; Barry, C. E.; Tekaia, F.; Badcock, K.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Connor, R.; Davies, R.; Delvin, K.; Feltwell, T.; Gentles, S.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Barrell, B. G. et al. (1998) Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence. Nature 393: 537-544.

Davis, M. J.; Ying, Z.; Brunner, B. R.; Pantoja, A.; Ferwerda, F. H. (1998) Rickettsial relative associated with Papaya bunchy top disease. Current Microbiol. 36: 80-84.

Deckert, G.; Warren, P. V.; Gaasterland, T.; Young, W. G.; Lenox, A. L.; Graham, D. E.; Overbeek, R.; Snead, M. A.; Keller, M.; Aujay, M.; Huber, R.; Feldman, R. A.; Short, J. M.; Olsen, G. J.; Swanson, R. V. (1998) The complete genome of the hyperthermophilic bacterium Aquifex aeolicus. Nature 392: 353-358.

Delwiche, C. F.; Palmer J. D. (1996) Rampant horizontal transfer and duplication of rubisco genes in eubacteria and plastids. Mol. Biol. Evol. 13: 873-882.

Delwiche, C. F.; Palmer, J. D. (1997) The origin of plastids and their spread via secondary symbiosis. In: Origin of algae and their plastids. D. Bhattacharya (ed.), Springer Verlag, Wien.

Devereux, R.; Loeblich, A. R.; Fox, G. E. (1990) Higher plant origins and the phylogeny of green algae. J. Mol. Evol. 31: 18-24.

Dierks, T.; Salentin, A.; Heberger, C.; Krämer, R. (1990) The mitochondrial asparate/glutamate and ADP/ATP carrier switch from obligate counterexchange to unidirektional transport after modification by SH-reagents. Biochim. Biophys. Acta 1028: 268-280.

Doolittle, W. F. (1999) Phylogenetic classification and the universal tree. Science 284: 2124-2128.

Douglas, S. E. (1998) Plastid evolution: origins, diversity, trends. Curr. Opin. Genet. Dev. 8: 655-661.

Drancourt, M.; Raoult, D. (1994) Taxonomic position of the Rickettsiae: current knowledge. FEMS Microbiol. Rev. 13: 13-24.

Felsenstein, J. (1993) PHYLIP (Phylogeny inference package) manual, version 3.5c (Univ. Washington, Seattle, Dept. Genetics).

Fiore, C.; Trézéguet, V.; Le Saux, A.; Roux, P.; Schwimmer, C.; Dianoux, A. C.; Noel, F.; Lauquin, G.J.-M.; Brandolin, G.; Vignais, P. V. (1998) The mitochondrial ADP/ATP carrier: structural, physiological and pathological aspects. Biochimie 80: 137-150.

Flügge, U. I. (1998) Metabolite transporters in plastids. Curr. Opin. Plant Biol. 1: 201-206.

Fraser, C. M.; Casjens, S.; Huang, W. M.; Sutton, G. G.; Clayton, R.; Lathigra, R.; White, O.; Ketchum, K. A.; Dodson, R.; Hickey, E. K.; Gwinn, M.; Dougherty, B.; Tomb, J. F.; Fleischmann, R. D.; Richardson, D.; Peterson, J.; Kerlavage, A. R.; Quackenbush, J.; Salzberg, S.; Hanson, M.; van Vugt, R.; Palmer, N.; Adams, M. D.; Gocayne, J.; Venter, J. C. et al. (1997) Genomic sequence of a Lyme disease spirochaete, Borrelia burgdorferi. Nature 390: 580-586.

Fritsche, T. R.; Horn, M.; Seyedirashti, S.; Gautom, R. K.; Schleifer, K. H.; Wagner, M. (1999) In situ detection of novel bacterial endosymbionts of Acanthamoeba spp. phylogenetically related to members of the order Rickettsiales. Appl. Environ. Microbiol. 65: 206-212.

Fritsche, T. R., Horn, M.; Wagner, M.; Herwig, R. P.; Schleifer, K. H.; Gautom, R. K. (2000) Phylogenetic diversity among geographically dispersed Chlamydiales endosymbionts recovered from clinical and enviromental isolates of Acanthamoeba spp. Appl. Environ. Microbiol. 66: 2613-2619.

Garcia-Vallvé, S.; Romeu, A.; Palau, J. (2000) Horizontal gene transfer in bacterial and archeal complete genomes. Genome Res. 10: 1719-1724.

Gardner, M. J.; Tettelin, H.; Caruci, D. J.; Cummings, L. M.; Aravind, L.; Koonin, E. V.; Shallom, S.; Mason, T.; Yu, K.; Fujii, C.; Pederson, J.; Shen, K.; Jing, J.; Aston, C.; Lai, Z.; Schwartz, D. C.; Pertea, M.; Salzberg, S.; Zhou, L.; Sutton, G. G.; Clayton, R.; White, O.; Smith, H. O.; Fraser, C. M.; Hoffman, S. L. et al. (1998) Chromosome 2 sequence of the human malaria parasite Plasmodium falciparum. Science 282: 1126-1132.

Giddings, T. H.; Wasmann, C.; Staehelin, A. (1983) Structure of the thylakoids and envelope membranes of the cyabnelles of Cyanophora paradoxa. Plant Physiol. 71: 409-419.

Goffeau, A.; Barrell, B. G.; Bussey, H.; Davis, R. W.; Dujon, B.; Feldmann, H.; Galibert, F.; Hoheisel, J. D.; Jacq, C.; Johnston, M.; Louis, E. J.; Mewes, H. W.; Murakami, Y.; Philippsen, P.; Tettelin, H.; Oliver, S. G. (1996) Life with 60000 genes. Science 274: 563-567.

Gray, M. W.; Burger, G.; Lang, B. F. (1999) Mitochondrial Evolution. Science 283: 1476-1481.

Hakenberg, H.; Klingenberg, M. (1980) Molecular weight and hydrodynamic parameters of the adenosine 5`-diphosphate-adenosine 5`-triphosphate carrier in Triton X-100. Biochem. 19: 548-555.

Hall, J. A.; Fann, M. C.; Malony, P. C. (1999) Altered substrate selectivity in a mutant of an intrahelical salt bridge in UhpT, the sugar phosphate carrier of Escherichia coli. J. Biol. Chem. 274: 6148-6153.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. J. Mol. Biol. 166: 557-580.

Harris, E. H. (1989) The Chlamydomonas sourcebook: a comprehensive guide to biology and laboratory use. San Diego, Academic Press, Inc.

Häuber, M. M.; Müller, S. B.; Speth, V.; Maier, U. G. (1994) How to evolve a complex plastid? A hypothesis. Bot. Acta 107: 383-386.

Heldt, H. W. (1969) Adenine nucleotide translocation in spinach chloroplasts. FEBS Lett. 5: 11-14.

Helmchen, T. A.; Bhattacharya, D.; Melkonian, M. (1995) Analyses of ribosomal RNA sequences from Galucocystophyte Cyanelles provide new insights into the evolutionary relationships of plastids. J. Mol. Evol. 41: 203-210.

Himmelreich, R.; Hilbert, H.; Pirkl, E.; Li, B. C.; Herrmann, R. (1996) Complete sequence analysis of the genome of the bacterium Mycoplasma pneumoniae. Nucleic. Acids Res. 24: 4420-4449.

Iliffe-Lee, E. R.; McClarty, G. (1999) Glucose metabolism in Chlamydia trachomatis: the “energy parasite” hypothesis revisited. Mol. Microbiol. 33: 177-187.

Jakowitsch, J.; Bayer, M. G.; Maier, T. L.; Lüttke, A.; Gebhart, U. B.; Brandtner, M.; Hamilton, B.; Neumann-Spallart, C.; Michalowski, C. B.; Bohnert, H. J.; Schenk, H. E. A.; Löffelhardt, W. (1993) Sequence analysis of pre-ferredoxin-$NADP^+$-reductase cDNA from Cyanophora paradoxa specifying a precursor for a nucleus-encoded cyanelle polypeptide. Plant Mol. Biol. 21: 1023-1033.

Kampfenkel, K.; Möhlmann, T.; Batz, O.; van Montagu, M.; Inzé, D.; Neuhaus, H.E. (1995) Molecular characterization of an Arabidopsis thaliana cDNA encoding a novel putative adenylate translocator of higher plants. FEBS Lett. 374: 351-355.

Kaneko, T.; Sato, S.; Kotani, H.; Tanaka, A.; Asamizu, E.; Nakamura, Y.; Miyajima, N.; Hirosawa, M.; Sugiura, M.; Sasanoto, S.; Kimura, T.; Hosouchi, T.; Matsuno, A.; Muraki, A.; Nakazaki, N.; Naruo, K.; Okumura, S.; Shimpo, S.; Takeuchi, C.; Wada, T.; Watanabe, A.; Yamada, M.; Yasuda, M.; Tabata, S. (1996) Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium Synechocystis sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. DNA Res. 3: 109-136.

Kies, L.; Kremer, B. P. (1986) Typification of the glaucocystophyta. Taxon 35: 128-133.

Klenk, H. P.; Clayton, R. A.; Tomb, J. F.; White, O.; Nelson, K. E.; Ketchum, K. A.; Dodson, R. J.; Gwinn, M.; Hickey, E. K.; Peterson, J. D.; Richardson, D. L.; Kerlavage, A. R.; Graham, D. E.; Kyrpides, N. C.; Fleischmann, R. D.; Quackenbush, J.; Lee, N. H.; Sutton, G. G.; Gill, S.; Kirkness, E. F.; Dougherty, B. A.; McKenney, K.; Adams, M. D.; Loftus, B.; Venter, J. C. et al (1997) The complete genome sequence of the hyperthermophilic, sulphate-reducing archaeon Archaeoglobus fulgidus. Nature 390: 364-370

Klingenberg, M. (1989) Molecular aspects of adenine nucleotide carrier from mitochondria. Arch. Biochem. Biophys. 270: 1-14.

Kowallik, K. V.; Stöbe, B.; Schaffran, I.; Kroth-Pancic, P.; Freier, U. (1995) The chloroplast genome of a chlorophyll a+c containing alga, Odontella sinensis. Plant Mol. Biol. Rep. 13: 336-342.

Krämer, R. (1994) Functional principles of solute transport system concepts and perspectives. Biochim. Biophys. Acta 1185: 1-34.

Krause, D. C.; Winkler, H. H.; Wood, D. O. (1985) Cloning and expression of the Rickettsia prowazekii ATP/ADP translocator in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 3015-3019.

Kroth-Pancic, P. G. (1995) Nucleotide sequence of two cDNAs encoding fucoxanthin chlorophyll a/c proteins in the diatoms Odontella sinensis. Plant Mol. Biol. 27: 825-828.

Kroth, P.; Strotmann, H. (1999) Diatom plastids: secondary endocytobiosis, plastid genome and protein import. Physiologia Plantarum 107: 136-141.

Kuan, J.; Saier, M. H. Jr. (1993) The mitochondrial carrier family of transport proteins: structural, functional, and evolutionary relationships. Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. 28: 209-233.

Kunst, F.; Ogasawara, N.; Moszer, I.; Albertini, A. M.; Alloni, G.; Azevedo, V.; Bertero, M. G.; Bessieres, P.; Bolotin, A.; Borchert, S.; Borriss, R.; Boursier, L.; Brans, A.; Braun, M.; Brignell, S. C.; Bron, S.; Brouillet, S.; Bruschi, C. V.; Caldwell, B.; Capuano, V.; Carter, N. M.; Choi, S. K.; Codani, J. J.; Connerton, I. F.; Danchin, A. et al. (1997) The complete genome sequence of the gram-positive bacterium Bacillus subtilis. Nature 390: 249-256.

Kyte, J.; Doolittle, R. F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. J Mol Biol 157: 105-132.

Laemmli, K. (1970) Cleavage of strucural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227: 680-685.

Löffelhardt, W.; Bryant, D. A.; Bohnert, H. J. (1997) The cyanelles of Cyanophora paradoxa. Crit. Rev. Plant Sci. 16: 393-413.

Maier, U. G. (1996) Die Evolution von Zellen. Naturwissenschaften 83: 103-112.

Malony, P. C. (1990) A consensus struture for membrane transport. Res. Microbiol. 141: 374-383.

Mangold, H. K. (1967) Nucleinsäuren und Nucleotide. In: Dünnschicht-Chromatographie. Ein Laboratoriums-handbuch. E. Stahl (ed.), Springer Heidelberg, Germany: 749-769.

Marger, M. D.; Saier, M. H. (1993) A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyse uniport, symport and antiport. TIBS 18: 13-20.

Margulis, L. (1970) Origin of eukaryotic cells. Yale University Press.

Martin, W.; Hermann, R. G. (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and why? Plant Physiol. 118: 9-17.

Martin, W.; Müller, M. (1998) The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. Nature 392: 37-41.

Martin, W.; Stoebe, B.; Goremykin, V.; Hansmann, S.; Hasegawa, M.; Kowallik, K. V. (1998) Gene transfer to the nucleus and the evolution of chloroplasts. Nature 393: 162-165.

Martin, W. (1999) Mosaic bacterial chromosomes: a challenge en route to a tree of genomes. BioEssays 21: 99-104.

McArthur, A. G.; Morrison, H. G.; Nixon, J. E.; Passamaneck, N. Q.; Kim, U.; Hinkle, G.; Crocker, M. K.; Holder, M. E.; Farr, R.; Reich, C. I.; Olsen, G. E.; Aley, S. B.; Adam, R. D.; Gillin, F. D.; Sogin, M. L. (2000) The Gardia genome project database. FEMS Microbiol. Lett. 189: 271-273.

McFadden, G. I. (2001) Chloroplast origin and integration. Plant Physiology 125: 50-53.

Miroux, B.; Walker, J. E. (1996) Over-production of proteins in Escherichia coli: mutants hosts that allow synthesis of some membrane proteins and globular proteins at high levels. J Mol Biol 260: 289-298.

Möhlmann, T.; Scheibe, R.; Neuhaus, H. E. (1994) Interaction between starch synthesis and fatty-acid synthesis in isolated cauliflower-bud amyloplasts. Planta 194: 492-497.

Möhlmann, T.; Tjaden, J.; Schwöppe, C.; Winkler, H. H.; Kampfenkel, K.; Neuhaus, H. E. (1998) Occurence of two plastidic ATP/ADP transporters in Arabidopsis thaliana: Molecular characterisation and comparative structural analysis of homologous ATP/ADP translocators from plastids and Rickettsia prowazekii. Eur. J. Biochem. 252: 353-359.

Moran, N. (1996) Accelerated evolution and Muller`s rachet in the endosymbiotic bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:2873-2878.

Myler, P. J.; Audleman, L.; deVos, T.; Hixon, G.; Kiser, P.; Lemley, C.; Magness, C.; Rickel, E.; Sisk, E.; Sunkin, S.; Swartzell, S.; Westlake, T.; Bastien, P.; Fu, G.; Ivens, A.; Stuart, K. (1999) Leishmania major Friedlin chromosom I has an unusual distribution of protein-coding genes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 2902-2906.

Nelson, D. R.; Douglas, M. G. (1993) Function-based mapping of the yeast mitochondrial ADP/ATP translocator by selection for second site revertants. J. Mol. Biol. 230: 1171-1182.

Neuhaus, H. E.; Henrichs, G.; Scheibe, R. (1993) Characterization of glucose-6-phosphate incorporation into starch by isolated intact cauliflower-bud plastids. Plant Physiol. 101:573-578.

Neuhaus, H. E.; Maaß, U. (1996) Unidirectional transport of orthophosphate across the envelope of isolated cauliflower-bud amyloplasts. Planta 198: 396-401.

Neuhaus, H. E.; Schulte, N. (1997) Starch degradation in chloroplasts isolated from C_3 or CAM (crassulacean acid metabolism) induced Mesembryanthemum crystallinum. Biochem. J. 318: 945-953.

Neuhaus, H. E.; Thom, E.; Möhlmann, T.; Steup, M.; Kampfenkel, K. (1997) Characterization of novel eukaryotic ATP/ADP translocator located in the plastid envelope of Arabidopsis. Plant J. 11: 73-82.

Neuhaus, H. E.; Emes, M. J. (2000) Development of non-green plastids. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 51: 353-359.

Nicholas, K. B.; Nicholas, H. B. (1997) GeneDoc: a tool for editing and annotating multiple sequence alignments. Distributed by the authors.

Olsen, G. J. et al. (1994) The winds of (evolutionary) change : new life into microbiology. J. Bacteriol. 176: 1-6.

Page, R. D. M. (1996) TREEVIEW: an application to display phylogenetic trees on personal computers. Comp. Appl. Biosci. 12: 357-358.

Palmer, J. D. (2000) A single birth of all plastids? Nature 405: 32-33.

Pancic, P. G.; Strotmann, H. (1993) Structure of the nuclear γ subunit of CF_0CF_1 of the diatom Odontella sinensis including its presequence. FEBS Lett. 320: 61-66.

Plano, G. V.; Winkler, H. H. (1989) Solubilization and reconstitution of the Rickettsia prowazekii ATP/ADP translocase. J. Memb. Biol. 110: 227-233.

Plano, G. V.; Winkler, H. H. (1991) Identification and initial topological analysis of the Rickettsia prowazekii ATP/ADP translocase. J. Bacteriol. 173: 3389-3396.

Pos, K. M.; Dimroth, P. ; Bott, M. (1998) The Escherichia coli Citrate carrier CitT: a membran of a novel eubacterial transporter family related to the 2-oxoglutarate/malate translocator from spinach chloroplasts. J. Bacteriol. 180: 4160-4165.

Reith, M.; Munholland, J. (1995) Complete nucleotide sequence of the Porphyra purpurea chloroplast genome. Plant Mol. Biol. Rep. 13: 333-335.

Saier, M. H. Jr. (1994) Computer-aided analyses of transport protein sequences: gleaning evidence concerning function, struture, biogenesis, and evolution. Mircobiol. Rev. 58: 71-93.

Saier, M. H. Jr. (2000) Vectorial metabolism and the evolution of transport systems. J. Bacteriol. 182: 5029-5035.

Saitou, N.; Nei, M. (1987) The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406-425.

Sambrook, J.; Fritsch, E. F.; Maiatis, T. (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, USA.

Schlichtung, R.; Zimmer, W.; Bothe, H. (1990) Exchange of metabolites in Cyanophora paradoxa and its cyanelles. Bot: Acta 103: 392-398.

Schlichtung, R.; Bothe, H. (1993) The cyanelles (organelles of a low evolutionary scale) posses a phosphate-translocator and a glucose-carrier in Cyanophora paradoxa. Bot. Acta 106: 428-434.

Shigenobu, S.; Watanabe, H.; Hattori, M.; Sakaki, Y.; Ishikawa, H. (2000) Genome sequence of the endocellular bacterial symbiont of aphids Buchnera sp. APS. Nature 407: 81-86.

Simpson, A. J. G.; Reinach, F. C.; Arruda, P.; Abreu, F. A.; Acencio, M.; Alvarenga, R.; Alves, L. M. C.; Araya, J. E.; Baia, G. S.; Baptista, C. S.; Barros, M. H.; Bonaccorsi, E. D.; Bordin, S.; Bové, J. M.; Briones, M. R. S.; Bueno, M. R. P.; Camargo, A. A.; Camargo, L. E. A.; Carraro, D. M.; Carrer, H. et al. (2000) The genome sequence of the plant pathogen Xylella fastidiosa. Nature 406: 151-157.

Smith, D. R.; Doucette-Stamm, L. A.; Deloughery, C.; Lee, H.; Dubois, J.; Aldredge, T.; Bashirzadeh, R.; Blakely, D.; Cook, R.; Gilbert, K.; Harrison, D.; Hoang, L.; Keagle, P.; Lumm, W.; Pothier, B.; Qiu, D.; Spadafora, R.; Vicaire, R.; Wang, Y.; Wierzbowski, J.; Gibson, R.; Jiwani, N.; Caruso, A.; Bush, D.; Reeve, J. N. et al. (1997) Complete genome sequence of Methanobacterium thermoautotrophicum deltaH: functional analysis and comparative genomics. J Bacteriol. 179: 7135-7155.

Soltis, P. S.; Soltis, D. E.; Wolf, P. G.; Nickrent, D. L.; Chaw, S. M.; Chapman, R. L. (1998) The phylogeny of land plants inferred from 18S rDNA sequences: pushing the limits of rDNA signal? Mol. Biol. Evol. 16:1774-17784.

Sonna, L. A.; Ambudkar, S. V.; Maloney, P. C. (1988) The Mechanism of glucose 6-phosphate transport by Escherichia coli. J. Biol. Chem. 263: 6625-6630.

Springer, N.; Ludwig, W.; Amann, R.; Schmidt, H. J.; Görtz, H. D.; Schleifer, K. H. (1993) Occurence of fragmented 16S rRNA in an obligate bacterial endosymbiont of Paramecium caudatum. Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 9892-9895.

Stamme, C. (1999) Identifizierung von zum ATP/ADP-Transporter homologen Membranproteinen. Diplomarbeit, Universität Osnabrück.

Steinert, M.; Hentschel, U.; Hacker, J. (2000) Symbiosis and pathogenesis: evolution of the microbe-host interaction. Naturwissenschaften 87: 1-11.

Stephans, R. S.; Kalman, S.; Lammel, C.; Fan, J.; Marathe, R.; Aravind, L.; Mitchell, W.; Olinger, L.; Tatusol, R. L.; Zhao, Q.; Koonin, E. V.; Davis, R. W. (1998) Genome sequence of an obligate intracellular pathogen of humans: Chlamydia trachomatis. Science 282: 754-759.

Stitt, M.; McLilley, R.; Heldt, H. W. (1982) Adenine nucleotide levels in the cytosol, chloroplasts, and mitochondria of wheat leaf protoplasts. Plant Physiol. 70: 971-977.

Studier, F. W.; Rosenberg, A. H.; Dunn, J. J.; Dubenhoff, J. W. (1990) The use of T7 polymerase to direct expression of cloned genes. Meth. Enzymol. 185: 60-89.

Stover, C. K.; Pham, X. Q.; Erwin, A. L.; Mizoguchi, S. D.; Warrener, P.; Hickey, M. J.; Brinkman, F. S. L.; Hufnagle, W. O.; Kowalik, D. J.; Largou, M.; Garber, R. L.; Goltry, L.; Tolentino, E.; Westbrock-Wadman, S.; Yuan, Y.; Brody, L. L.; Coulter, S. N.; Folger, K. R.; Kas, A.; Larbig, K.; Lim, R.; Smith, K.; Spencer, D.; Wong, G. K. S.; Wu, Z.; Paulsen, I. T.; Reizer, M. H.; Saier, M. H.; Hancock, R. E. W.; Lory, S.; Olson, M. V. (2000) Complete genome sequence of Pseudomonas aeruginosa PAO1, an opportunistic pathogen. Nature 406: 959-964.

Sueoka, N. (1960) Mitotic replication of desoxyribonucleic acid in Chlamydomonas reinhardtii. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 46: 83-91.

Tettlin, H.; Saunders, N. J.; Heidelberg, J.; Jeffries, A. C.; Nelson, K. E.; Eisen, J. A.; Ketchum, K. A.; Hood, D. W.; Peden, J. F.; Dodson, R. J.; Nelson, W. C.; Gwinn, M. L.; Deboy, R.; Peterson, J. D.; Hickey, E. K.; Haft, D. H.; Salzberg, S. L.; White, O.; Fleischmann, R. D.; Dougherty, B. A.; Mason, T.; Ciecko, A.; Parksey, D. S.; Blair, E.; Cittone, H.; Clark, E. B.; Cotton, E. B.; Utterback, T. R.; Khouri, H.; Qin, H.; Vamathevan, J.; Gill, J.; Scarlato, V.; Masignani, V.; Pizza, M.; Grandi, G.; Sun, L.; Smith, H. O.; Fraser, C. M.; Moxon, E. R.; Rappuoli, R.; Venter, J. C. (2000) Complete genome sequence of Neisseria meningitidis serogroup B strain MC58. Science 287: 1809-1815.

Thompson, J. D.; Higgins, D. G.; Gibson, T. J. (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penities and weight matrix choice. Nucleic Acids Res. 22: 4673-4680.

Tomb, J. F.; White, O.; Kerlavage, A. R.; Clayton, R. A.; Sutton, G. G.; Fleischmann, R. D.; Ketchum, K. A.; Klenk, H. P.; Gill, S.; Dougherty, B. A.; Nelson, K.; Quakenbusch, J.; Zhou, L.; Kirkness, E. F.; Peterson, S.; Loftus, B.; Richardson, D.; Dodson, R.; Khalak, H. G.; Glodek, A.; McKenney, K.; Fritzgerald, L. M.; Lee, N.; Adams, M. D.; Venter, J. C. et al. (1997) The complete genome sequence of the gastric pathogen Helicobacter pylori. Nature 389: 412.

Trentmann, O.; Decker, C.; Winkler, H. H.; Neuhaus, H. E. (2000) Charged amino-acid residues in transmembrane domains of the plastidic ATP/ADP transporter from Arabidopsis are important for transport efficiency, substrate specificity, and outer exchange properties. Eur. J. Biochem. 267: 4098-4105.

Tjaden, J.; Schwöppe, C.; Möhlmann, T.; Quick, P. W.; Neuhaus, H. E. (1998a) Expression of a plastidic ATP/ADP Transporter gene in Escherichia coli leads to a functional adenine nucleotide transport system in the bacterial cytoplasmic membrane. J. Biol. Chem. 273: 9630-9636.

Tjaden, J.; Möhlmann, T.; Kampenkel, K.; Henrichs, G.; Neuhaus, H. E. (1998b) Altered plastidic ATP/ADP transporter activity influences potato (Solanum tuberosum) mophology, amount and composition of tuber starch, and tuber morphology. Plant J. 16: 531-540.

Tjaden, J.; Winkler, H. H.; Schwöppe, C.; Van der Laan, M.; Möhlmann, T.; Neuhaus, H. E. (1999) Two Nucleotide transport proteins in Chlamydia trachomatis, one for net nucleoside triphosphate uptake and the other for transport of energy. J. Bacteriol. 181: 1196-1202.

Vignais, P. V. (1976) Molecular and physiological aspects of adenine nucleotide transport in mitochondria. Biochim. Biophys. Acta 456: 1-38.

Wagner, R.; Neuhaus, H. E. (2000) Solute pores, ion channels, and metabolites transporters in the outer and inner envelope membranes of higher plant plastids. BBA 1465: 307-323.

Weber, A.; Servaites, J. C. ; Geiger, D. R.; Kofler, H.; Hille, D.; Gröner, F.; Hebbeker, U.; Flügge, U. I. (2000) Identification, purification, and molekular cloning of a putative plastidic glucose translokator. Plant Cell 12: 787-801.

Weisburg, W. G.; Dobson, M. E.; Samuel, J. E.; Dasch, G. A.; Mallavia, L. P.; Baca, O.; Mandelco, L.; Sechrest, J. E.; Weiss, E.; Woese, C. R. (1986) Eubacterial origin of chlamydiae. J. Bacteriol. 167: 570-574.

Williamson, L. R.; Plano, G. V.; Winkler, H. H.; Krause, D. C.; Wood, D. O. (1989) Nucleotide sequence of the Rickettsia prowazekii ATP/ADP translocase-encoding gene. Gene 80: 269-278.

Winkler, H. H. (1976) Rickettsial permeability. J. Biol. Chem. 251: 389-396.

Winkler, H. H.; Daugherty, R. M. (1984) Regulatory role of phosphate and other anions in transport of ADP and ATP by Rickettsia prowazekii. J. Bacteriol. 160: 76-79.

Winkler, H. H.; Neuhaus, HE. (1999) Non-mitochondrial adenylate transport. Trends in Biochemical Science S 24: 64-68.

Woese, C. (1998) The universal ancestor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 6854-6859.

Wolf, Y. I.; Aravind, L.; Koonin, E. V. (1999) Rickettsiae and Chlamydiae - evidence of horizontal gene transfer and gene exchange. Trends in Genetic Science 15: 173-175.

7 Anhang

7.1 DNA-Sequenzanalyse homologer Transportproteine aus Prokaryoten

Die DNA-Sequenzanalyse homologer Transportproteine aus Prokaryoten, die in dieser Doktorarbeit identifiziert wurden, ergab, dass sich alle genomischen DNA-Sequenzen aufgrund der hohen Sequenz-Ähnlichkeiten zur Gruppe der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter zuordnen lassen. Mit Ausnahme der NPTHo-DNA enthalten die anderen Nukleotidsequenzen nicht den gesamten kodierenden Aminosäurebereich und kodieren somit nur für ein Teilpeptid. Aus diesem Grund fehlt bei diesen Transportproteinen entweder der N- und/oder C-Terminus.

Tab. 7.1: Die in dieser Arbeit identifizierten, homologen Transporter aus Prokaryoten

Name	Organismus	Nukleotidsequenz	ORF	Kapitel
NPTC36	Rickettsia-verwandter Endosymbiont C36	729 bp	243 aa	7.11.
NPTCc	Caedibacter caryophila	723 bp	241 aa	7.1.2
NPTET39	Ceadibacter-verwandter Endosymbiont ET39	783 bp	261 aa	7.1.1
NPTHN3	Caedibacter-verwandter Endosymbiont HN3	783 bp	261 aa	7.1.1
NPTHo	Holospora obstusa	2180 bp	514 aa	7.1.3
NPT Pbtb	Endoparasit der Papaya-Früchte Pbtb	759 bp	253 aa	7.1.4
NPTTUME1	Chlamydia-vewanter Endosymbiont TUME1	729 bp	243 aa	7.1.1

7.1.1 DNA-Sequenzanalyse von NPTTUME1, NPTHN3, NPTET39 und NPTC36

Die genomischen DNA-Teilsequenzen der vier verschiedenen Endosymbionten des Protisten Acanthamoebea C36, ET39, HN3 und TUME1 mit einer Länge von 729 bp bis 783 bp, die in Kooperation mit Dr. M. Wagner (Technische Universität München) isoliert werden konnten, kodieren für Polypeptide, die aus 243 bzw. 261 Aminosäuren bestehen und zu den nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern homolog sind. Diese DNA-Abschnitte entsprechen nicht der vollständigen kodierenden Nukleotidsequenzen. Die Sequenzinformationen für die 5´- und 3´-Enden fehlen (Abb. 7.1-7.4).

```
  1 - AGTATGATGCTATCATTAATGTTCTGGCAATTTGCAAACCAGATTACTTCCATAAACGAC
       S  M  M  L  S  L  M  F  W  Q  F  A  N  Q  I  T  S  I  N  D  -  20
 61 - GCGAAAAAGTTTTATTCACTATTCGGGTTTGTCGGACAAATAGGCTTGTTTTCAGCAGGG
       A  K  K  F  Y  S  L  F  G  F  V  G  Q  I  G  L  F  S  A  G  -  40
121 - TCATTTATGATGCTGTTTACTAAAACTGGTACAACTTGGCAAACTTCATTACATTATATA
       S  F  M  M  L  F  T  K  T  G  T  T  W  Q  T  S  L  H  Y  I  -  60
181 - ACTTCTTCTATATTATTATCAGGAATATTACTTAGCATTGCATTATTTGTTTTAGGTAAT
       T  S  S  I  L  L  S  G  I  L  L  S  I  A  L  F  V  L  G  N  -  80
241 - TACCTTGTCGGTAATGATACAATAAACGGAACCCAAACTAAATCCAAAAAGAAAAAGCCG
       Y  L  V  G  N  D  T  I  N  G  T  Q  T  K  S  K  K  K  K  P  - 100
301 - GGTTTAGTTGAAAGTTTAAAATATGTTTTCTCTTCTAAATATATAGGATTAATTGCTCTT
```

```
       G  L  V  E  S  L  K  Y  V  F  S  S  K  Y  I  G  L  I  A  L  - 120
361 - CTTGTTATATGCTATGGTATTTCAATTAATCTGGTGGAAGGAGTATGGAAAAAGCTTATT
       L  V  I  C  Y  G  I  S  I  N  L  V  E  G  V  W  K  K  L  I  - 140
421 - CAAATAGTTTATCCAGATCCGAAAGATATTAGTAATTTCGGCGGGAAAGTACAAATGTAC
       Q  I  V  Y  P  D  P  K  D  I  S  N  F  G  G  K  V  Q  M  Y  - 160
481 - ACTGCACTTGCTACATTTACTGCAATGCTGGCGAGCTCTTTTGTGCTTCGTATTTTTAGC
       T  A  L  A  T  F  T  A  M  L  A  S  S  F  V  L  R  I  F  S  - 180
541 - TGGAGAACGGCTGCTATAATAACTCCTATCATTATTTTAATTACAGGAGTACCGTTTTTC
       W  R  T  A  A  I  I  T  P  I  I  I  L  I  T  G  V  P  F  F  - 200
601 - ATATTTGTAAGTTATAAAGGATGGTTTGCAAATACATTGGATGTGACAAGTGCAACTATA
       I  F  V  S  Y  K  G  W  F  A  N  T  L  D  V  T  S  A  T  I  - 220
661 - CTATTCTTCGCAGTTATATTCGGCGCTACACAAAACGTTTTAAGTAAAGCTATAAAGTAT
       L  F  F  A  V  I  F  G  A  T  Q  N  V  L  S  K  A  I  K  Y  - 240
721 - TCTCTCTCTGACCCGACCACAGAG
       S  L  S  D  P  T  T  E                                       - 248
```

Abb. 7.1: Teilsequenz der genomischen NPTC36-DNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben.

```
  1 - AGCGTTGTCATTTCATTACTGTTCTGGCAGTTTGCAAACGAAATCACTCGCGTTGGTGAA
       S  V  V  I  S  L  L  F  W  Q  F  A  N  E  I  T  R  V  G  E  -  20
 61 - GCAAAGCGTTTCTACGGTATGTTTGGTTTAATCGGTAACTTCGGATTGATGTTATCTGGT
       A  K  R  F  Y  G  M  F  G  L  I  G  N  F  G  L  M  L  S  G  -  40
121 - TACACAGTTTATTACTTCTCCAGCATTCGTGACAGCGTTCCAGAAGGTGTTGACCCATGG
       Y  T  V  Y  Y  F  S  S  I  R  D  S  V  P  E  G  V  D  P  W  -  60
181 - GGTATGACATTGAACTATCTGATGACATTTGTTGTGATCTCTGGTATTTGCGTTGTGGCA
       G  M  T  L  N  Y  L  M  T  F  V  V  I  S  G  I  C  V  V  A  -  80
241 - ATTTACAGTTGGATGAACAAAGCCGTTCTCACAGATAAGCGCTTCTATGATAGTGAAGAG
       I  Y  S  W  M  N  K  A  V  L  T  D  K  R  F  Y  D  S  E  E  - 100
301 - GGAGCGGTGGAGAAGAAAAAAGATAAACCAAAATAATCTTTGGCTGAAAGCTTTAAATAT
       G  A  V  E  K  K  K  D  K  P  K  L  S  L  A  E  S  F  K  Y  - 120
361 - TTGTTACAATCGCCTTATCTTGGTTTAATCGCGACGATTGTTTTGGCCTATGGTGTCTCC
       L  L  Q  S  P  Y  L  G  L  I  A  T  I  V  L  A  Y  G  V  S  - 140
421 - ATCAACTTGGTTGAAGGTGTCTGGAAGGGGCAAATTAAGATTCGCTTCCCCAATCCAAAT
       I  N  L  V  E  G  V  W  K  G  Q  I  K  I  R  F  P  N  P  N  - 160
481 - GACTATAACGCGTTCATGGGACAATTTTCCTTCATCACTGGTGTTGTTACCGTTATTTTG
       D  Y  N  A  F  M  G  Q  F  S  F  I  T  G  V  V  T  V  I  L  - 180
541 - ATGATTGTCGGGAACAATATTTTGCGTCGCTTAAGCTGGGTTGCAGCAGCCCTGATCACT
       M  I  V  G  N  N  I  L  R  R  L  S  W  V  A  A  A  L  I  T  - 200
601 - CCAGTTATGATTTTGATCACAAGCTTGATCTTCTTCGGTGTGATTATGTACGGCAACAGT
       P  V  M  I  L  I  T  S  L  I  F  F  G  V  I  M  Y  G  N  S  - 220
661 - GTGAATGATCCTCTTTATCCAATAATGGGTACTACGATGGTGATGATTGCAGTGTTGGCT
       V  N  D  P  L  Y  P  I  M  G  T  T  M  V  M  I  A  V  L  A  - 240
721 - GGTTTGGCGCAAAATGTTTTGACAAAGTCAACAAAGTACTCTCTGTTCGATCCAACAAAA
       G  L  A  Q  N  V  L  T  K  S  T  K  Y  S  L  F  D  P  T  K  - 260
781 - GAA
       E                                                             - 261
```

Abb. 7.2: Teilsequenz der genomischen NPTET39-DNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben.

```
  1 - TCTGTCATGATTTCGCTTCTGTTCTGGCAATTTGCTAACGATATTACGCGAACTGAAGAA
       S  V  M  I  S  L  L  F  W  Q  F  A  N  D  I  T  R  T  E  E  -  20
 61 - GCAAAGCGCTTTTATGCAATGTTCGGTTTAATTGCAAACGTTGCTCTCATCTTTTCAGGA
       A  K  R  F  Y  A  M  F  G  L  I  A  N  V  A  L  I  F  S  G  -  40
121 - ACAACTGTTGAATACTTCTCAGAAATTAAAGATAAACTCCCTCCTGAAATTGATGCTTGG
       T  T  V  E  Y  F  S  E  I  K  D  K  L  P  P  E  I  D  A  W  -  60
```

```
181 - GGATATTCTTTGAATTACATGATGGGCGCTGTTGTCCTTTGCGGTGTTGCAGCGATTGCG
       G  Y  S  L  N  Y  M  M  G  A  V  V  L  C  G  V  A  A  I  A  -  80
241 - CTTTATTGGTGGGTTACAGAGTATGTTCTTACAGATCCTCGTTTCTACGATGCATCTGCA
       L  Y  W  W  V  T  E  Y  V  L  T  D  P  R  F  Y  D  A  S  A  - 100
301 - CCAAAAAATAAAAAAGAGAAGAAGGACAAGCCAAAATTAAGTGTTGGCGAGAGCTTTAAG
       P  K  N  K  K  E  K  K  D  K  P  K  L  S  V  G  E  S  F  K  - 120
361 - TTGATCTTTAGTTCTCCTTACATTGGTTACATTGCAATTCTCGTATTAGCCTATGGTGTA
       L  I  F  S  S  P  Y  I  G  Y  I  A  I  L  V  L  A  Y  G  V  - 140
421 - TCTATCAACCTTATTGAAGTTGTATGGAAAGACCAATTGAAGCAAGCTTTCCCAAATCCT
       S  I  N  L  I  E  V  V  W  K  D  Q  L  K  Q  A  F  P  N  P  - 160
481 - AATGATTATGGTGCTTTCATGGGTAAATTCTCTCGTGCAACAGGTATCGTAACCATGCTT
       N  D  Y  G  A  F  M  G  K  F  S  R  A  T  G  I  V  T  M  L  - 180
541 - CTGATCTGGTTCACAAAAGGTATCGTACGTAAGTTTGGTTGGTTCACGGGTGCGATCGTA
       L  I  W  F  T  K  G  I  V  R  K  F  G  W  F  T  G  A  I  V  - 200
601 - ACACCTGCTGTTTTGATTATTACAGGCGCGCTATTCTTTGCATTCGTGCTTTTCAAAGAC
       T  P  A  V  L  I  I  T  G  A  L  F  F  A  F  V  L  F  K  D  - 220
661 - GAGCTCACACCGCTTGTGGCAGGTTTTGGTCTCACTGCAACCTTAATGGCAACCTATATT
       E  L  T  P  L  V  A  G  F  G  L  T  A  T  L  M  A  T  Y  I  - 240
721 - GGAGCGATTCAAAATATCCTCAGTAAAGGTACAAAGTACTCAAACTTTGACCCCACAAAA
       G  A  I  Q  N  I  L  S  K  G  T  K  Y  S  N  F  D  P  T  K  - 260
781 - GAG
       E                                                            - 261
```

Abb. 7.3: Teilsequenz der genomischen NPTHN3-DNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben.

```
  1 - CGTGTAACTGAAGCGAAGCGTTTTTACTCTCTACTTGGCCTTGGAGCAAACGTTGCTTTA
       R  V  T  E  A  K  R  F  Y  S  L  L  G  L  G  A  N  V  A  L  -  20
 61 - CTTGTTTCTGGCCCTACGATTGTCTATTTTTCTAACATCCAGAGCCGCATTCCCGCTGGT
       L  V  S  G  P  T  I  V  Y  F  S  N  I  Q  S  R  I  P  A  G  -  40
121 - GTAGATCCATGGCAAGTTTCTCTTAACTATCTAATGACTTTTGTTGTTTTAGCTGGTGTA
       V  D  P  W  Q  V  S  L  N  Y  L  M  T  F  V  V  L  A  G  V  -  60
181 - TCGGTGCTTGCTATTTACTATTGGATGAATAGAAACGTTTTGACAGATCCACGCTTCTAC
       S  V  L  A  I  Y  Y  W  M  N  R  N  V  L  T  D  P  R  F  Y  -  80
241 - AACCCAGAAGAAGAAAAGAAAGGAAAAAAATCTAAACCTAAAATGGGTATTTTAGAAAGT
       N  P  E  E  E  K  K  G  K  K  S  K  P  K  M  G  I  L  E  S  - 100
301 - TTTGCTTTCCTAGCTAAATCCAAGTACATCCTCTGCATTGCTTTGCTTGTCATTTCTTAT
       F  A  F  L  A  K  S  K  Y  I  L  C  I  A  L  L  V  I  S  Y  - 120
361 - GGTATTTGCATTAATTTAGTTGAAGTAACTTGGAAAGGACAACTTAAGCTACAATACAAA
       G  I  C  I  N  L  V  E  V  T  W  K  G  Q  L  K  L  Q  Y  K  - 140
421 - AATCCTAATGATTACAATGCTTTTATGGGCATGTTTTCTACCATCACAGGATTGGTGACA
       N  P  N  D  Y  N  A  F  M  G  M  F  S  T  I  T  G  L  V  T  - 160
481 - ATTATAATGATGTTCTTAGGCGGTTGGATTACCCGCAAAAAAGGCTGGGGCTTTGCCGCT
       I  I  M  M  F  L  G  G  W  I  T  R  K  K  G  W  G  F  A  A  - 180
541 - ATGGCAACACCTATTGTTTTATTAATAACAGGGATCGGTTTCTTTTCTTTTGTTATATTT
       M  A  T  P  I  V  L  L  I  T  G  I  G  F  F  S  F  V  I  F  - 200
601 - AAGGACCACCTTGCCGGCTTCATTAGCTACTTTGGCACTACTCCACTCATGCTAGCAGTA
       K  D  H  L  A  G  F  I  S  Y  F  G  T  T  P  L  M  L  A  V  - 220
661 - ATCTTTGGCATGATACAAAATATTATGAGTAAATCGACGAAATACTCTTTATTTGATCCT
       I  F  G  M  I  Q  N  I  M  S  K  S  T  K  Y  S  L  F  D  P  - 240
721 - ACCAAGGAG
       T  K  E                                                      - 243
```

Abb. 7.4: Teilsequenz der genomischen NPTTUME1-DNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben.

7.1.2 DNA-Sequenzanalyse von NPTCc

In dem Genom des intrazellulären Eubakteriums Caedibacter caryophila konnte ein DNA-Abschnitt identifiziert werden, der eine Länge von 723 bp besitzt. Eine Sequenzanalyse dieser genomischen DNA-Teilsequenz ergab, dass die abgeleitete Proteinsequenz bestehend aus 241 Aminosäuren zu denen der bisher identifizierten nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern außerordentlich ähnlich ist. Aufgrund der unvollständigen Proteinsequenz ist der N- bzw. C-Terminus vom NPTCc-Protein noch unbekannt (Abb. 7.5).

```
  1 - AAAACAAGTGAAGCAAAAAGATTTTACTCAATGTTTGGGTTGCTCGGTAATTTTTCCTTG
       K  T  S  E  A  K  R  F  Y  S  M  F  G  L  L  G  N  F  S  L  -  20
 61 - CCTTTAGTTGCTGCTACTCTTGGTTATCTGCTTAGCTCAGAGATCAATATAGTTGCAGAG
       P  L  V  A  A  T  L  G  Y  L  L  S  S  E  I  N  I  V  A  E  -  40
121 - GAACATCGTTTTATTCCTGTAATATGTATTGTGATTTTTAGTAACATCCTTGTTATGTTT
       E  H  R  F  I  P  V  I  C  I  V  I  F  S  N  I  L  V  M  F  -  60
181 - TTCTATTTCTGGATGAATAAAAATGTACTTACCGATCCGCGCCTTTATGATTCAGGAGAA
       F  Y  F  W  M  N  K  N  V  L  T  D  P  R  L  Y  D  S  G  E  -  80
241 - GCGGCTGGTAAACCTAAGAAGAAAAAAAACAAAGTTATCACTAGGTGAAAGCTTTAAAATG
       A  A  G  K  P  K  K  K  K  T  K  L  S  L  G  E  S  F  K  M  - 100
301 - ATATTTACTTCAAAATATCTAGGGCTTCTTGTAACTTTAATCCTAGCTTATGGTATATCT
       I  F  T  S  K  Y  L  G  L  L  V  T  L  I  L  A  Y  G  I  S  - 120
361 - ATCAATTTAGTTGAAGGCGTGTGGAAAGCTAAACTTAGAGAATTATACCCTACAAAAGAA
       I  N  L  V  E  G  V  W  K  A  K  L  R  E  L  Y  P  T  K  E  - 140
421 - GCATATACCATGTTTATGGGTAATTTCCAAGCATACCAAGTTGTTGCAGCTATTATCTTT
       A  Y  T  M  F  M  G  N  F  Q  A  Y  Q  G  V  A  A  I  I  F  - 160
481 - ATGCTTGTAGGTAGTAACATTTTAAGGAGGGTATCTTGGGCAACAGCGGCTATATTTACT
       M  L  V  G  S  N  I  L  R  R  V  S  W  A  T  A  A  I  F  T  - 180
541 - CCTCTAATGATCCTTGTTACCGGAATTGGTTTTTTCTCTTTTATTATATTTGATCAAACC
       P  L  M  I  L  V  T  G  I  G  F  F  S  F  I  I  F  D  Q  T  - 200
601 - ATAGGCTAATATTTTGCAGCCTTTTTTGGTACAGGTCCTCTAGCTCTTGCCGTGATTATT
       I  G  L  Y  F  A  A  F  F  G  T  G  P  L  A  L  A  V  I  I  - 220
661 - GGCACAGCACAGAATGTGCTTAGTAAGGCAACAAAATARTCATTATTTGATTCGACAAAA
       G  T  A  Q  N  V  L  S  K  A  T  K  Y  S  L  F  D  S  T  K  - 240
721 - GAA
       E                                                           - 241
```

Abb. 7.5: Teilsequenz der genomischen NPTCc-DNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben.

7.1.3 DNA-Sequenzanalyse von NPTHo

Die im Zuge der Genomsequenzierung identifzierte DNA-Sequenz des Eubakteriums Holospora obstusa besitzt eine Länge von 2180 bp (Abb. 7.6). Das längste offene Leseraster von Nukleotidposition 556 bis 2097 bp kodiert für ein Protein, das aus 514 Aminosäuren besteht und ein apparentes Molekulargewicht von 56,5 kDa besitzt. Die ATG-Sequenz an der Nukleotidposition 556-558 bp sowie die TAA-Sequenz an der Nukleotidposition 2098-2100 bp wird als Start- bzw. Stoppkodon für die Proteintranslation angenommen. Diese genomische NPTHo-DNA stellt die vollständige Aminosäuresequenz für einen putativen nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter dar (NPTHo; Nukleotid-Transportprotein aus Holospora obstusa).

```
   1 - GCTCGCCCGGGCAGATATCTAAATCACCTACCAGAACTATAAGAACACAATCTAATCATC

  61 - TATTTGCATCACTCATTGCATACTGCAAATTAGAATTATTGAAAGTGAAAACCTCATTGA

 121 - ATCATTTTGCAATAAAACAAAAACTATTGTTAAAAGCCAATGTTTTAATGTTCAATGAAC

 181 - TTCAAATTTTGAAAGGTGCTAAAATGACTTAAATATCCTAATCACATCTATCTTTATAGA

 241 - TCCAACAAATAAAAAATCACTCTCAATCGCTTTATGATGATCCTGCGATACCAACTAATC

 301 - AAAACCAATTCTACTGCTTTGATGCTCTGACTCCAAGCATCATTTTTTCAAGATCATGCC

 361 - CCTAACAACGCGGTCTTGAAACAGTACCGAGCATTAATTTTTTCAATCATAGGTCTGAGA

 421 - TTGATGATTGGTTAACATCTTATCGTTTGTTTCTGAAAATTCAGCACAATGCTATAGAAT

 481 - TTTCGATGTTGTAATGCTATGATCGAATAGAAAATGATGTAGAGCATCAGTGCTTTACAA

 541 - AAAAATTGAGGCATTATGTCAAACTTGTCAACATCACGAATGAGCAAATGGAGAGAGCGG
                     M  S  N  L  S  T  S  R  M  S  K  W  R  E  R -  16
 601 - TTGTGGCCGGTCTACCCAGAAGAAATGAGTATTTTCCTCCCCATGGTTGTTATTATGTTT
       L  W  P  V  Y  P  E  E  M  S  I  F  L  P  M  V  V  I  M  F -  36
 661 - TCTATTTTATTTAATTATACTGTGGCTCGTAACGTTAAAGATTCTTTGCTTGTGAATTCT
       S  I  L  F  N  Y  T  V  A  R  N  V  K  D  S  L  L  V  N  S -  56
 721 - CCTGGTTCCAGTGGAAAAGTTTTGCCATGGGTGAAGCTTGGGTTAGTTACTCCGTGTTCA
       P  G  S  S  G  K  V  L  P  W  V  K  L  G  L  V  T  P  C  S -  76
 781 - ATTTTTGCGGTTATTGGGTACGCAAAGCTGAGTAATCTTTTAAGTAAACAAAGGCTTTAT
       I  F  A  V  I  G  Y  A  K  L  S  N  L  L  S  K  Q  R  L  Y -  96
 841 - TTTGCTACATTACTTCCGTTTGCGGTGTATTTTTTGTTGTTTGGGTTTATCCTATATCCG
       F  A  T  L  L  P  F  A  V  Y  F  L  L  F  G  F  I  L  Y  P - 116
 901 - ATGCGAGAATATTTTAACCTCTCAGTTGATTGGATCAAAGAATGTCAGTCAATTTACCCC
       M  R  E  Y  F  N  L  S  V  D  W  I  K  E  C  Q  S  I  Y  P - 136
 961 - TTGTTAAAAGATTTTTTTCCTGCTGTAGCGTATTGGAACTATTCGTTGTTTTATATGATG
       L  L  K  D  F  F  P  A  V  A  Y  W  N  Y  S  L  F  Y  M  M - 156
1021 - GCAGAGCTTTGGGGAAATATGGGGATCGCATTACTTTTTTGGCAGTTTGCAAATCAAATT
       A  E  L  W  G  N  M  G  I  A  L  L  F  W  Q  F  A  N  Q  I - 176
1081 - ACTCCAACAACTCAAGCAAAACGTTTTTATCCTGTTTACGGGTTCTGGTCTAATTTGGGA
       T  P  T  T  Q  A  K  R  F  Y  P  V  Y  G  F  W  S  N  L  G - 196
1141 - TTGGTTGCTGCAGGTTCCTTAACAGCGTTCAGTGAGAATTTCTTAAAGCCCGAACGTCTT
       L  V  A  A  G  S  L  T  A  F  S  E  N  F  L  K  P  E  R  L - 216
1201 - GCTTCCGGAGAAAAAGATTTTGGTCCGCAGCTTCGTTTATATTGTTCGTGCATGGTCGTT
       A  S  G  E  K  D  F  G  P  Q  L  R  L  Y  C  S  C  M  V  V - 236
1261 - GCTTGTATCGCTATAGTTGTTTCTTACTGGTGGCTAAACGCAAAGGTATTAACGGATGCA
       A  C  I  A  I  V  V  S  Y  W  W  L  N  A  K  V  L  T  D  A - 256
1321 - CAAAAAGGGACAGATGCAAAGGGAAGAAAATCTAAACCGAAACTAACGTTGAAAGAAAGT
       Q  K  G  T  D  A  K  G  R  K  S  K  P  K  L  T  L  K  E  S - 276
1381 - GCGGTATATTTATTGAAATCTCGTTATCTTATGTATATTGCGATTTTGATGTTAGCATAC
       A  V  Y  L  L  K  S  R  Y  L  M  Y  I  A  I  L  M  L  A  Y - 296
1441 - GGAATTACTATTAATATTGTGGAAGTAACGTGGAAAGACAGTGTAGGACATTATTTTTCA
       G  I  T  I  N  I  V  E  V  T  W  K  D  S  V  G  H  Y  F  S - 316
1501 - GATCCTGTGACTGGACTAAGAGATATGAATGCCTATAACGCATTTATGGGAAAAATGTTT
       D  P  V  T  G  L  R  D  M  N  A  Y  N  A  F  M  G  K  M  F - 336
1561 - ATTGGAACTGGAATTACCACAATGGTTTTTATTTTGTTTAGTAAAAATTTTGTACAATCG
       I  G  T  G  I  T  T  M  V  F  I  L  F  S  K  N  F  V  Q  S - 356
1621 - TTAGGATGGCGTTTTTCAGCGAATATTACTCCATTTGTCACTATGATTACTGGAGTTGGG
       L  G  W  R  F  S  A  N  I  T  P  F  V  T  M  I  T  G  V  G - 376
1681 - TTTTTTCTTTTTGTGGTATTCAAAGATTATCTTGGTGGATTGTGTGAACTTTTTGGTACA
       F  F  L  F  V  V  F  K  D  Y  L  G  G  L  C  E  L  F  G  T - 396
1741 - TCAACACTTTCTGTCGCGGTAGGATTAGGTCTGGTACAAAATGTTTTAACTAAAGGAGTG
       S  T  L  S  V  A  V  G  L  G  L  V  Q  N  V  L  T  K  G  V - 416
1801 - AAATATGCACTTTTTGATCCGACAAAAGAAATGGCTTATATTCCGTTAGATGAAGAAGAA
       K  Y  A  L  F  D  P  T  K  E  M  A  Y  I  P  L  D  E  E  E - 436
1861 - AAAGTAAAAGGAAAAGCAGCTATAGATGTGATTGGTGGTCGCGCTGGTAAATCTGGAGGC
       K  V  K  G  K  A  A  I  D  V  I  G  G  R  A  G  K  S  G  G - 456
1921 - AGTGTGCTTCAACTTATTTGCAACGCTGCAACTGGAGGATTGGGTATTCCTCAGCTTTCC
       S  V  L  Q  L  I  C  N  A  A  T  G  G  L  G  I  P  Q  L  S - 476
1981 - GTTCCTTTGCTTGGTGGGCTTTTAGTATCCATTACATGTTGGTGGATTTGGGCAGTGAAC
       V  P  L  L  G  G  L  L  V  S  I  T  C  W  W  I  W  A  V  N - 496
```

```
2041 – AAACTAGCTATTGCTTATGCAAAGAAAGTTTTAGAAACTGAGCAAGTTAAAGAAATTTAA
        K  L  A  I  A  Y  A  K  K  V  L  E  T  E  Q  V  K  E  I  *  – 514
2101 – AAAACAATAGGTTCGGACATCGAAAAAAGAATAGTTAAATTTTTTTGACTGTTCTTTTTG

2161 – TGTGATTTTGAAGTGAGTGA – 2180
```

Abb. 7.6: Vollständige Sequenz der genomischen NPTHo-DNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben. Das Start- und Stoppkodon der Translation sind fett gedruckt und unterstrichen.

7.1.4 DNA-Sequenzanalyse von NPTPbtb

Die zu den nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern homologe DNA-Sequenz aus dem phytopathogenen Endoparasiten der Papaya-Früchte Pbtb (papaya bunchy top bacterium) ist 759 bp lang und kodiert für ein Protein mit 253 Aminosäuren. Dieser Genom-Abschnitt enthält nur eine Teilsequenz des vollständigen kodierenden Bereiches. So fehlen die Nukleotidsequenzen für das 5´- und 3´-Ende (Abb. 7.7).

```
  1 – ACATTAATGCTAAGCTTATTATTTTGGCAATTTGCTAACCAAATTACTAAAACTGATGAA
       T  L  M  L  S  L  L  F  W  Q  F  A  N  Q  I  T  K  T  D  E  –  20
 61 – GCTAAACGTTTTTATTCGATGTTTGGATTGCTTGCTAATTTAGCATTGCCTGTAACTTCC
       A  K  R  F  Y  S  M  F  G  L  L  A  N  L  A  L  P  V  T  S  –  40
121 – ATTATTATAGGTTATTTCTTACATGAAAAAACCCAAATAGTAGCAGAGCATTTAAAGTTT
       I  I  I  G  Y  F  L  H  E  K  T  Q  I  V  A  E  H  L  K  F  –  60
181 – ACCCCATTATTTGTTATTATGATAATAAGCAGTTTGGCTGTAATACTTACGTATAGATGG
       T  P  L  F  V  I  M  I  I  S  S  L  A  V  I  L  T  Y  R  W  –  80
241 – ATGAATAAAAATGTATTAACAGATCCTAAACTTTATGACCCTACTCTTGTAAAAGGGAAA
       M  N  K  N  V  L  T  D  P  K  L  Y  D  P  T  L  V  K  G  K  – 100
301 – AAGGCTAAAGCTAAGATGTCGTTAATAGAGAGCTTTAAGATGATCTTTACTTCTAAATAT
       K  A  K  A  K  M  S  L  I  E  S  F  K  M  I  F  T  S  K  Y  – 120
361 – GTAGGTTATATTGCATTACTACTTATTGCTTATGGAGTTTCTGTAAATTTAGTTGAAGGT
       V  G  Y  I  A  L  L  L  I  A  Y  G  V  S  V  N  L  V  E  G  – 140
421 – GTTTGGAAATCAAAATTAAAAGAATTACATCCAACAAAAGAAGCATATACTATGTATATG
       V  W  K  S  K  L  K  E  L  H  P  T  K  E  A  Y  T  M  Y  M  – 160
481 – GGACAGTTTCAAGCTTATCAAGGTTGGGTTGCTATAGCTTTTATGATTATAGGAAGTAAT
       G  Q  F  Q  A  Y  Q  G  W  V  A  I  A  F  M  I  I  G  S  N  – 180
541 – ATTTTAAGGAAAGTATCTTGGTTAACTGCTGCGATGATTACGCCTTTAATGATGTTAATT
       I  L  R  K  V  S  W  L  T  A  A  M  I  T  P  L  M  M  L  I  – 200
601 – ACTGGTATTGCGTTTTTTGCATTTATCTTTTTTGATAGTGTAATTGCTATGCATTTAACA
       T  G  I  A  F  F  A  F  I  F  F  D  S  V  I  A  M  H  L  T  – 220
661 – GGCATTTTAGCATCAGGTCCTTTAGCACTTGCGGTTATGATCGGTACAATTCAAAATGTT
       G  I  L  A  S  G  P  L  A  L  A  V  M  I  G  T  I  Q  N  V  – 240
721 – TTAAGTAAAGGTGTGAAATATTCTTTATTTGATGCTACT
       L  S  K  G  V  K  Y  S  L  F  D  A  T                       – 253
```

Abb. 7.7: Teilsequenz der genomischen NPTPbtb-DNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben.

7.2 DNA-Sequenzanalyse homologer Transportproteine aus Eukaryoten

Die in dieser Doktorarbeit identifizierten, eukaryotischen Transportproteine weisen alle eine signifikante Sequenzähnlichkeit mit den bisher bekannten nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern auf. Bei diesen DNA-Sequenzen handelt sich meist um homologen Teilsequenzen. Aufgrund der unvollständigen Sequenzinformation ist bei diesen Transportproteinen der N- bzw. C-Terminus noch unbekannt.

Tab. 7.2: Die in dieser Arbeit identifizierten, homologen Transporter aus Eukaryoten

Name	Organismus	Nukleotidsequenz	ORF	Kapitel
AATPCr	Chlamydomonas reinhardtii	1700 bp		7.2.1
AATPCp	Cyanophora paradoxa	789 bp	263 aa	7.2.2
AATPDs	Dunadiella salina	1219 bp	200 aa	7.2.3
AATPHv	Hordeum vulgare (Gerste)	597 bp	199 aa	7.2.4
AATPLj *	Lotus japonicus (Hornklee)	462 bp	154 aa	7.2.5
AATPLe *	Lycopersicon esculentum (Tomate)	710 bp	236 aa	7.2.6
AATPMt *	Medicago truncatula (Hopfenklee)	655 bp	202 aa	7.2.7
AATPMp *	Mentha piperita (Pfefferminze)	600 bp	220 aa	7.2.8
AATPMc	Mesembryanthemum crystallinum	1108 bp	253 aa	7.2.9
AATPOs	Odontella sinensis	1591 bp	470 aa	7.2.10
AATPOsa	Oryza sativa (Reis)	462 bp	154 aa	7.2.11
AATPPy	Porphyra yezoensis	660 bp	220 aa	7.2.12
AATPSh	Soja hispida (Sojabohne)	996 bp	321 aa	7.2.13
AATPSb	Sorghum bicolor (Mohrenhirse)	996 bp	310 aa	7.3.14
AATPTa	Triticum aestivum (Weizen)	1423 bp	373 aa	7.2.15

* Innerhalb der EST-Projekte einiger Organsimen wurden mehrere cDNA-Sequenzen identifiziert, die für putative nicht-mitochondriale Nukleotid-Transporter kodieren. Die Angaben der Nukleotidsequenz und des offenen Leserasters in dieser Tabelle entsprechen dem EST-Klon mit dem längsten offenen Leserasters.

7.2.1 DNA-Sequenzanalyse von AATPCr

Der aus einer Chlamydomonas-cDNA-Bank isolierte cDNA-Klon besitzt eine Länge von 1,7 kb (AATPCr; ATP/ADP-Transportprotein aus Chlamydomonas reinhardtii). Die aus der Nukleotidsequenz abgeleitete Proteinsequenz besteht aus 478 Aminosäuren und ist im Vergleich zu den plastidären ATP/ADP-Transportern höherer Pflanzen um das 5´-terminale Ende verkürzt. Aufgrund des fehlenden N-Terminus kann kein Start-

Methionin für die Translation zugeordnet werden. Das Basentriplett TAG an Position 1435 - 1437 wird als Stoppkodon angenommen (Abb. 7.8).

```
   1 - TGCATTCTGTTCAACTACACCATTCTGCGTGACACCAAGGACGTGCTGGTGGTGACTGCC
        C  I  L  F  N  Y  T  I  L  R  D  T  K  D  V  L  V  V  T  A  -  20
  61 - CCCGGCTCGGGCGCTGAGATCATTCCCTTCCTGAAGACCTGGGTCAACCTGCCCATGGCT
        P  G  S  G  A  E  I  I  P  F  L  K  T  W  V  N  L  P  M  A  -  40
 121 - ATCGGCTTCACCATCATGTACTCGGCGCTGTCGAACCGCCTGTCCAGCGAGGCTCTGTTc
        I  G  F  T  I  M  Y  S  A  L  S  N  R  L  S  S  E  A  L  F  -  60
 181 - TACACTTGCATCATCCCCTTCATTGCCTTCTTCGGTGCCTTCGCCGCGCTCATGTACCCC
        Y  T  C  I  I  P  F  I  A  F  F  G  A  F  A  A  L  M  Y  P   - 80
 241 - ATGCGCGATGCTCTGCACCCCACTGAGTTCTGCCAGAACCTGCTGGAGCAGATGGGCCCT
        M  R  D  A  L  H  P  T  E  F  C  Q  N  L  L  E  Q  M  G  P  - 100
 301 - CGCTTCGCCGGCCCCATTGCCATTCTGCGCAACTGGACCTTCTGCCTGTTCTACGTGATG
        R  F  A  G  P  I  A  I  L  R  N  W  T  F  C  L  F  Y  V  M  - 120
 361 - GCCGAGCTGTGGGGCTCCGTCGTCGTGTCCGTGCTGTTCTGGGGCTTTGCCAACCAGATC
        A  E  L  W  G  S  V  V  V  S  V  L  F  W  G  F  A  N  Q  I  - 140
 421 - ACCACCGTGGAGGAGGCCTCGCAGTTCTACCCCCTGTTCGGTCTGGGCGCCAACGTTGCC
        T  T  V  E  E  A  S  Q  F  Y  P  L  F  G  L  G  A  N  V  A  - 160
 481 - CTGATCTTCTCGGGCCAGGCCGTGAAGTACTTCTCGCAGGTCCGCGCCGGTCTGCCCCCG
        L  I  F  S  G  Q  A  V  K  Y  F  S  Q  V  R  A  G  L  P  P  - 180
 541 - GATGTTGATGGCTGGGGTGTGTCCCTGAACGGCCTGATGGGCATGGTCGTCATCGGCGGC
        D  V  D  G  W  G  V  S  L  N  G  L  M  G  M  V  V  I  G  G  - 200
 601 - CTGCTCATTATCGGTATCTACTTCTCGCTGCAGCGCCTGGTGGTGCCCAAGCTGAAGTCG
        L  L  I  I  G  I  Y  F  S  L  Q  R  L  V  V  P  K  L  K  S  - 220
 661 - CTGCGCGAGGGCAAGAAGAAGAAGAACAAGACCAAGATGAGCGTGGGCGAGTCCTTCGCC
        L  R  E  G  K  K  K  K  N  K  T  K  M  S  V  G  E  S  F  A  - 240
 721 - TTCCTGGCCCAGTCGAGCTACATCCGCGACATGGCCACCCTGGTGGTCGCCTACGGTATC
        F  L  A  Q  S  S  Y  I  R  D  M  A  T  L  V  V  A  Y  G  I  - 260
 781 - TCGATCAACCTGGTCGAGGTGACCTGGAAGGGCAAGCTCAAGGCCCAGTTCCCCAACCCC
        S  I  N  L  V  E  V  T  W  K  G  K  L  K  A  Q  F  P  N  P  - 280
 841 - AACGACTACTCGTCGTTCATGGGCGAGTTCTCCACCGCCACCGGTACCGTGACCTTCACC
        N  D  Y  S  S  F  M  G  E  F  S  T  A  T  G  T  V  T  F  T  - 300
 901 - ATGATGATCCTGTCCCGCTGGATCTTCAAGCAGTTCGGCTGGGGTGTGGCTGCCCTGATC
        M  M  I  L  S  R  W  I  F  K  Q  F  G  W  G  V  A  A  L  I  - 320
 961 - ACCCCCATCATGCTGCTGATCACCGGTCTGCTGTTCTTCACCCTGGTGCTGGCCGGCGAC
        T  P  I  M  L  L  I  T  G  L  L  F  F  T  L  V  L  A  G  D  - 340
1021 - ACCGTCAAGCCCGCTCTGGCCGCCTGGGGCATGACCCCCCTGTACGCCGCCGTGCTGGTC
        T  V  K  P  A  L  A  A  W  G  M  T  P  L  Y  A  A  V  L  V  - 360
1081 - GGCGCCGCCCAGAACGTCTTCTCCAAGTCGTCCAAGTACTCCCTGTTCGACCCCTGCAAG
        G  A  A  Q  N  V  F  S  K  S  S  K  Y  S  L  F  D  P  C  K  - 380
1141 - GAGATGGCCTACATCCCCCTGGAGGACGAGGTCAAGACCAAGGGCAAGGCCGCCATTGAC
        E  M  A  Y  I  P  L  E  D  E  V  K  T  K  G  K  A  A  I  D  - 400
1201 - GTGATCTGCAACCCGCTGGGCAAGTCCGGCGGTGCCCTGATCCAGCAGTTCATGATCATC
        V  I  C  N  P  L  G  K  S  G  G  A  L  I  Q  Q  F  M  I  I  - 420
1261 - GGCCTGGGCTCGCTGGCCGCCTCGACCCCGTACCTGGGCGCCATCCTGTGCGTCATCATC
        G  L  G  S  L  A  A  S  T  P  Y  L  G  A  I  L  C  V  I  I  - 440
1321 - GTGGCCTGGATCAACGCCGCCGCCTCGCTGAACAAGCAGTTCACGGCGCTGCAGGAGGAG
        V  A  W  I  N  A  A  A  S  L  N  K  Q  F  T  A  L  Q  E  E  - 460
1381 - ACCGGCATGTACATCACCGGCGAGAAGCCCGCCAACAAGTCCGAGAAGAAGGACTAAAGG
        T  G  M  Y  I  I  G  E  K  P  A  N  K  S  E  K  K  D  *     - 478
1441 - GAGAGATCAGCGGCCTCGGCGGAGCTGGTGAAGATTGGCCATTGACGCATTCAGTTGGTG

1501 - CTGGAGACTCATGACGAAGACACGGACTCAGGAGGACTGGTGGGCGCACTGCGGTCGGCA

1561 - CCCGGCGACGGCCTGTCTTGAGGAGTCGAGGGCGCGCGATGGAGCAGCTGCAGCAGCGGG

1621 - ACGTAGTAGGGCACGTGCATGCGCGACGCCGCGTGCGCGGTTTTAAGCTCTTGACTTGCG

1681 - AGGGAGGGTGTGCTCTTGTTTTCCATGGC
```

Abb. 7.8: Teilsequenz der AATPCr-cDNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben. Das Stoppkodon der Translation ist fett gedruckt und unterstrichen.

7.2.2 DNA-Sequenzanalyse von AATPCp

Aus Cyanophora paradoxa konnte ein cDNA-Fragment amplifiziert werden, dessen Nukleotidsequenz 789 bp lang ist und für ein Polypeptid bestehend aus 263 Aminosäuren kodiert (Abb. 7.9). Bei diesem AATPCp-cDNA-Fragment handelt es sich um eine Teilsequenz eines nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporters (AATPCp; ATP/ADP-Transportprotein aus Cyanophora paradoxa). Sowohl der C-Terminus als auch der N-Terminus des Proteins ist daher unbekannt.

```
  1 - AGTGTCGTGCTCAGCCTTCTCTTCTGGGGCTTTGCCAACGAGATCTGCAAGGTCGAGGAA
       S  V  V  L  S  L  L  F  W  G  F  A  N  E  I  C  K  V  E  E  -  20
 61 - GCGAAGAAGTTCTATCCCCTCTTCGGGCTTGGGGCGAACGTGGCGCTTGTCGTCTCGGGT
       A  K  K  F  Y  P  L  F  G  L  G  A  N  V  A  L  V  V  S  G  -  40
121 - CGTGTGGTGAAGTATCTCTCAAATGTTCGCGACTCTCTCCCAGCGGGCGTCGATCCGTGG
       R  V  V  K  Y  L  S  N  V  R  D  S  L  P  A  G  V  D  P  W  -  60
181 - GGCTACTCTCTCAACGCTCTGATGGGCCTCGTGCTCCTCGGCGGTCTTATTGTGGTTGGC
       G  Y  S  L  N  A  L  M  G  L  V  L  L  G  G  L  I  V  L  G  -  80
241 - ACCTATTGGGCGATGAACCGCTGGGTTCTCACCGACCCAGAAATGTACACGCCGCCTGCG
       T  Y  W  A  M  N  R  W  V  L  T  D  P  E  M  Y  T  P  P  A  - 100
301 - GCTGGCGCCCCTGTCAAGTCCGGCAAGAAGAAGAAGCCGAAGATGAGTGTCAAGGAGTCC
       A  G  A  P  V  K  S  G  K  K  K  K  P  K  M  S  V  K  E  S  - 120
361 - TTCATGTATCTCGGCCAGAGCCCATACATCCGCAATCTTGCTGTTCTCGTCATCTCGTAC
       F  M  Y  L  G  Q  S  P  Y  I  R  N  L  A  V  L  V  I  S  Y  - 140
421 - GGCGTGTCCATTAACCTCGTGGAGGTCACCTGGAAGTCGAAGATCAAGCAAGCGTTTCCC
       G  V  S  I  N  L  V  E  V  T  W  K  S  K  I  K  Q  A  F  P  - 160
481 - AACCCGAACCAGTACTCATCCTTCATGGGCGACTTCTCGACCCTCACTGGCATCTGCACT
       N  P  N  Q  Y  S  S  F  M  G  D  F  S  T  L  T  G  I  C  T  - 180
541 - CTCGGCATGATGCTTCTGTCCCGTGTCGTGTTCAAGAAGTTCGGATGGGGCACTGCTGCG
       L  G  M  M  L  L  S  R  V  V  F  K  K  F  G  W  G  T  A  A  - 200
601 - ATGGTCACTCCTGGAGTGCTTCTGGCAACCGGGCTGTCCTTCTTCGGGCTCATTCTTTTT
       M  V  T  P  G  V  L  L  A  T  G  L  S  F  F  G  L  I  L  F  - 220
661 - GAGGACTTCTTCACGCCTGTGACCCAGATGTTCGGCATCTCACCACTCATGCTCGCTGTT
       E  D  L  L  H  A  C  D  P  D  V  R  H  L  T  T  H  A  R  C  - 240
721 - TTCTGCGGAGCAGCACAGAACATCCTTTCCAAGGCCACCAAGTACTCGCTCTTCGATCCG
       F  C  G  A  A  Q  N  I  L  S  K  A  T  K  Y  S  L  F  D  P  - 260
781 - ACCAAGGAG
       T  K  E                                                      - 263
```

Abb. 7.9: Teilsequenz der AATPCp-cDNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben.

7.2.3 DNA-Sequenzanalyse von AATPDs

Der EST-Klon BG264105 kodiert für ein putativen ATP/ADP-Transportprotein aus Dunadiella salina (AATPDs). Die innerhalb des EST-Projekts ansequenzierte cDNA-Teilsequenz besitzt eine Länge von 1219 bp. Die abgeleitete Proteinsequenz entspricht einem Protein mit 200 Aminosäuren. Aufgrund der fehlenden Sequenzinformation ist bislang nur das C-terminale Ende des AATPDs-Proteins bekannt. Als mögliches Stoppkodon könnte die Nukleotidposition 601-603 bp angesehen werden (Abb. 7.10).

```
   1 - GCTAAGATCAAGGCCCAGTTCCCCAACCCCAACGACTACTCCTGCTTCATGGGTAACTTC
        A  K  I  K  A  Q  F  P  N  P  N  D  Y  S  C  F  M  G  N  F  -  20
  61 - AGCACAGCCACTGGTGCAGTGACCTTCGCCATGATGCTTCTGTCCCGCGTCATCTTCCGC
        S  T  A  T  G  A  V  T  F  A  M  M  L  L  S  R  V  I  F  R  -  40
 121 - AAGTTTGGCTGGGGTACAGCTGCTCTCATCACTCCCACCCTGCTGCTTGTCACCGGTCTG
        K  F  G  W  G  T  A  A  L  I  T  P  T  L  L  L  V  T  G  L  -  60
 181 - ATTTTCTTCAGCTTGCTCATGTTCCCTGAGGCCACTGGCTCCATGCTGGCAGGCTGGGGC
        I  F  F  S  L  L  M  F  P  E  A  T  G  S  M  L  A  G  W  G  -  80
 241 - ATGACCCCCCTGTATGCCGCTGTGCTGGTGGGCGCTGCCCAGAACATCTTCAGCAAGTCT
        M  T  P  L  Y  A  A  V  L  V  G  A  A  Q  N  I  F  S  K  S  - 100
 301 - GCCAAGTACAGCCTGTTCGACCCCTGCAAGGAGATGGCTTACATCCCCTTGGATGATGAG
        A  K  Y  S  L  F  D  P  C  K  E  M  A  Y  I  P  L  D  D  E  - 120
 361 - GTCAAGACCAAGGGTAAGGCCGCCATTGATGTGATCTGCAACCCTCTGGGCAAGTCCGGT
        V  K  T  K  G  K  A  A  I  D  V  I  C  N  P  L  G  K  S  G  - 140
 421 - GGTGCCCTGATCCAGCAGTTCATGATTATTGGCTTCGGCTCCCTGGCCGCCTCCACACCT
        G  A  L  I  Q  Q  F  M  I  I  G  F  G  S  L  A  A  S  T  P  - 160
 481 - TACCTGGGTGCCATCCTGCTGGCCATTGTGCTGATCTGGATCCAAGCCGCCGCATCGCTG
        Y  L  G  A  I  L  L  A  I  V  L  I  W  I  Q  A  A  A  S  L  - 180
 541 - AACAAGCAGTTCGTGGCTCTCCAAGCCGAGACCGGCAACACCATGGGAGGCCTGAAGGAT
        N  K  Q  F  V  A  L  Q  A  E  T  G  N  T  M  G  G  L  K  D  - 200
 601 - TAAGCTTGCTCTGGGCGCGGCATTGGTCCTTCCCATGGGGCTGCTGCTCTCCTTCTGAGG
        *
 661 - CGTTGCGAAAGCTGGGGCCACAGGGTGGGGGCTCAGCAGCTGGACGCTTCAGTGTATTGT

 721 - CATAGGTCTTTCAAAGCTCTTGGACTGGGAAGAGCTGATTAGTTGATTTGATTTGTGTGG

 781 - AAGGAGAGGAGATGTGGGGGGCTCATGGTCCCTCTGCATGCACGACCTCTGTCCGCATAC

 841 - CACTTTCTTTATACTTCCCAGACATTGGAACATATTCCATCACCACATACATCCTGCCAT

 901 - GTCTACATGCAGACTTTCTGCACCCCCACCTCCGTTTCGAGAGCCCGTTGCATACTTGCT

 961 - CACCCACCCCTCCTCTTTCTTACCGTCCCGCCGCCCCTTCCGCCTTCTCCCCCCCCTCTC

1021 - CGGTTTTTTCCTTTTTTTTTATCTCTCCCTCTCTCCCCCCCTCCCACTTCTCCCTTTCCC

1081 - TGTCCGCGTCTGCCCGGTGACTCCCCTTGCCTCCTCGCCTTCTCTCCGCCCCCCCTTAAC

1141 - TGTCCCCTATATCCCCCTCCCACCGCCCTCTCTCACAACCTCTTCCTCTTCCGGCTCATC

1201 - CCCACTCCCCGTCCTGCCT
```

Abb. 7.10: Teilsequenz des AATPDs-EST-Klons BG264105 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben. Das mögliche Stoppkodon der Translation ist fett gedruckt und unterstrichen.

7.2.4 DNA-Sequenzanalyse von AATPHv

Die cDNA-Sequenz des EST-Klons BG343269 besitzt eine Länge von 597 bp. Die abgeleitete Aminosäuresequenz kodiert für ein Polypeptid bestehend aus 199 Aminosäuren, das aufgrund der hohen Ähnlichkeiten den nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern zugeordnet wird (AATPHv, putativer ATP/ADP-Transportprotein aus Hordeum vulgare). Dieser cDNA-Abschnitt enthält nur eine Teilsequenz des vollständigen kodierenden Bereiches. So fehlen die Nukleotidsequenzen für das 5´- und 3´-Ende (Abb. 7.11).

```
   1 - ACTGTGAAGTATTTCTCAAATTTGCGGAAGACAATGGGTCCAGGAGTTGATGGTTGGGAG
        T  V  K  Y  F  S  N  L  R  K  T  M  G  P  G  V  D  G  W  E  -  20
```

```
 61 - GTATCTTTGAAAGGAATGATGGGCATAGTGGTACTTCTTGGGCTTGTCATTACTTCCATT
       V  S  L  K  G  M  M  G  I  V  V  L  L  G  L  V  I  T  S  I  -  40
121 - TATTGGGGAGTGAACAAGCTTGTTTTGAATGACCCTTCTCTTCCAAAATCTGATCACAAG
       Y  W  G  V  N  K  L  V  L  N  D  P  S  L  P  K  S  D  H  K  -  60
181 - AAGAAAAAGAACAAACCTAAGCTTAGCATGAAAGAGAGTATGAAAGTTCTGATCTCTTCA
       K  K  K  N  K  P  K  L  S  M  K  E  S  M  K  V  L  I  S  S  -  80
241 - AAATATGTGAGGGACCTTGCTACCTTAGTTGTTGCATACGGCATTAGTATCAATCTTGTG
       K  Y  V  R  D  L  A  T  L  V  V  A  Y  G  I  S  I  N  L  V  - 100
301 - GAAGTCACATGGAAATCGAAGCTCAAGGCACAGTTCCCCAGTCCAAACGAGTACTCATCC
       E  V  T  W  K  S  K  L  K  A  Q  F  P  S  P  N  E  Y  S  S  - 120
361 - TTCATGGGTGATTTCTCTACTGCAACTGGAATTGCAACTTTCACGATGATGCTGTTAGGT
       F  M  G  D  F  S  T  A  T  G  I  A  T  F  T  M  M  L  L  G  - 140
421 - CGGATTATATTCCAAAGATTTGGCTGGGGTGTAGCCGCCATGATCACCCCCACAGTTTTG
       R  I  I  F  Q  R  F  G  W  G  V  A  A  M  I  T  P  T  V  L  - 160
481 - TTGGTGACTGGCGTTGGTTTCTTCTCTCTGATTTTGTTTGGGCAACCATTGACTCCCCTG
       L  V  T  G  V  G  F  F  S  L  I  L  F  G  Q  P  L  T  P  L  - 180
541 - CTTGCCACGTGGGGTATGACCCCTCTTCTTGCGCTGTTATGTGGGTGCCTGCAGACA
       L  A  T  W  G  M  T  P  L  L  A  L  L  C  G  C  L  Q  T     - 199
```

Abb. 7.11: Teilsequenz des AATPHv-EST-Klons BG343269 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben.

7.2.5 DNA-Sequenzanalyse von AATPLj

In dem EST-Projekt von Lotus japonicus konnten die zwei EST-Klone AW720186 und AV425290 identifiziert werden, die für ein putatives plastidäres ATP/ADP-Transportprotein aus Lotus japonicus kodieren (AATPLj). Die Sequenzinformation vom EST-Klon AW720186 ist 462 bp lang und das längste offene Leseraster besitzt eine Länge von 154 Aminosäuren (Abb. 7.12). Vom EST-Klon AV425290 sind dagegen 303 bp bekannt. Diese Teilsequenz kodiert für ein Peptid mit 121 Aminosäuren (Abb. 7.13). Beide EST-cDNAs enthalten nicht die vollständige Information für das gesamte Protein, da sowohl die Nukleotidsequenzen für das 5´- als auch für das 3´-Ende unbekannt sind.

```
  1 - GGGGGAATCCGAGGTTGAAAAACCGAAGATTCTGGGTGTTGAGGTTGCTACCCTCAAGAA
       G  E  S  E  V  E  K  P  K  I  L  G  V  E  V  A  T  L  K  K  -  20
 61 - GATTATACCACTTGGGATGATGTTTTTCTGCATCCTGTTCAACTACACCATTCTAAGGGA
       I  I  P  L  G  M  M  F  F  C  I  L  F  N  Y  T  I  L  R  D  -  40
121 - TACTAAGGATGTTTTGGTTGTGACGGCGAAGGGAAGCAGTGCTGAGATTATACCGTTTTT
       T  K  D  V  L  V  V  T  A  K  G  S  S  A  E  I  I  P  F  L  -  60
181 - GAAAACTTGGGTGAATCTTCCTATGGCTATTGGGTTTATGTTGTTGTATACCAAGTTGTC
       K  T  W  V  N  L  P  M  A  I  G  F  M  L  L  Y  T  K  L  S  -  80
241 - GAATGTGTTGTCTAAGCAGGCTTTGTTTTACACTGTTATTGTCCCCTTTATTGCATTCTT
       N  V  L  S  K  Q  A  L  F  Y  T  V  I  V  P  F  I  A  F  F  - 100
301 - TGGGGCATTTGGGTTTCTTTTGTACCCTCTTAGCAGCTATATCCACCCTGAGGCGTTTGC
       G  A  F  G  F  L  L  Y  P  L  S  S  Y  I  H  P  E  A  F  A  - 120
361 - GGATAAGCTTCTTAACATCCTTGGGCCGAGGTTCCTTGGTCCTCTTGCAATCATGAGAAT
       D  K  L  L  N  I  L  G  P  R  F  L  G  P  L  A  I  M  R  I  - 140
421 - CTGGACTTTCTGTTTGTTCTATGTTATGGCTGAATTGTGGGG
       W  T  F  C  L  F  Y  V  M  A  E  L  W  G                    - 154
```

Abb. 7.12: Teilsequenz des AATPLj-EST-Klons AW720186 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben.

```
  1 - CTTGAAGTTCTTGGTGTCTTCAAAATATATAAGGGATCTTGCTACATTAGTGGTTGCATA
       L  K  F  L  V  S  S  K  Y  I  R  D  L  A  T  L  V  V  A  Y  -  20
 61 - TGGAATTAGTATCAATCTTGTTGAGGTTACATGGAAATCAAAGCTCAAAGCTCAGTATCC
       G  I  S  I  N  L  V  E  V  T  W  K  S  K  L  K  A  Q  Y  P  -  60
121 - TAGCCCGAATGAGTACTCAGCTTTTATGGGAGACTTCTCAACTGCAACTGGAATTGCTAC
       S  P  N  E  Y  S  A  F  M  G  D  F  S  T  A  T  G  I  A  T  -  80
181 - ATTCATAATGATGCTTCTAAGCCAATTTGTTTTTGACAAATATGGATGGGGAGTTGCTGC
       F  I  M  M  L  L  S  Q  F  V  F  D  K  Y  G  W  G  V  A  A  - 100
241 - CAATATCACGCCTACCGTCCTACTCTTGACCGGAGTTGGTTTCTTTTCTCTCATATTATT
       N  I  T  P  T  V  L  L  L  T  G  V  G  F  F  S  L  I  L  F  - 120
301 - TGG
       G
```

Abb. 7.13: Teilsequenz des AATPLj-EST-Klons AV425290 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben.

7.2.6 DNA-Sequenzanalyse von AATPLe

Die EST-Klone AW092822, AW931058 und BE459811 kodieren für einen putativen ATP/ADP-Transportprotein aus Lycopersion esculentum (AATPLe). Die zur Verfügung stehenden cDNA-Teilsequenzen besitzen eine Länge von 511 bp, 565 bp sowie 710 bp. Deren abgeleitete Proteinsequenz besteht aus 170 Aminosäuren, 188 Aminosäuren bzw. 236 Aminosäuren (Abb. 7.14, 7.15 und 7.16). Die im Rahmen des EST-Projekt ansequenzierten cDNA-Sequenzen entsprechen nur einer unvollständig kodierenden Teilsequenz. Die Sequenzinformationen für die 5´- und 3´-Enden fehlen.

```
  1 - GGCTTTGACACAAAGCCTCAGTTGTTTGGTCAAAAGAAGAGGTGGGGGTCAATATGCAAA
       G  F  D  T  K  P  Q  L  F  G  Q  K  K  R  W  G  S  I  C  K  -  20
 61 - GCTGCGGGTGCTGGTGGTGCATCTGATGGACAGCCACTTTTTGTTGAAAAGGAGCAACCT
       A  A  G  A  G  G  A  S  D  G  Q  P  L  F  V  E  K  E  Q  P  -  40
121 - AAGTTTATGGGGATTGAAGTTGTGACCCTTAAGAAAATTATACCACTTGGGGCTATGTTC
       K  F  M  G  I  E  V  V  T  L  K  K  I  I  P  L  G  A  M  F  -  60
181 - TTTTGTATTCTGTTTAATTATACAATCCTTAAGGATACTAAGGATGTGTTGGTTGTAACA
       F  C  I  L  F  N  Y  T  I  L  K  D  T  K  D  V  L  V  V  T  -  80
241 - GCTAAAGGGTCTAGTGCTGAGATTATCCCTTTCTTGAAAACTTGGGTGAATTTGCCTATG
       A  K  G  S  S  A  E  I  I  P  F  L  K  T  W  V  N  L  P  M  - 100
301 - GCTATTGGATTCATGCTTTTGTACACAAAGTTGGCTAATGTGTTGTCAAAGGAGGCTCTT
       A  I  G  F  M  L  L  Y  T  K  L  A  N  V  L  S  K  E  A  L  - 120
361 - TTTTATACTGTTATACTTCCTTTTATTGCATTCTTTGGGGCGTTTGGGTTTGTTTTGTAT
       F  Y  T  V  I  L  P  F  I  A  F  F  G  A  F  G  F  V  L  Y  - 140
421 - CCTCTTAGCAATTACTTTCACCCTACAGCTTTTGCTGATAAGCTTCTGAATACCCTTGGT
       P  L  S  N  Y  F  H  P  T  A  F  A  D  K  L  L  N  T  L  G  - 160
481 - CCAAGATTTCTTGGACCAATTGCTATTCTGA
       P  R  F  L  G  P  I  A  I  L                                 - 170
```

Abb. 7.14: Teilsequenz des AATPLe-EST-Klons AW092822 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben.

```
  1 - GCTAAAGGGTCTAGTGCTGAGAGTATTCCTTTCTTGAAAACTTGGGTGAATTTGCCTATG
       A  K  G  S  S  A  E  S  I  P  F  L  K  T  W  V  N  L  P  M  -  20
 61 - GCTATTGGATTCATGCTTTTGTACACAAAGTTGGCTAATGTGTTGTCAAAGGAGGCTCTT
       A  I  G  F  M  L  L  Y  T  K  L  A  N  V  L  S  K  E  A  L  -  40
121 - TTATACTGTTATACTTCCTTTTATTGCATTCTTTGGGGCGTTTGGGTTTGTTTTGTTTAT
       F  Y  T  V  I  L  P  F  I  A  F  F  G  A  F  G  F  V  L  Y  -  60
```

```
181 - CCTCTTAGCAATTACTTTCACCCTACAGCTTTTGCTGATAAGCTTCTCAATACCCTTGGT
      P  L  S  N  Y  F  H  P  T  A  F  A  D  K  L  L  N  T  L  G  -  80
241 - CCAAGATTTCTTGGACCAATTGCTATTCTGAGGATCTGGAGTTTCTGCTTGTTTTATGTC
      P  R  F  L  G  P  I  A  I  L  R  I  W  S  F  C  L  F  Y  V  - 100
301 - ATGGCTGAGCTTTGGGGAAGTGTGGTGGTTTCAGTACTCTTTTGGGGATTTGCTAATCAG
      M  A  E  L  W  G  S  V  V  V  S  V  L  F  W  G  F  A  N  Q  - 120
361 - ATTACGACTGTCGATGAGGCTAAGAAATTCTATCCTTTGTTTGGACTTGGAGCGAATGTT
      I  T  T  V  D  E  A  K  K  F  Y  P  L  F  G  L  G  A  N  V  - 140
421 - GCTCTTATTTTCTCTGGTCGCACAGTGAAGTACTTTTCTAGCTTGAGAAGCTCTTTAAGT
      A  L  I  F  S  G  R  T  V  K  Y  F  S  S  L  R  S  S  L  S  - 160
481 - CCTGGAGTTGATGGTTGGGCTATCTCCCTGAAAGGAATGATGAGCATTGTTGTGATGATG
      P  G  V  D  G  W  A  I  S  L  K  G  M  M  S  I  V  V  M  M  - 180
541 - GGTGGGGCAATCTGTTTCTTTTACT
      G  G  A  I  C  F  F  Y                                       - 188
```

Abb. 7.15: Teilsequenz des AATPLe-EST-Klons AW931058 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben.

```
  1 - GCATATGGCATTAGTATCAACCTTGTTGAAGTTACATGGAAGATGAAGCTCAAAGCTCAG
      A  Y  G  I  S  I  N  L  V  E  V  T  W  K  S  K  L  K  A  Q  -  20
 61 - TTCCCAAGCCCCAACGAATACTCGTCATTCATGGGTGACTTCTCAACTGCTACTGGAATA
      F  P  S  P  N  E  Y  S  S  F  M  G  D  F  S  T  A  T  G  I  -  40
121 - GCAACTTTCACAATGATGTTGTTAAGTCAATGGATTTTCGACAAGTACGGATGGGGAGCA
      A  T  F  T  M  M  L  L  S  Q  W  I  F  D  K  Y  G  W  G  A  -  60
181 - GCAGCCAAGATAACACCTACAGTCCTGCTCCTTACCGGAGTTGGTTTCTTCTCCCTGCTT
      A  A  K  I  T  P  T  V  L  L  L  T  G  V  G  F  F  S  L  L  -  80
241 - TTGTTTGGTGCCCCTCTAGCACCTACTCTTGCAAAGTTTGGAATGACTCCTCTTCTAGCA
      L  F  G  A  P  L  A  P  T  L  A  K  F  G  M  T  P  L  L  A  - 100
301 - GCTGTCTATGTGGGTGCAATGCAGAACATTTTCAGTAAGAGTGCAAAGTATAGTTTGTTT
      A  V  Y  V  G  A  M  Q  N  I  F  S  K  S  A  K  Y  S  L  F  - 120
361 - GACCCCTGCAAAGAAATGGCCTACATTCCTTTGGATGAAGACACCAAGGTTAAAGGGAAG
      D  P  C  K  E  M  A  Y  I  P  L  D  E  D  T  K  V  K  G  K  - 140
421 - GCAGCAATCGATGTTGTCTGCAATCCACTGGGAAAGTCTGGAGGAGCTTTGATACAGCAG
      A  A  I  D  V  V  C  N  P  L  G  K  S  G  G  A  L  I  Q  Q  - 160
481 - TTCATGATTTTGACTTTTGGTTCACTTGCCAGCTCGACACCCTACCTTGGTGGTGTGCTC
      F  M  I  L  T  F  G  S  L  A  S  S  T  P  Y  L  G  G  V  L  - 180
541 - TTAGTAATTGTTCTTGCATGGTTGGGAGCAGCCAAGTCTTTGGATCAACAGTTCACTCAA
      L  V  I  V  L  A  W  L  G  A  A  K  S  L  D  Q  Q  F  T  Q  - 200
601 - TTACGCCACGAAGAAGATCTTGAGAAGGAAATGGAGAGAGCATCGTTGAAGATCCCTGTC
      L  R  H  E  E  D  L  E  K  E  M  E  R  A  S  L  K  I  P  V  - 220
661 - GTGTCTCAAATGAAACTGGAAATAGTCCTCTCTCGAGTGGGTCATCACTGAAT
      V  S  Q  M  K  L  E  I  V  L  S  R  V  G  H  H  *           - 236
```

Abb. 7.16: Teilsequenz des AATPLe-EST-Klons BE459811 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben. Das Stoppkodon der Translation ist fett gedruckt und unterstrichen.

7.2.7 DNA-Sequenzanalyse von AATPMt

Es konnten in den EST-Projekten von Medicago truncatula drei EST-Klone mittels Computer-gestützter Analysen identifiziert werden (BF634429, BG454651 und BG456211), deren Aminosäuresequenzen hohe Ähnlichkeiten zu den bisher bekannten plastidären ATP/ADP-Transporter aus höheren Pflanzen aufweisen und deshalb als AATP1Mt bezeichnet werden. Die Nukleotidsequenzen der cDNA-Klone besitzen eine Basenpaarlänge von 675, 604 sowie 655. Der daraus ermittelte längste kodierende Bereich enthält 196, 201 bzw.

202 Aminosäuren (Abb. 7.17, 7.18 und 7.19). Damit liegt bei allen drei EST-Klonen keine vollständige Sequnzeinformation für das AATP1Mt-Protein vor.

```
  1 - CGTTCCTCTCTTTCATATTCTTTCTTGAAAAATTCTCCATTAAATTATTTTTCTTGAAGG

 61 - AATTTCAAAGAGGGGAGGAACACCACCATGGTTGCTGTTCTTCAAACCAGAGGGCTTCTC
    -                           M  V  A  V  L  Q  T  R  G  L  L  -  11
121 - TCTCTTCCTACAAACCCTAAAACCAGGGTTTTGCTTCAACCCAATTCCATAAAGCATAGA
    -  S  L  P  T  N  P  K  T  R  V  L  L  Q  P  N  S  I  K  H  R  -  31
181 - TTTTTATCACTTAGACCCAAAACCCTTGATGGGTTTTCTCTTAATTCAAATGGGTTTTCT
    -  F  L  S  L  R  P  K  T  L  D  G  F  S  L  N  S  N  G  F  S  -  51
241 - TTAAATTCAAATGGGTTTTCAAAAATCAATTCTTTTTCATCAAAAGTTAATGGCTTTGGT
    -  L  N  S  N  G  F  S  K  I  N  S  F  S  S  K  V  N  G  F  G  -  71
301 - GAAAAGGAGAAGAATTTGTTCATTTGTAAGGCTGAAGCAGCTGCTGCTGCTGGTGCTGAT
    -  E  K  E  K  N  L  F  I  C  K  A  E  A  A  A  A  A  G  A  D  -  91
361 - TCTGATGGAAAACCTGTTTTTGGAGAAATTGAGGTTGATAAAAAACCTAAAATTTTGGGG
    -  S  D  G  K  P  V  F  G  E  I  E  V  D  K  K  P  K  I  L  G  - 111
421 - ATTGAGGTTGATACTATGAAAAAGATTTTACCTTTAGGGTTGATGTTTTTCTGTATCTTG
    -  I  E  V  D  T  M  K  K  I  L  P  L  G  L  M  F  F  C  I  L  - 131
481 - TTCAATTACACAATTTTGAGGGATACTAAGGATGTTTTGGTTGTTACAGCAAAAGGAAGT
    -  F  N  Y  T  I  L  R  D  T  K  D  V  L  V  V  T  A  K  G  S  - 151
541 - AGTGCTGAGATTATACCATTTTTGAAAACATGGGTGAATCTTCCTATGGCTATTGGTTTT
    -  S  A  E  I  I  P  F  L  K  T  W  V  N  L  P  M  A  I  G  F  - 171
601 - ATGTTGTTGTATACAAAACTGTCTAATGTTTTGTCAAAACAAGCACTGTTCTACTCTGTC
    -  M  L  L  Y  T  K  L  S  N  V  L  S  K  Q  A  L  F  Y  S  V  - 191
661 - ATTTTACCTTTTATT
    -  I  L  P  F  I                                                 - 196
```

Abb. 7.17: Teilsequenz des AATPMt-EST-Klons BF634429 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben. Das mögliche Startkodon der Translation ist fett gedruckt und unterstrichen.

```
  1 - TTTGGGGCTTTTGGGTTTGTTTTGTACCCTCTTAGCAACTATATCCATCCTGAAGCATTT
       F  G  A  F  G  F  V  L  Y  P  L  S  N  Y  I  H  P  E  A  F  -  20
 61 - GCAGACAAGCTTCTTAATGTCCTTGGTCCTAGGTTTCTTGGTCCTCTTGCAATTATAAGG
       A  D  K  L  L  N  V  L  G  P  R  F  L  G  P  L  A  I  I  R  -  40
121 - ATTTGGAGTTTCTGTTTGTTCTATGTTATGGCTGAATTGTGGGGGGAGTGTGGTTGTTTCT
       I  W  S  F  C  L  F  Y  V  M  A  E  L  W  G  S  V  V  V  S  -  60
181 - GTGCTGTTTTGGGGTTTTGCTAATCAGATAACTACCGTTGATGAAGCAAAACGATTCTAC
       V  L  F  W  G  F  A  N  Q  I  T  T  V  D  E  A  K  R  F  Y  -  80
241 - CCACTGTTTGGACTTGGGGCCAATGTAGCCCTTATCTTCTCTGGTCGTACTGTGAAATAC
       P  L  F  G  L  G  A  N  V  A  L  I  F  S  G  R  T  V  K  Y  - 100
301 - TTTTCTAATATGAGGAAGAGTTTAGGTCCTGGAGTTGATGGTTGGGCCATCTCTCTAAAA
       F  S  N  M  R  K  S  L  G  P  G  V  D  G  W  A  I  S  L  K  - 120
361 - GCAATGATGAGCATAGTTGTGGCTATGGGGTTTGCAATCTGTTTCCTGTACTGGTGGACG
       A  M  M  S  I  V  V  A  M  G  F  A  I  C  F  L  Y  W  W  T  - 140
421 - AATAATTATGTTCCTCTTCCTGAACGTAGCATAAAGAAGAAGAAGAAACCAAAAATGGGA
       N  N  Y  V  P  L  P  E  R  S  I  K  K  K  K  K  P  K  M  G  - 160
481 - ACAATGGAGAGCTTGAAATTCTTGGTGTCTTCAAAGTACATTAGAGATCTAGCCACTTTA
       T  M  E  S  L  K  F  L  V  S  S  K  Y  I  R  D  L  A  T  L  - 180
541 - GTGGTTGCTTATGGAATCAGCATCAATCTTGTTGAGGTTACATGGAAGTCTAAGCTCAAA
       V  V  A  Y  G  I  S  I  N  L  V  E  V  T  W  K  S  K  L  K  - 200
601 - GCTC
       A                                                             - 201
```

Abb. 7.18: Teilsequenz des AATPMt-EST-Klons BG454651 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben.

```
  1 - CTAAGTCAATATATATTTGACAAATATGGATGGGGAGTTGCTGCCAAGATCACACCTACA
       L  S  Q  Y  I  F  D  K  Y  G  W  G  V  A  A  K  I  T  P  T  -  20
 61 - GTCCTGCTTCTGACCGGAGTTGGTTTCTTCTCTCTCATATTGTTTGGAGGTCCAATTGCA
       V  L  L  L  T  G  V  G  F  F  S  L  I  L  F  G  G  P  I  A  -  40
121 - CCCGGTCTTGCATCAATTGGAATGACTCCACTGCTAGCAGCTGTATATGTTGGTGCCATG
       P  G  L  A  S  I  G  M  T  P  L  L  A  A  V  Y  V  G  A  M  -  60
181 - CAGAACATTTTTAGCAAGAGTGCTAAGTACAGTTTATTCGACCCCTGCAAAGAAATGGCT
       Q  N  I  F  S  K  S  A  K  Y  S  L  F  D  P  C  K  E  M  A  -  80
241 - TACATTCCCTTGGATGAAGATACTAAGGTCAAGGGGAAAGCAGCCATTGATGTTGTTTGC
       Y  I  P  L  D  E  D  T  K  V  K  G  K  A  A  I  D  V  V  C  - 100
301 - AACCCATTGGGAAAATCTGGAGGAGCCCTTATCCAACAGTTCATGATCTTAACTTTTGGT
       N  P  L  G  K  S  G  G  A  L  I  Q  Q  F  M  I  L  T  F  G  - 120
361 - TCACTAGCCAACTCAACTCCATACCTTGGAGGTGTGCTTCTTGTGATTGTTCTTGCCTGG
       S  L  A  N  S  T  P  Y  L  G  G  V  L  L  V  I  V  L  A  W  - 140
421 - TTAGGAGCAGCCAAGTCTTTGGATACACAGTTTACTGCATTGCGTCAGGAGGAAGAACTC
       L  G  A  A  K  S  L  D  T  Q  F  T  A  L  R  Q  E  E  E  L  - 160
481 - GAGAAACAGATGGAAAGAGCAGCAGCTGTCAAGATACCAGTAGTGTCTGAGAATGATGGT
       E  K  Q  M  E  R  A  A  A  V  K  I  P  V  V  S  E  N  D  G  - 180
541 - GGAAACGGTTCCCTCTCAGGTGACGCTTCAAGTAGTCCATCAGAAGCCTCAACTCCTCGC
       G  N  G  S  L  S  G  D  A  S  S  S  P  S  E  A  S  T  P  R  - 200
601 - AACAATTAAGAACATGCACGGTTCTTTCTGTGGAGAAATTGATTTACAGAAAGA
       N  N  *                                                      - 202
```

Abb. 7.19: Teilsequenz des AATPMt-EST-Klons BG456211 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben. Das Stoppkodon der Translation ist fett gedruckt und unterstrichen.

7.2.8 DNA-Sequenzanalyse von AATPMp

Für die cDNA-Sequenzen der EST-Klone AW255797 und AW255224 kodieren für einen putativen ATP/ADP-Transportprotein aus Mentha piperita (AATPMp). Die daraus ermittelte Proteinsequenz des EST-Klons AW255797, von dem 600 bp innerhalb des EST-Projekts ansequenziert worden sind, enthält 220 Aminosäuren (Abb. 7.20). Die 477 bp lange cDNA-Sequenz des EST-Klons AW255224 kann in ein Polypeptid bestehend aus 159 Aminosäuren übersetzt werden (Abb. 7.21).

```
  1 - TGGAGTTTCTGTCTTTTCTATGTCATGGCTGAACTTTGGGGAAGTGTGGTTATCTCCGTT
       W  S  F  C  L  F  Y  V  M  A  E  L  W  G  S  V  V  I  S  V  -  40
 61 - CTTTTCTGGGGATTTGCTAATCAGATTACAACCGTTGATGAAGCCAAGAGATTCTATCCG
       L  F  W  G  F  A  N  Q  I  T  T  V  D  E  A  K  R  F  Y  P  -  60
121 - CTCTTTGGGCTAGGTGCGAACGTTGCTCTAATTTTCTCAGGTAGAACAGTGAAGTACTTC
       L  F  G  L  G  A  N  V  A  L  I  F  S  G  R  T  V  K  Y  F  -  80
181 - TCCCAGATGAGGCAAACCCTTGCTCCGGGAGTTGATGGTTGGGCCATCTCCTTAAAGGGA
       S  Q  M  R  Q  T  L  A  P  G  V  D  G  W  A  I  S  L  K  G  - 100
241 - ATGATGAGTATTGTGGTGGGAATGGGGTTTGCTATTTGTTTCCTTTATTGGTGGGTCAAT
       M  M  S  I  V  V  G  M  G  F  A  I  C  F  L  Y  W  W  V  N  - 120
301 - AACAACGTTCAGCTTCCTTCCCGTAGTCTGAAGAAGAAGGAGAAGCCGAAAATGGGAACA
       N  N  V  Q  L  P  S  R  S  L  K  K  K  E  K  P  K  M  G  T  - 140
361 - ATGGAGAGCTTAAAGTTTTTGGTATCATCCAAATATATTAGAAATCTCGCGACTTTGGTG
       M  E  S  L  K  F  L  V  S  S  K  Y  I  R  N  L  A  T  L  V  - 160
421 - GTAGCATACGGTATAAGCATCAACCTTGTCGAGGTCACATGGAAATCGAAGCTCAAAGCC
       V  A  Y  G  I  S  I  N  L  V  E  V  T  W  K  S  K  L  K  A  - 180
481 - CAGTTCCCAACACCAAACGAATATTCAACATTTATGGGCGACTTCTCGACTGCGACTGGA
       Q  F  P  T  P  N  E  Y  S  T  F  M  G  D  F  S  T  A  T  G  - 200
541 - GTAACAACTTTCATTATGATGCTTTTGAGTCAATGGATCTTCACCAAATACGGCTGGGGA
       V  T  T  F  I  M  M  L  L  S  Q  W  I  F  T  K  Y  G  W  G  - 220
```

Abb. 7.20: Teilsequenz des AATPMp-EST-Klons AW255797 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben.

```
  1 - AAATACGGCTGGGGAGTCGCAGCAACTGTTACACCAACAGTCTTGCTTCTAACCGGAGTC
       K  Y  G  W  G  V  A  A  T  V  T  P  T  V  L  L  L  T  G  V  -  20
 61 - GGATTCTTTTCTTTGATTCTATTTGGTGGACCCATTGCTCCTACCCTCGCACAGTTCGGC
       G  F  F  S  L  I  L  F  G  G  P  I  A  P  T  L  A  Q  F  G  -  40
121 - ATGACCCCACTTTTAGCAGCCGTCTATGTGGGAGCGTTGCAGAACATTTTTAGCAAGAGT
       M  T  P  L  L  A  A  V  Y  V  G  A  L  Q  N  I  F  S  K  S  -  60
181 - GCGAAGTACAGCTTATTCGACCCGTGCAAGGAAATGGCATACATTCCTTTGGACGAGGAC
       A  K  Y  S  L  F  D  P  C  K  E  M  A  Y  I  P  L  D  E  D  -  80
241 - ACTAAGGTTAAAGGGAAGGCAGCTATCGACGTCGTATGCAATCCGTTGGGGAAATCCGGA
       T  K  V  K  G  K  A  A  I  D  V  V  C  N  P  L  G  K  S  G  - 100
301 - GGCGCTCTGATCCAACAGTTCATGATCTTAAGCTTCGGATCACTGGCAAATTCGACTCCG
       G  A  L  I  Q  Q  F  M  I  L  S  F  G  S  L  A  N  S  T  P  - 120
361 - TATCTCGGAAGGATACTGCTGGTGATCGTTCTCGCGTGGTTAGGAGCTGCGAAGTCGTTG
       Y  L  G  R  I  L  L  V  I  V  L  A  W  L  G  A  A  K  S  L  - 140
421 - GACGGCCAATTCACTGCGTTGAAGCAGGAAGAAGACCTGGAGAAGCAGATGGAAAGA
       D  G  Q  F  T  A  L  K  Q  E  E  D  L  E  K  Q  M  E  R     - 159
```

Abb. 7.21: Teilsequenz des AATPMp-EST-Klons AW255224 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben.

7.2.9 DNA-Sequenzanalyse von AATPMc

Der EST-Klon BG269363 kodiert für einen putativen ATP/ADP-Transportprotein aus Mesembryanthenum cyrstallinum (AATPMc). Die innerhalb des EST-Projekts ansequenzierte cDNA-Sequenz besitzt eine Länge von 1108 bp, dessen abgeleitete Proteinsequenz aus 253 Aminosäuren besteht. An der Nukleotidposition 760-762 bp könnte das Stoppkodon der Translation angenommen werden. Die von dem EST-Klon kodierte Aminosäuresequenz entspricht dem C-terminalen Bereich des AATPMc-Proteins. Die restliche Proteinsequenz ist bislang unbekannt (Abb. 7.22).

```
  1 - GTGGTTGCATATGGTATCAGCATTAACCTTGTTGAGGTTACATGGAAATCAAAGCTTAAA
       V  V  A  Y  G  I  S  I  N  L  V  E  V  T  W  K  S  K  L  K  -  20
 61 - GCTCAGTTTCCGAGCCCCAATGAATATTCTGCTTTCATGGGTGATTTCTCTACGGCAACT
       A  Q  F  P  S  P  N  E  Y  S  A  F  M  G  D  F  S  T  A  T  -  40
121 - GGGATAGCAACCTTCTCAATGATGCTTCTCAGCCAGTTCATATTCGACAAGTTTGGCTGG
       G  I  A  T  F  S  M  M  L  L  S  Q  F  I  F  D  K  F  G  W  -  60
181 - GGAGTTGCTGCTGCCATCACGCCTACGGTTCTTCTACTTTCAGGAGTTGGTTTCTTTTCA
       G  V  A  A  A  I  T  P  T  V  L  L  L  S  G  V  G  F  F  S  -  80
241 - TTGATTTTGTTCGGTGGTCCACTTGGACCAACTCTTTCGAGTTTTGGGATAACTCCTCTT
       L  I  L  F  G  G  P  L  G  P  T  L  S  S  F  G  I  T  P  L  - 100
301 - CTAGCAGCAGTATATGTTGGTGCCATGCAAAACATTTTCAGCAAGAGTGCCAAGTACAGT
       L  A  A  V  Y  V  G  A  M  Q  N  I  F  S  K  S  A  K  Y  S  - 120
361 - TTGTTTGATCCTTGCAAAGAAATGGCTTACATTCCATTGGATGAGGACACTAAGGTTAAG
       L  F  D  P  C  K  E  M  A  Y  I  P  L  D  E  D  T  K  V  K  - 140
421 - GGGAAGGCAGCCATTGACGTCGTTTGCAACCCGCTTGGAAAATCCGGAGGCGCTCTGATC
       G  K  A  A  I  D  V  V  C  N  P  L  G  K  S  G  G  A  L  I  - 160
481 - CAGCAGTTCATGATCTTAACCTTTGGGTCACTTGCCAATTCAACCCCTTACCTTGGAGGA
       Q  Q  F  M  I  L  T  F  G  S  L  A  N  S  T  P  Y  L  G  G  - 180
541 - ATTCTCTTGTTGATTGTAACTGCATGGCTGGCAGCAGCAAGGTCTTTGGACAAACAGTTC
       I  L  L  L  I  V  T  A  W  L  A  A  A  R  S  L  D  K  Q  F  - 200
601 - ACAGAGTTGCGCAGGGAGGAAGATCTCGAGAAGGAGATGGAGAGAGCGTCTGTTAAGATC
       T  E  L  R  R  E  E  D  L  E  K  E  M  E  R  A  S  V  K  I  - 220
```

```
661 - CCTGTTGTGGCCGATAACAGCACCGGGAAGGTCCACTCACCGGTGGGTCACAATTGAAC
      P  V  V  A  D  N  S  T  G  N  G  P  L  T  G  G  S  Q  L  N  -  240
721 - GACTCGCCAAACAGCTCGTCAGAGTCACTAAAATCCCAGTAAGGATTAAAAGTAAGTTAT
       D  S  P  N  S  S  S  E  S  L  K  S  Q  *                    -  253
781 - CTTCATATTCCATCAACCCAGGAAACGAAATATAAGTACAATTTGAGCTGTTTGTAGAAT

841 - TTTCATAATGGAATAATCCAACCAGCTGGAATGCTGAAATCGTTTTAGAGGAGACTTTTG

901 - TTGCTACATTAGATAATACTAGCCAATAGGTAGATAGATAAGTGGGGTAGATGAAATTTC

961 - AAGTTATTCCCAATATGCTGGGGTATGCAACAATGTAGACCATTCTTTTGATTNCTTATT

1021 - TTATATCAAACTGGCCCTCTCCCTGAGGATGCCTACTCAAGCTTTAAATAAGAGGTGCTA

1081 - GGTTTTGGGTAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Abb. 7.22: Teilsequenz des AATPMc-EST-Klons BG269363 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben. Das Stoppkodon der Translation ist fett gedruckt und unterstrichen.

7.2.10 DNA-Sequenzanalyse von AATPOs

Der identifizierte Odontella-cDNA-Klon mit einer Länge von 1591 bp kodiert für ein Polypeptid, das aus 470 Aminosäuren besteht (AATPOs; ATP/ADP-Transportprotein aus Odontella sinensis). Die Sequenzanalyse zeigt, dass es sich bei diesem cDNA-Klon um eine am 5´-Ende verkürzte Teilsequenz eines putativen nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporters handelt. Demnach ist bei der AATPOs-Proteinsequenz der N-Terminus und damit das Start-Methionin unbekannt. Das Stoppkodon, dass die Translation des offenen Leserasters beendet, wird an Position 1411-1413 bp angenommen (Abb. 7.23).

```
   1 - GGCCTTATGTTTTTCTGTATTCTGTTTAGTTATACAATCCTTCGAGATACAAAAGATGTT
        G  L  M  F  F  C  I  L  F  S  Y  T  I  L  R  D  T  K  D  V  -  20
  61 - CTGATGATTACAGCACCAAAGAGTGGTGCTGAGGTCATTCCATTCATCAAGACTTACGTT
        L  M  I  T  A  P  K  S  G  A  E  V  I  P  F  I  K  T  Y  V  -  40
 121 - AATCTTCCAACTGCCATTGGATTCACTGCTGTTTATTCAAAACTTTGTGACAAGCTGGAT
        N  L  P  T  A  I  G  F  T  A  V  Y  S  K  L  C  D  K  L  D  -  60
 181 - CAAAAGAACGTCTTCTACGCCTGCACGGTTCCTTTCCTCCTGTTTTTTGCCCTTTTTGCC
        Q  K  N  V  F  Y  A  C  T  V  P  F  L  L  F  F  A  L  F  A  -  80
 241 - ACATCTATCTATCCAAACATTGGATTTCTCCATCCTCATGCATTTGTTGACGCAATTGCT
        T  S  I  Y  P  N  I  G  F  L  H  P  H  A  F  V  D  A  I  A  - 100
 301 - AGTCATTTGCCTGCGGGGTTTTCAGCTCCTCTGGCTATTGTCAGGAACTGGAGTTACGCA
        S  H  L  P  A  G  F  S  A  P  L  A  I  V  R  N  W  S  Y  A  - 120
 361 - ATATTTTATGTCATGGCTGAGATGTGGGGATCTGTTGTTACATCTCTCCTCTTCTGGGGC
        I  F  Y  V  M  A  E  M  W  G  S  V  V  T  S  L  L  F  W  G  - 140
 421 - TTTGCCAATGAAGTCACTACAGTTGATGAGGCAAAAAAAATACTATCCTCTTTTTGGTATG
        F  A  N  E  V  T  T  V  D  E  A  K  K  Y  Y  P  L  F  G  M  - 160
 481 - GGGGCAAATGTTGCTCTGATATTTTCTGGGCAGTATGTGAAATGGGTATCAATGATGAGG
        G  A  N  V  A  L  I  F  S  G  Q  Y  V  K  W  V  S  M  M  R  - 180
 541 - GAAAATCTTGCCCCTGGGATTGATCCATGGGGTGTTTCTCTGAAATACCTCATGGGGGCT
        E  N  L  A  P  G  I  D  P  W  G  V  S  L  K  Y  L  M  G  A  - 200
 601 - GTGGTGGCATCTGGAGGGCTTATGTTGAGCACTTTTGCTTGGATGCAGAAAAATGTGTTG
        V  V  A  S  G  G  L  M  L  S  T  F  A  W  M  Q  K  N  V  L  - 220
 661 - ACTGACCCAAATTGTGTTGACCAAGAGAAAAGAGCTCAGAAGCAAAAGAAGAAGAGGGTT
        T  D  P  N  C  V  D  Q  E  K  R  A  Q  K  Q  K  K  K  R  V  - 240
 721 - AAGATGGGTCTTCGAGAGTCAGCTAAATTTCTTATGAAATCACCTTACATCAGGGATCTT
        K  M  G  L  R  E  S  A  K  F  L  M  K  S  P  Y  I  R  D  L  - 260
 781 - GCCACTCTAGTCATCAGTTACGGAATGTGCATCAATATTGTGGAGGTATCTTGGAAGGCC
        A  T  L  V  I  S  Y  G  M  C  I  N  I  V  E  V  S  W  K  A  - 280
```

```
 841 - AAACTCAAGCAAGCATATCCTGATCCTAATGCTTACTCCAGTTTCATGGGGAACTTTTCT
        K  L  K  Q  A  Y  P  D  P  N  A  Y  S  S  F  M  G  N  F  S  - 300
 901 - TCGGCAACTGGCGCTGTAACTCTTGTCATGATGCTTCTGGGGAGATCAATTTTCCAGAAA
        S  A  T  G  A  V  T  L  V  M  M  L  L  G  R  S  I  F  Q  K  - 320
 961 - TTTGGTTGGCGAAAAGCTGCACTTGTCACCCCAACAATGATTGGGGTTACGGGTCTAGGT
        F  G  W  R  K  A  A  L  V  T  P  T  M  I  G  V  T  G  L  G  - 340
1021 - TTCTTCGCCCTTAATATTTTTGCACCAACATTTGTCCCAGTGGCTGCTGCCCTGGGAACC
        F  F  A  L  N  I  F  A  P  T  F  V  P  V  A  A  A  L  G  T  - 360
1081 - ACACCTCTCATGTTGGCTGTTCTTGTGGGGGCTGCGCAAAATATTTTGAGCAAGAGTTCG
        T  P  L  M  L  A  V  L  V  G  A  A  Q  N  I  L  S  K  S  S  - 380
1141 - AAATACTCTTTGTTTGATCCCTGCAAGGAAATGGCATATATCCCTCTGGACCAAGACTCA
        K  Y  S  L  F  D  P  C  K  E  M  A  Y  I  P  L  D  Q  D  S  - 400
1201 - AAAACTAAAGGGAAAGCAGCTGTGGATGTCATTGGAAATCCTCTGGGAAAGAGTGGAGGG
        K  T  K  G  K  A  A  V  D  V  I  G  N  P  L  G  K  S  G  G  - 420
1261 - TCCTTGATACAGCAGGCACTGATTTTTGGAGTTGGGAGCCTTGCTGTTGCAACACCTTAT
        S  L  I  Q  Q  A  L  I  F  G  V  G  S  L  A  V  A  T  P  Y  - 440
1321 - CTTGCGGCAATTCTGGGTGTGCTAATTTTCTTCTGGTTCAAAGCTGCAAATTCTCTGGCG
        L  A  A  I  L  G  V  L  I  F  F  W  F  K  A  A  N  S  L  A  - 460
1381 - GGCCAGTTTGAAGAAGCAATGGAGATGGAATAAAGATGGGATGATCAAATTATTAGATTT
        G  Q  F  E  E  A  M  E  M  E  *
1441 - CATTGATGGGGAACGAATAATGTGGAGCTTACAATAATTTCTCCACTGACAATAGTAAAT

1501 - TACAGTCTTTAATGGAAGAATTTACTTAGCCATAATTTCTCTCAGCGTTTTCAAAAAAAA

1561 - AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
```

Abb. 7.23: Teilsequenz des AATPOs-cDNA mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben. Das Stoppkodon der Translation ist fett gedruckt und unterstrichen.

7.2.11 DNA-Sequenzanalyse von AATPOsa

Die cDNA-Sequenz des EST-Klons AU057209 (Abb. 7.24) besitzt eine Länge von 462 bp. Die abgeleitete Aminosäuresequenz kodiert für ein Polypeptid bestehend aus 154 Aminosäuren, das aufgrund der hohen Ähnlichkeiten den nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern zugeordnet wird (AATPOsa, putativer ATP/ADP-Transportprotein aus Oryza sativa). Aufgrund der unvollständigen Sequenzinformation ist der N- und C-terminale Bereich des AATP1Osa-Proteins nicht bekannt.

```
   1 - GTAATTCTTAGGAAGTTTGGGTGGGGAGTCGCAGCTACAATCACCCCTGCAGTGTTGCTT
        V  I  L  R  K  F  G  W  G  V  A  A  T  I  T  P  A  V  L  L  -  20
  61 - CTCACTGGAGTTGGATTCTTCTCACTGATTTTATTCGGTGAGCCATTGACTCCTCTTATG
        L  T  G  V  G  F  F  S  L  I  L  F  G  E  P  L  T  P  L  M  -  40
 121 - GCCACACTTGGAATGACACCTTTGCTTGCTGCGGTCTATGTTGGGGCAATGCAGAACATT
        A  T  L  G  M  T  P  L  L  A  A  V  Y  V  G  A  M  Q  N  I  -  60
 181 - TTCAGTAAGAGTGCGAAGTACAGTTTGTTTGACCCTTGTAAGGAAATGGCATACATTCCT
        F  S  K  S  A  K  Y  S  L  F  D  P  C  K  E  M  A  Y  I  P  -  80
 241 - TTGGACGAGGACATGAAGGTCAAAGGTAAGGCAGCAATTGATGTGGTCTGCAACCCATTG
        L  D  E  D  M  K  V  K  G  K  A  A  I  D  V  V  C  N  P  L  - 100
 301 - GGGAAGTCTGGAGGCGCCTTGATCCAGCAGTTCATGATCTTATCATTTGGATCTCTCGCA
        G  K  S  G  G  A  L  I  Q  Q  F  M  I  L  S  F  G  S  L  A  - 120
 361 - AATTCTACACCCTACCTGGGAGGAATTCTATTGGTAATTGTTCTTGCCTGGTTGGGTGCT
        N  S  T  P  Y  L  G  G  I  L  L  V  I  V  L  A  W  L  G  A  - 140
 421 - GTAAGGTCCCTTGACTCACAGTTCTCCCCACTGGCAAAGCAA
        V  R  S  L  D  S  Q  F  S  P  L  A  K  Q                    - 154
```

Abb. 7.24: Teilsequenz des AATPOs-EST-Klons AU057209 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben.

7.2.12 DNA-Sequenzanalyse von AATP1Py

Die EST-Klone AV430292 kodiert für ein putatives ATP/ADP-Transportprotein aus Porphyra yezoensis (AATP1Py). Die Nukleotidsequenz besitzt eine Basenpaarlänge von 640. Die daraus abgeleitete Proteinsequenz enthält 220 Aminosäuren (Abb. 7.25).

```
  1 - GTGGTGACCTCGATGGCGGCCAGTGCCAATGGCGCAGCGGCTGCGGGGGCGCCGAATCGG
       V  V  T  S  M  A  A  S  A  N  G  A  A  A  A  G  A  P  N  R  -  20
 61 - TCCATTGGGCAGAAGCTGAAGGACATGATCCCGACGCCGCAGGAGCGGAAAAAGCTGGGG
       S  I  G  Q  K  L  K  D  M  I  P  T  P  Q  E  R  K  K  L  G  -  40
121 - CCGCTTGCACTCATGTTTTTTGTTATCCTCTTCAACTACACGATCCTTCGTGACACCAAG
       P  L  A  L  M  F  F  V  I  L  F  N  Y  T  I  L  R  D  T  K  -  60
181 - GACGTGCTGGTCGTGACGGCGGCGGGGCGCGGAGGTCATCCCCTTTCTCAAGACGTACTGC
       D  V  L  V  V  T  A  A  G  A  E  V  I  P  F  L  K  T  Y  C  -  80
241 - AATCTCCCTGGTGCCGTCCTGTTTACCGTCCTCTACTCCAAGCTGAACAACTCCCTTACC
       N  L  P  G  A  V  L  F  T  V  L  Y  S  K  L  N  N  S  L  T  - 100
301 - CGTGAGCAGGTGTTTTACGTCTGCATCATCCCCTTCATCCTCTTCTTTTTGGCGTTCGGG
       R  E  Q  V  F  Y  V  C  I  I  P  F  I  L  F  F  L  A  F  G  - 120
361 - TTTATCATCTACCCGAACACGGCGGCACTGCACCCGGTCGTCTGGTCTGCGTGGGCGGCC
       F  I  I  Y  P  N  T  A  A  L  H  P  V  V  W  S  A  W  A  A  - 140
421 - ACCAAGCTGCCTGCCTCGTTTGCTCCGCTACTGTCCATCGTCCGCAACTGGACGTTTGCG
       T  K  L  P  A  S  F  A  P  L  L  S  I  V  R  N  W  T  F  A  - 160
481 - CTCTTCTACACCCTAGCCGAATTGTGGGGCTCGGTTGTGGTGTCGGTGCTCTTCTGGGGC
       L  F  Y  T  L  A  E  L  W  G  S  V  V  V  S  V  L  F  W  G  - 180
521 - TTTGCGAATGAAGTCACCACTGTCGACGAAGCCAAGAAGTACTATCCTCTCTTTGGGCTC
       F  A  N  E  V  T  T  V  D  E  A  K  K  Y  Y  P  L  F  G  L  - 200
581 - GGTGCCAACGTAGCCCTTGTCTTCTCTGGGCAGTACGTGAGGTACGTATCAGACATTCGT
       G  A  N  V  A  L  V  F  S  G  Q  Y  V  R  Y  V  S  D  I  R  - 220
```

Abb. 7.25: Teilsequenz des AATPPy-EST-cDNA-Klon AV430292 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben.

7.2.13 DNA-Sequenzanalyse von AATP1Sh

Der EST-Klon BE574942 kodiert für ein putatives ATP/ADP-Transportprotein aus Soja hispida (AATP1Sh). Die innerhalb des EST-Projekts ansequenzierte cDNA-Sequenz besitzt eine Länge von 996 bp, deren abgeleitete Proteinsequenz besteht aus 321 Aminosäuren. Aufgrund der unvollständigen Sequenzinformationen der EST-cDNA ist sowohl der N- als auch der C-terminale Bereich des AATP1Tv-Proteins nicht bekannt (Abb. 7.26).

```
  1 - ACTAAGTTGGCTAATGTTTTGTCGAAAGATGCACTTTTCTACACTGTTATGTTGCCATTC
       T  K  L  A  N  V  L  S  K  D  A  L  F  Y  T  V  M  L  P  F  -  20
 61 - ATTGCGTTTTTTGGGGCATTTGGGTTTGTGCTTTATCCTCTCAGTAATTTTTTCCACCCC
       I  A  F  F  G  A  F  G  F  V  L  Y  P  L  S  N  F  F  H  P  -  40
121 - ACTGCGCTTGCTGATAAGCTTTTGAACGTGTTGGGTCCGAGGTTTCTTGGACCACTTGCT
       T  A  L  A  D  K  L  L  N  V  L  G  P  R  F  L  G  P  L  A  -  60
181 - ATTTTGAGGATTTGGAGCTTTTGTTTGTTCTATGTTATGGCTGAGCTTTGGGGCAGTGTG
       I  L  R  I  W  S  F  C  L  F  Y  V  M  A  E  L  W  G  S  V  -  80
```

```
241 - GTTGTTTCTGTTTTGTTTTGGGGGTTTGCAAATCAGATAACCACAATCGACGAAGCCAAG
       V  V  S  V  L  F  W  G  F  A  N  Q  I  T  T  I  D  E  A  K  - 100
301 - AAATTCTATCCTCTTTTCGGCCTCGGAGCAAATGTAGCACTCATTTTCTCGGGTCGGACT
       K  F  Y  P  L  F  G  L  G  A  N  V  A  L  I  F  S  G  R  T  - 120
361 - GTGAAATACTTTTCCCAAATGAGGCAAAATTTGGGCCCCGGTGTTGATGGTTGGGCCATC
       V  K  Y  F  S  Q  M  R  Q  N  L  G  P  G  V  D  G  W  A  I  - 140
421 - TCGTTGAAGGGAATGATGAGTATTGTAGTGGGGATGGGCCTTATGATTTGGTTCCTATAT
       S  L  K  G  M  M  S  I  V  V  G  M  G  L  M  I  W  F  L  Y  - 160
481 - TGGTGGGTAAACAATTATGTTCCTCTTCCGACCCGTAGTATGAAGAAGAAGGAGAAGCCG
       W  W  V  N  N  Y  V  P  L  P  T  R  S  M  K  K  K  E  K  P  - 180
541 - AAAATGGGAACGATGGAGAGCTTAAAGTTCTTGGTATCAAAGAAATATATTAGAGATTTG
       K  M  G  T  M  E  S  L  K  F  L  V  S  K  K  Y  I  R  D  L  - 200
601 - GCCACTTTGGTTGTGGCATATGGCATTAGCATTAACCTGGTCGAGGTTACATGGAAATCA
       A  T  L  V  V  A  Y  G  I  S  I  N  L  V  E  V  T  W  K  S  - 220
661 - AAGCTCAAAGCTCAGTTCCCAACGCCGAACGAGTATTCTGCCTTCATGGGTGACTTTTCA
       K  L  K  A  Q  F  P  T  P  N  E  Y  S  A  F  M  G  D  F  S  - 240
721 - ACTACTACCGGAATAGCAACTTTCATAATGATGCTTTTGAGTCAATGGATATTCAACAAA
       T  T  T  G  I  A  T  F  I  M  M  L  L  S  Q  W  I  F  N  K  - 260
781 - TACGGTTGGGGAATGGCAGCCAAGATTACGCCGACCGTCCTGCTAATCACTGGGATTGGC
       Y  G  W  G  M  A  A  K  I  T  P  T  V  L  L  I  T  G  I  G  - 280
841 - TTCTTCTCGTTGATTCTTTTCGGTGACCCTTTTGCCCCTGCTCTCGCCGGCTTCGGAATG
       F  F  S  L  I  L  F  G  D  P  F  A  P  A  L  A  G  F  G  M  - 300
901 - ACTCCTCTATTAGCAGCTGTCTATGTTGGGGCGATGCAAAACATTTTTAGTAAGAGCGCA
       T  P  L  L  A  A  V  Y  V  G  A  M  Q  N  I  F  S  K  S  A  - 320
961 - AAGT
       K                                                            - 321
```

Abb. 7.26: Teilsequenz des AATPTv-EST-Klon BE574942 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben.

7.2.14 DNA-Sequenzanalyse von AATPSb

Der zu den nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern homologe EST-Klon H55010 aus Sorghum bicolor ist 996 bp lang und kodiert für ein Protein mit 310 Aminosäuren (AATPSb). Die cDNA des EST-Klons stellt nur eine Teilsequenz des vollständigen kodierenden AATPSb-Proteins dar. So fehlen die Sequenzinformationen für das 5´- und 3´-Ende (Abb. 7.27).

```
  1 - CTGTTTGGGCTTGGTGCCAATGTGGCCCTCATCTTCTCTGGGCGCACGGTGAAATATTTC
       L  F  G  L  G  A  N  V  A  L  I  F  S  G  R  T  V  K  Y  F  -  20
 61 - TCAAACATGAGGAAGAATTTGGGTCCTGGAGTGGATGGTTGGGCAATTTCGTTGAAGGCC
       S  N  M  R  K  N  L  G  P  G  V  D  G  W  A  I  S  L  K  A  -  40
121 - ATGATGAGCATAGTGGTTGTACTGGGTCTTATCATCACCGGTATCTATTGGGGGGTGAAC
       M  M  S  I  V  V  V  L  G  L  I  I  T  G  I  Y  W  G  V  N  -  60
181 - AAGTTTGTTATTGATAACTCATCTATGCCCGTGGTCGAGCGGAAAAAGAAGGACAAGCCA
       K  F  V  I  D  N  S  S  M  P  V  V  E  R  K  K  K  D  K  P  -  80
241 - AAGCTCAGCATGGGTGAGAGCATGAAGGTTCTGTTGTCATCTCGGTATGTGAGGGATCTT
       K  L  S  M  G  E  S  M  K  V  L  L  S  S  R  Y  V  R  D  L  - 100
301 - GCCACATTGGTCGTTGCTTATGGAATAAGCATTAACCTTGTGGAGGTGACATGGAAATCA
       A  T  L  V  V  A  Y  G  I  S  I  N  L  V  E  V  T  W  K  S  - 120
361 - AAATTGAAAGCACAGTTCCCAAGCCCAAATGAATATTCTTCATTCATGGGCGATTTCTCA
       K  L  K  A  Q  F  P  S  P  N  E  Y  S  S  F  M  G  D  F  S  - 140
421 - ACTGCCACCGGCATAGCTACCTTTACAATGATGTTGTTAGGGAGAGTAATCCTCAGAAAG
       T  A  T  G  I  A  T  F  T  M  M  L  L  G  R  V  I  L  R  K  - 160
481 - TTCGGGTGGGGAGTTGCAGCTACGATCACACCTGCAGTGTTACTTCTCACAGGAGTTGGG
       F  G  W  G  V  A  A  T  I  T  P  A  V  L  L  L  T  G  V  G  - 180
541 - TTCTTCTCACTGATTTTGTTTGGTGAGCCATTGACTCCTCTTATGACCAAGTTTGGGATG
       F  F  S  L  I  L  F  G  E  P  L  T  P  L  M  T  K  F  G  M  - 200
601 - ACACCTTTGCTTGCGGCAGTCTATGTTGGAGCAATGCAGAACATTTTCAGTAAGAGTGCA
       T  P  L  L  A  A  V  Y  V  G  A  M  Q  N  I  F  S  K  S  A  - 220
```

```
661 - AAGTACAGTCTGTTTGATCCTTGCAAAGAGATGGCATACATTCCTTTGGATGAGGATATG
       K  Y  S  L  F  D  P  C  K  E  M  A  Y  I  P  L  D  E  D  M  - 240
721 - AAGGTTAAAGGTAAAGCAGCTATTGACGTTGTCTGCAACCCCTTGGGGAAATCTGGAGGT
       K  V  K  G  K  A  A  I  D  V  V  C  N  P  L  G  K  S  G  G  - 260
781 - GCTTTGATCCAGCAGTTCATGATCCTGTCATTTGGATCTCTTGCGAATTCGACACCCTAC
       A  L  I  Q  Q  F  M  I  L  S  F  G  S  L  A  N  S  T  P  Y  - 280
841 - CTTGGTGGAATACTTCTGGTGATTGTTCTTGCATGGCTGGGTGCTGTAAGGTCCCTCGAC
       L  G  G  I  L  L  V  I  V  L  A  W  L  G  A  V  R  S  L  D  - 300
901 - TCACAGTTTTCAACCCTGGCAAAGCAAGAT
       S  Q  F  S  T  L  A  K  Q  D                                 - 310
```

Abb. 7.27: Teilsequenz des AATPSb-EST-Klons H55010 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben.

7.2.15 DNA-Sequenzanalyse von AATP1Ta

Die cDNA-Sequenz des EST-Klons BE574942 besitzt eine Länge von 1423 bp, deren Aminosäuresequenz kodiert für ein Polypeptid bestehend aus 373 Aminosäuren, das aufgrund der hohen Ähnlichkeiten den nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transportern zugeordnet wird (AATP1Ta, putativer ATP/ADP-Transportprotein aus Triticum aestivum). Dieser cDNA-Abschnitt enthält nur eine Teilsequenz des vollständigen kodierenden Bereiches. So fehlen die Nukleotidsequenzen für den kodierenden 5´-terminalen Abschnitt (Abb. 7.28). Dagegen ist die Sequenzinformation für das 3´-Ende bekannt. Das Stoppkodon der Translation kann an der Position 121-123 bp angenommen werden.

```
   1 - CTACCCTCTATTTGGCCTTGGGGCAAATATTGCCCTTATCTTTTCTGGGCGTACTGTGAA
        Y  P  L  F  G  L  G  A  N  I  A  L  I  F  S  G  R  T  V  K  -  20
  61 - GTATTTCTCAAATTTGCGGAAGACAATGGGTCCAGGAGTTGATGGTTGGGAGGTATCTTT
        Y  F  S  N  L  R  K  T  M  G  P  G  V  D  G  W  E  V  S  L  -  40
 121 - GAAAGGAATGATGGGCATAGTGGTACTTCTTGGGCTTGTCATTACTTCCATCTATTGGGG
        K  G  M  M  G  I  V  V  L  L  G  L  V  I  T  S  I  Y  W  G  -  60
 181 - AGTGAACAAACTTGTGTTGAATGATCCTTCTCTTCCAAAATCTGACCACAAGAAGAAAAA
        V  N  K  L  V  L  N  D  P  S  L  P  K  S  D  H  K  K  K  K  -  80
 241 - GAACAAACCTAAGCTTAGCATGAAAGAGAGTATGAAAGTTCTGATCTCTTCAAAATATGT
        N  K  P  K  L  S  M  K  E  S  M  K  V  L  I  S  S  K  Y  V  - 100
 301 - GAGGGACCTTGCTACCTTAGTTGTTGCATATGGCATTAGTATCAATCTTGTGGAAGTCAC
        R  D  L  A  T  L  V  V  A  Y  G  I  S  I  N  L  V  E  V  T  - 120
 361 - ATGGAAATCGAAGCTCAAGGCACAGTTCCCCAGTCCAAACGAGTACTCATCTTTCATGGT
        W  K  S  K  L  K  A  Q  F  P  S  P  N  E  Y  S  S  F  M  G  - 140
 421 - GATTTCTCTACCGCAACTGGAATTGCAACTTTCACAATGATGCTGTTAGGTCGGATTATA
        D  F  S  T  A  T  G  I  A  T  F  T  M  M  L  L  G  R  I  I  - 160
 481 - TTCCAAAGATTTGGCTGGGGAGTGGCTGCCATGATCACCCCCACAGTTTTGTTGCTGACT
        F  Q  R  F  G  W  G  V  A  A  M  I  T  P  T  V  L  L  L  T  - 180
 541 - GGCGTTGGTTTCTTCTCTCTGCTTCTGTTTGGTGAGCCACTCACTCCTCTTCTAGCCACG
        G  V  G  F  F  S  L  L  L  F  G  E  P  L  T  P  L  L  A  T  - 200
 601 - TTTGGGATGACGCCTTTGCTTGCTGCGGTCTTCGTTGGGGCACTACAGAACATTTTCAGT
        F  G  M  T  P  L  L  A  A  V  F  V  G  A  L  Q  N  I  F  S  - 220
 661 - AAGAGTGCAAAGTACAGTTTGTTCGATCCTTGCAAAGAAATGGCGTACATTCCTTTGGAC
        K  S  A  K  Y  S  L  F  D  P  C  K  E  M  A  Y  I  P  L  D  - 240
 721 - GAGGACATGAAGGTCAAAGGTAAGGCAGCAATAGATGTGGTATGCAACCCATTGGGAAAA
        E  D  M  K  V  K  G  K  A  A  I  D  V  V  C  N  P  L  G  K  - 260
 781 - TCTGGAGGTGCCCTGATCCAGCAGTTCATGATCTTGTCATTTGGGTCTCTTGCTAACTCA
        S  G  G  A  L  I  Q  Q  F  M  I  L  S  F  G  S  L  A  N  S  - 280
 841 - ACGCCGTACCTTGGAGGAATATTGCTGGTGATTGTCATCGCGTGGTTGGGCGCCGTAAGG
        T  P  Y  L  G  G  I  L  L  V  I  V  I  A  W  L  G  A  V  R  - 300
 901 - TCCCTCGACTCGCAGTTCTCTCCCCTGGCAAAGCAAGACCTGGAGAGGGAACAACAACTG
        S  L  D  S  Q  F  S  P  L  A  K  Q  D  L  E  R  E  Q  Q  L  - 320
```

```
 961 – AAAGCAGAGGCGGTAGAAACGACAGCTCAAGTCGTCGGGACAGGAAACGGCTCTCTTCAA
        K  A  E  A  V  E  T  T  A  Q  V  V  G  T  G  N  G  S  L  Q  – 340
1021 – GAAAATGTTGCCAGCCAGAACTCCACGAACGGTACAGTCATCAAACAATCGCAAGAACCC
        E  N  V  A  S  Q  N  S  T  N  G  T  V  I  K  Q  S  Q  E  P  – 360
1081 – AAGATCACTGCCCCTGAAAAATCTGGCAAGCAGTCTCAATAAGTTTCCGCCCCCAGAAAT
        K  I  T  A  P  E  K  S  G  K  Q  S  Q  *                    – 373
1141 – TTAGTTAGTACAAGTTTTTGATGGAACCAAATGTTGCTTGGTTGGGCCTGCCGCCATGGG

1201 – GAGCTGCTGGGAAAGGCAGTAGTGATTGATAAGAAAAATAAGATGGCCTATTCTTCTGTT

1261 – GTTGTAGCATATTTTTGACTTCATGCGAGTATCTATAGCTGTTTACTGGGAGTATCTGTA

1321 – GCTGTTTGGTTTGTGGCTCCGTAGATATGGAACTATTTTTTTTGATTTTTTTATATTACA

1381 – ATTTTGCGGAAAATCTGCTTTCACAGATCTATTAGTCCATGCTCAAAAAAAAAAAAAAGA

1421 – AAA
```

Abb. 7.28: Teilsequenz des AATPTa-EST-Klon BE574942 mit abgeleiteter Aminosäuresequenz. Die Nukleotidpositionen sind links, die Aminosäurepositionen rechts angegeben. Das Stoppkodon der Translation ist fett gedruckt und unterstrichen.

7.3 EMBL-„Accession“-Nummern der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter

Die vollständigen Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen der nicht-mitochondrialen Nukleotid-Transporter aus Bakterien und Pflanzen sind in der EMBL-Datenbank (European Molekular Biology Laboratory in Heidelberg; http://www.ebi.ac./embl) hinterlegt und unter den jeweiligen Zugangsnummern („Accession“-Nummern) eingetragen (Tab. 7.2).

Tab. 7.3: EMBL-Accession-Nummern nicht-mitochondrialer Nukleotid-Transporter

Abkürzung	Organismus	EMBL-Acc.-Nr.
AATP1At	Arabidopsis thaliana	Z49227.2
AATP2At	Arabidopsis thaliana	XC94626
AATP1St	Solanum tuberosum	Y10821
AATP1Gs	Galderia sulphuraria	AJ251356
NPT1Ct	Chlamydia trachomatis	AJ010586
NPT2Ct	Chlamydia trachomatis	AJ010587
TLC1Rp	Rickettsia prowazekii	M28816

7.4 EMBL-„Accession“-Nummern der mitochondrialen MCF-Transporter

Die Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen der in dieser Doktorarbeit beschriebenen MCF-Transporter sind unter den folgenden „Accession“-Nummern in der EMBL-Datenbank (European Molekular Biology Laboratory in Heidelberg; http://www.ebi.ac./embl) hinterlegt (Tab. 7.4).

Tab. 7.4: EMBL-Accession-Nummern der MCF-Transporter

Name	Organismus	EMBL-Acc.-Nr.
ADP/ATP-Carrier ANT2At	Arabidopsis thaliana	X68592
ADP/ATP-Carrier ANT1La	Luoinus albus	AJ003197
ADP/ATP-Carrier ANT1Os	Oryza sativa	D12637
ADP/ATP-Carrier ANT1St	Solanum tuberosum	X62123
ADP/ATP-Carrier ANT1Ta	Triticum aestivum	X95863
ADP/ATP-Carrier ANT2Ta	Triticum aestivum	X95864
ADP/ATP-Carrier ANTCr	Chlamydomonas reinhardtii	X65194
ADP/ATP-Carrier ANTCk	Chlorella kessleri	M76669
ADP/ATP-Carrier ANTDd	Dictyostelium discoideum	AF100676
ADP/ATP-Carrier ANT1Sc	Saccharomyces cerevisae	M12514
ADP/ATP-Carrier ANT2Sc	Saccharomyces cerevisae	X77291
ADP/ATP-Carrier ANT3Sc	Saccharomyces cerevisae	M34076
ADP/ATP-Carrier ANTSp	Schizosaccharomyces pombe	Z49974
ADP/ATP-Carrier ANT1Ce	Caenorhabditis elegans	Z82059
ADP/ATP-Carrier ANT1Nc	Neurospora crassa	X00363
ADP/ATP-Carrier ANT1Hr	Halocynthia roretzi	D83069
ADP/ATP-Carrier ANT1Dm	Drosophila melanogasta	S43651
ADP/ATP-Carrier ANT1Hs	Homo sapiens	J02966
ADP/ATP-Carrier ANT2Hs	Homo sapiens	M57424
ADP/ATP-Carrier ANT3Hs	Homo sapiens	J03592
„Graeve disease associated protein“	Rattus norwegicus	M32973
„Graeve disease associated protein“	Homo sapiens	M31659
2-Oxoglutarat/Malat-Transporter	Bos taurus	X66115
2-Oxoglutarat/Malat-Transporter	Homo sapiens	X66114

Name	Organismus	EMBL-Acc.-Nr.
Phosphat-Transporter	Saccharomyces cerevisiae	M54879
Phosphat-Transporter	Homo sapiens	X60036
Entkoppler-Protein	Rattus norwegicus	M11814
Entkoppler-Protein	Bos taurus	X14064
Entkoppler-Protein	Homo sapiens	U76367

7.5 Anteil identischer und ähnlicher Aminosäuren in den Proteinsequenzen der nicht-mitochondrialen Nukleotidtransporter aus Eu- und Prokaryoten

Aus einem multiplen Aminosäuresequenz-Vergleich (Kapitel 3.4) kann der Verwandschaftsgrad der miteinander verglichenen Proteine durch die Ermittlung der identischen und ähnlichen Sequenzpositionen im Alignment bestimmt werden. Die Berechnung der Ähnlichkeiten erfolgte mit dem GENEDOC-Programm nach der BLOSUM-62-Matrix (Kapitel 2.4.5).

Tab. 7.5: Anteil identischer und ähnlicher Aminosäuren in den Proteinsequenzen verschiedener Nukleotidtransporter aus niederen und höheren Pflanzen. Die Werte für die Identität bzw. Ähnlichkeit sind in Prozent angegeben, wobei die Angaben für die Ähnlichkeiten in Klammern dargestellt sind.

	AATP1At	AATP2At	AATP1Bn	AATP1St	AATP1Le	AATP1Mc	AATP1Tv	AATP1Mp	AATP1Zm	AATP1Sb	AATP1Ta	AATP1Hv	AATP1Cp	AATP1Cr	AATP1Ds	AATP1Gs	AATP1Os
AATP1At	-	96	99	88	52	52	64	88	81	71	71	40	49	68	38	60	59
	-	(98)	(99)	(94)	(56)	(57)	(68)	(93)	(89)	(79)	(77)	(45)	(61)	(79)	(45)	(75)	(76)
AATP2At		-	96	88	52	52	64	87	81	71	70	40	50	68	38	59	59
		-	(98)	(94)	(55)	(56)	(67)	(93)	(89)	(79)	(78)	(46)	(60)	(80)	(45)	(75)	(76)
AATP1Bn			-	88	52	52	64	87	81	72	71	41	50	68	38	60	59
			-	(94)	(56)	(57)	(68)	(93)	(89)	(79)	(77)	(45)	(61)	(79)	(45)	(75)	(76)
AATP1St				-	58	53	63	89	82	72	72	41	48	69	40	58	58
				-	(58)	(57)	(66)	(94)	(89)	(79)	(79)	(46)	(59)	(81)	(46)	(74)	(76)
AATP1Le					-	89	27	53	51	58	57	29	25	42	68	37	35
					-	(95)	(29)	(56)	(54)	(61)	(60)	(31)	(30)	(51)	(78)	(45)	(45)
AATP1Mc						-	26	52	51	58	57	29	26	42	66	39	34
						-	(30)	(56)	(54)	(61)	(61)	(32)	(30)	(51)	(77)	(45)	(46)
AATP1Sh							-	64	55	46	45	54	50	48	17	40	40
							-	(67)	(63)	(53)	(52)	(63)	(63)	(57)	(21)	(51)	(53)
AATP1Mp								-	81	71	71	39	47	68	39	59	59
								-	(88)	(78)	(78)	(46)	(58)	(81)	(45)	(75)	(76)
AATP1Zm									-	81	81	81	81	81	81	81	81
									-	(88)	(88)	(88)	(88)	(88)	(88)	(88)	(88)
AATP1Sb										-	86	51	40	59	44	52	49
										-	(94)	(58)	(52)	(73)	(51)	(64)	(65)
AATP1Ta											-	81	81	81	81	81	81
											-	(88)	(88)	(88)	(88)	(88)	(88)
AATP1Hv												-	37	35	19	30	29
												-	(88)	(43)	(25)	(38)	(40)
AATP1Cp													-	47	21	48	47
													-	(61)	(26)	(60)	(61)
AATP1Cr														-	42	61	61
														-	(48)	(77)	(75)
AATP1Ds															-	35	35
															-	(42)	(42)
AATP1Gs																-	69
																-	(83)
AATP1Os																	-
																	-

Tab. 7.5: Anteil identischer und ähnlicher Aminosäuren in den Proteinsequenzen verschiedener nicht-mitochondrialer Nukleotidtransporter aus Eubakterien. Die Werte für die Identität bzw. Ähnlichkeit sind in Prozent angegeben, wobei die Angaben für die Ähnlichkeiten in Klammern dargestellt sind.

	TLC1Rp	TLC2Rp	TLC3Rp	TLC4Rp	TLC5Rp	NPTPbtb	NPTHo	NPTC36	NPTCc	NPTET39	NPTHN3	NPT1Ct	NPT2Ct	NPTTUME1
TLC1Rp	-	34	38	32	33	87	31	34	60	40	41	41	40	40
	-	(59)	(58)	(58)	(58)	(93)	(52)	(54)	(77)	(61)	(61)	(59)	(63)	(63)
TLC2Rp		-	31	29	29	32	24	29	32	31	30	31	24	30
		-	(59)	(60)	(61)	(57)	(49)	(54)	(57)	(56)	(56)	(56)	(51)	(54)
TLC3Rp			-	36	33	36	32	33	39	35	35	34	32	36
			-	(63)	(60)	(56)	(49)	(51)	(60)	(57)	(57)	(58)	(48)	(56)
TLC4Rp				-	31	33	31	30	37	33	33	33	23	33
				-	(55)	(58)	(50)	(53)	(59)	(58)	(57)	(57)	(44)	(55)
TLC5Rp					-	34	24	27	39	31	29	29	20	27
					-	(58)	(46)	(51)	(60)	(53)	(52)	(54)	(45)	(54)
NPTPbtb						-	31	33	62	41	41	39	22	41
						-	(53)	(54)	(78)	(59)	(60)	(59)	(47)	(59)
NPTHo							-	28	31	37	40	37	25	39
							-	(49)	(52)	(57)	(59)	(58)	(43)	(61)
NPTC36								-	35	33	32	33	20	33
								-	(53)	(54)	(51)	(54)	(42)	(53)
NPTCc									-	46	40	40	23	41
									-	(62)	(60)	(60)	(47)	(60)
NPTET39										-	50	49	26	53
										-	(69)	(72)	(51)	(74)
NPTHN3											-	51	28	54
											-	(71)	(52)	(70)
NPT1Ct												-	30	59
												-	(53)	(79)
NPT2Ct													-	31
													-	(54)
NPTTUME1														-
														-

Tab. 7.6: Anteil identischer und ähnlicher Aminosäuren in den Proteinsequenzen verschiedener nicht-mitochondrialer Nukleotidtransporter aus Pro- und Eukaryoten. Die Werte für die Identität bzw. Ähnlichkeit sind in Prozent angegeben, wobei die Angaben für die Ähnlichkeiten in Klammern dargestellt sind.

	AATP1At	AATP2At	AATP1St	AATP1Zm	AATPGs	TLC1Rp	NPTHo	NPT1Ct	NPT2Ct
AATP1At	-	84	81	61	53	35	34	47	29
	-	(87)	(88)	(70)	(69)	(53)	(53)	(65)	(50)
AATP2At		-	75	61	53	37	36	47	29
		-	(81)	(70)	(68)	(56)	(55)	(65)	(51)
AATP1St			-	62	51	34	34	45	29
			-	(72)	(66)	(52)	(52)	(52)	(51)
AATP1Zm				-	41	27	25	39	21
				-	(54)	(42)	(43)	(55)	(39)
AATPGs					-	38	35	48	29
					-	(56)	(56)	(65)	(52)
TLC1Rp						-	35	38	27
						-	(56)	(61)	(50)
NPTHo							-	36	26
							-	(56)	(46)
NPT1Ct								-	34
								-	(56)
NPT2Ct									-
									-

7.6 Abkürzungen

A	Ampere
aa	Aminosäure (amino acids)
AAC	ADP/ATP-Carrier
AATP	ATP/ADP-Transportprotein
Abb.	Abbildung
Acc	„Accession"-Nummer
ADP	Adenosindiphosphat
ADP-Glc	ADP-Glukose
Amp	Ampicillin
AMP	Adenosinmonophosphat
At	Arabidopsis thaliana (Ackerschmalwand)
ATP	Adenosintriphosphat
bidest.	doppelt destilliert
bp	Basenpaar
Bn	Brassica napus (Raps)
BSA	Rinderserumalbumin (borine serum albumine)
C36	Rickettsia-ähnlicher Endosymbiont
ca.	circa
CAM	„Crassulacean Acid Metabolism"
Cc	Caedibacter caryophila
CCCP	Carbonylcyanidchlorophenylhydrazon
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
Clm	Chloramphenicol
CO_2	Kohlendioxid
Cp	Cyanophora paradoxa
Cr	Chlamydomonas reinhardtii
Ct	Chlamydia trachomatis
CTP	Cytidin-5´-triphosphat
d	desoxy
dATP	Desoxyadenin-5`-triphosphat
DC	Dünnschichtchromatographie
dCTP	Desoxycytidin-5`-triphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosin-5`-triphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Ds	Dunaliella salina
DTT_{red}	reduziertes Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidin-5`-triphosphat

E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiaminintetraessigsäure
EMBL	„European Molecular Biology Laboratory"
EST	„expressed sequence tag"
ET39	Ceadibacter-ähnlicher Endosymbiont
g	Gramm
g	Erdbeschleunigung
% (w/v)	Gewichtsprozente
Gs	Galdieria sulphuraria
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HEPES	[4-(2-Hydroxyethyl)-piperazino]-ethansulfonsäure
His-Tag	Histidin-Tag („tag", Forsatz)
HN3	Caedibacter-ähnlicher Endosymbiont
Ho	Holospora obtusa
H_2O	Wasser
Hv	Hordeum vulgare (Gerste)
in frame	im Leseraster
IPTG	Isopropyl-β-thiogalaktosid
IUB	„International Union of Biochemistry"
J	Joule
KH_2PO_4	Kaliumdihydrogenphosphat
kb	Kilobase(n)
KEGG	„Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes"
K_M	Michaelis-Menten-Konstante
l	Liter
λ (lambda)	Wellenlänge
Lj	Lotus japonicus (Hornklee)
Lp	Lycopersicon esculatum
m	Milli
M	molar (mol/l)
Mc	Mesembryanthemm crystallinum
MCF	„Mitochondrial Carrier Family"
MCS	multiple Klonierungsstelle (multiple cloning site)
µ	mikro
mg	Miligramm
min	Minuten
ml	Milliliter
mol	Stoffmenge

Mp	Mentha x piperita (Pfefferminze)
mRNA	Messenger-RNA
Mt	Medicago truncatula (Hopfenklee)
n	nano
NaCl	Natriumchlorid
NAD(P)	Nicotinamidadenindinukleotid(-phosphat), oxidierte Form
NAD(P)H	Nicotinamidadenindinukleotid(-phosphat), reduzierte Form
NCBI	National Center for Biotechnology Inforamtion
nm	Nanometer
NPT	Nukleosidtriphosphat-Transportprotein
OD	optische Dichte
ORF	offenes Lesraster (open reading frame)
Os	Odontella sinensis
Osa	Oryza sativa (Reis)
PCR	Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
pfu	„plaque forming unit“
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Py	Porphyra yezoensis
Pbtb	Endoparasit der Papaya-Früchte („papaya bunchy top bacterium”)
r	Resistenzgen
Rif	Rifampicin
RNA	Ribonukleinsäure
Rnase	Ribonukleinase
Rp	Rickettsia prowazekii
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse PCR
s	Sekunde
Sb	Sorghum bicolor (Mohrenhirse)
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfate)
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Sh	Soja hispida
St	Solanum tuberosum (Kartoffel)
Ta	Triticum aestivum (Weizen)
Tab	Tabelle
TEMED	N,N,N`,N`-Tetramethylethylendiamin
Tet	Tetrazyklin
TIGR	„The Institute of Genomic Research”
TM	Transmembranhelix
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan

TUME1	Chlamydia-ähnlicher Endosymbiont
UCP	„uncoupling proteins”
UDP-Glc	UDP-Glukose
UMP	Uridinmonophosphat
UDP	Uridindiphosphat
UTP	Uridintriphosphat
UV	Ultraviolett
V	Volt
V_{max}	Maximalgeschwindigkeit
% (v/v)	Volumenprozent
wt	Wildtyp
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactopyranosid
Zm	Zea mays (Mais)

7.7 Symbole für Aminosäuren

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig und ohne unerlaubte Hilfe verfaßt habe und die benutzten Hilfsmittel vollständig angegeben habe.

Ich versichere, daß ich weder an der Universität Kaiserslautern noch anderweitig versucht habe, eine Dissertation einzureichen oder mich einer Doktorprüfung zu unterziehen.

Kaiserslautern, den 5.Juni 2001

Nicole Linka